

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**BİYOSÜRFEKTANLARIN ANTİMİKROBİYAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

EBRU ŞEBNEM YILMAZ

114500

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANİZASYON MERKEZİ**

ANTAKYA

HAZİRAN-2001

Mustafa Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yrd. Doç .Dr. Uğur SIDAL danışmanlığında, Ebru Şebnem YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 25 / 06/ 2001 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından , Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Uğur SIDAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Deniz YILDIZ

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Kod No: 72

İmza

25/ 06 /2001

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mustafa KAPLANKIRAN



Bu çalışma M.K.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No : 99F 1503

Not : Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Pseudomonas</i> Genusu Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.2. Yüzey Aktif Ajanlar.....	4
1.3. Biyosüpfektanların Yapısal ve Karakteristik Özellikleri.....	6
1.4. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması.....	8
1.4.1. Biyosüpfektanların Molekül Yapısına Göre Sınıflandırılması ..	10
1.4.2. Biyosüpfektanların Üretim Kaynağına Göre Sınıflandırılması .	10
1.4.2.1. Mikrobiyal Orjinli Biyosüpfektanlar	10
1.4.2.1.1. Glukolipidler	11
1.4.2.1.2. Ramnozlipidler	12
1.4.2.1.3. Trehalozlipidler	13
1.4.2.1.4. Sophorozlipidler	13
1.4.2.1.5. Lipopeptitler ve Lipoproteinler	16
1.4.2.1.6. Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler	17
1.4.2.1.7. Polimerik Biyosüpfektanlar	17
1.4.2.1.8. Kısmi Biyosüpfektanlar	17
1.4.2.2. Enzimlerle Sentezlenen Biyosüpfektanlar	18
1.5. Biyosüpfektanların Kullanım Alanları.....	19
1.6. Biyosüpfektanların Üretimi.....	20
1.6.1. Karbon Kaynağı.....	20
1.6.2. Azot Kaynağı.....	21
1.6.3. Fosfat Kaynağı.....	21
1.6.4. Çevresel Faktörler.....	21

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Biyosüpfektan (Ramnolipid) Eldesi İçin Kullanılan Mikroorganizma.....	24
3.1.2. Biyosüpfektan (Ramnolipid) Eldesi İçin Kullanılan Besiyeri.....	24
3.1.3. Test Mikroorganizmaları.....	24
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri.....	25
3.1.5. Kullanılan Antibiyogram Diskleri.....	25
3.1.6. Ramnolipid Disklerinin Hazırlanışı.....	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Üremenin Ölçülmesinde Uygun Dalga Boyunun Saptanması	26
3.2.2. <i>Pseudomonas</i> sp. Suşunun Üreme Eğrisinin Çıkartılması	26
3.2.3. Kùltürlerde Biyosüpfektan (Ramnolipid) Miktarının Ölçülmesi	26
3.2.4. Kùltürlerden Biyosüpfektan (Ramnolipid) İzolasyonu ve Saflaştırılması	26
3.2.5. Biyosüpfektanın (Ramnolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Seri Sulandırım Testi İle Saptanması (MIC : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu)	27
3.2.6. Kontrol Grubu Antibiyotiklerin ve Biyosüpfektan'ın (Ramnolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Plak-Difüzyon Testi İle Saptanması	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	44

ÖZET

BİYOSÜRFEKTANLARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Birçok mikroorganizma çok değişik karbon kaynakları kullanılarak üretildiklerinde farklı tipte biyosürfektanlar sentezleyebilirler. Mikrobiyal yüzey ajanlar veya biyolojik sürfektanlar olarak da bilinen biyosürfektanlar sentetik sürfektanlara göre birçok avantaja sahiptir : Biyosürfektanlar bazı durumlarda sentetik sürfektanlardan farklı yüzey aktif özellikler gösterirler, bu da endüstriyel uygulamalar için yeni olanakları ortaya çıkarır ; Mikrobiyal yüzey ajanlar geleneksel bir çok sürfektana göre özel uygulamalar için de çok daha etkilidir ve biyosürfektanlar genellikle non toksik ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliktedir.

Bu çalışma ülkemiz ekosistemine adapte olmuş *Pseudomonas* sp. suşundan elde edilen biyosürfektanın (ramnolipid) antimikrobiyal etkilerinin araştırılması prosesini sunmaktadır. Bu amaçla sekiz adet test mikroorganizması seçildi. Denenen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etki Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİC) ve Plak-Diffüzyon Testi yöntemleriyle saptandı.

Tespit edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerleri *Candida albicans* için 30 µg/mL, *Escherichia coli* için 20 µg/mL, *Staphylococcus epidermidis* için 30 µg/mL , *Bacillus subtilis* için 40 µg/mL , β hemolitik *Streptococ* için 70 µg/mL , *Pseudomonas aeruginosa* için 250 µg/mL , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için 230 µg/mL , *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için 350 µg/mL olarak saptanmıştır. Ramnolipid diskleri için en yüksek aktivite β hemolitik *Streptocococ* için, en düşük aktivite ise *P. aeruginosa* bakteri kültürleri için saptanmıştır. Bu kültürler için inhibisyon zon çaplarının ortalama değerleri sırasıyla 23,8 mm ve 7,2 mm'dir.

Biyosürfektanın (ramnolipid) antimikrobiyal etkiye karşı denenen test mikroorganizmalarından Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere ve mayalara aktivite gösterdiği tespit edildi.

2001, 44 sayfa

Anahtar kelimeler : Biyosürfektan (ramnolipid); antimikrobiyal etki; *Pseudomonas* sp.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOSURFACTANT'S ANTIMICROBIAL EFFECTS

Many microorganisms can synthesize different types of biosurfactants when they are grown on different sources of carbon. Biosurfactants that are also known as microbial surface agent or biological surfactants have many advantages compared to synthetic surfactants. Biosurfactants, in some cases, show surfaces active properties different industrial applications possible. Microbial surface agents are more efficient in some special applications compared to many usual surfactants. In addition, biosurfactants are usually nontoxic and could be degraded biological.

The aim of the work is investigation of the antimicrobial effects of biosurfactant rhamnolipid which is obtained from *Pseudomonas* sp. , a microorganism well adapted to our country's ecological system. For this purpose we chose eight different test microorganisms. We determined the antimicrobial effect of rhamnolipid on test microorganisms by Minimum Inhibitor Concentration (MIC) and Plac-Diffusion test methods.

The observed MIC values for the test microorganisms are as the following; *Candida albicans* (30 µg/mL), *Escherichia coli* (20µg/mL) , *Staphylococcus epidermidis* (30 µg/mL), *Bacillus subtilis* (40 µg/mL), β hemolitik *Streptococ* (70 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (250 µg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (230 µg/mL) , *S aureus* ATCC 29213 (350 µg/mL). The highest activity for the rhamnolipid disks was obtained for β hemolitik *Streptococ*, the lowest activity was for *Pseudomonas aeruginosa*. For these bacterial cultures ,the inhibitory zone values are 23,8 mm and 7,2 mm, respectively.

It has also been observed that the biosurfactant rhamnolipid shows an inhibitory activity toward both gram positive and gram negative bacteria and yeast.

2001, 44 pages

Key Words : Biosurfactant (rhamnolipid) , antimicrobial effect , *Pseudomonas* sp.

III

ÖNSÖZ

Mikroorganizmalar üzerinde üremeyi engelleyici etkisi de bulunan biyosüpfektanların özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmanın, ülkemizde klinik alanda mevcut uygulanabilecek bazı hedeflere ulaşabilmesi amaçlanmıştır.

Master tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her kademesinde yardımlarını asla esirgemeyen, fikir ve katkılarıyla yönlendiren danışman hocam, sayın Yrd. Doç. Dr. Uğur SİDAL'a (Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve fotoğraf işleri için yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKTOKLU'ya (Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), bilgisayar çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Yaşar ERGÜN'e (Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi) ve değerli mesai arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bana her zaman destek olan çok sevdiğim aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma , Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı tarafından 99 F 1503 nolu projeyle desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

C-	Karbon
CRO	Ceftriaxone
C	Sitozin
G	Guanin
KMK	Kritik Misel Konsantrasyonu
MEL-A	Mannozileritritollipid-A
MEL-B	Mannozileritritollipid-B
MİC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
PG	Penisilin G
r RNA	Ribozomal RNA
RL	Ramnozlipid
(-)	Negatif
(+)	Pozitif
SL	Sophoroz lipid
TL	Trehaloz lipid

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Plazmitlerde lokalize olmuş genler tarafından düzenlenen özellikler	3
Çizelge 1.2. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen çeşitli biyosüpfektanlar	6
Çizelge 1.3. Çeşitli mikrobiyal biyosüpfektanların karbon kaynakları ve yüzey gerilim özellikleri	9
Çizelge 1.4. Mikrobiyal biyosüpfektanlar ve enzimle sentezlenen biyosüpfektanlar	19
Çizelge 1.5. Biyosüpfektanların uygulama alanları.....	19
Çizelge 4.1. Test mikroorganizmalarının MİC değeri.....	29
Çizelge 4.2. Test mikroorganizmalarının zon çapları.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması.....	8
Şekil 1.2. Mikrobiyal glukolipid sentezinde kullanılabilecek olası yol izleri.....	10
Şekil 1.3. <i>Serretia rubidae</i> (a) ve deniz bakteriyal suşu MM 1 (b)'nin glukoz lipidleri.....	11
Şekil 1.4. <i>Pseudomonas</i> sp.'den elde edilmiş olan ramnozlipidler.....	12
Şekil 1.5. <i>Corynebacterium diphteriae</i> 'nin ürettiği glukoz-6-monokorynomikolat.....	13
Şekil 1.6 <i>Nocardia corynebacteroides</i> 'den elde edilmiş olan pentasakkaritin molekül yapısı.....	13
Şekil 1.7 <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214'dan elde edilmiş klasik (a) ve yeni tip (b) sophoroz lipidler.....	14
Şekil 1.8. Sophoroz lipidlerin bilinen lakton halkalı molekül yapıları ve yenileri.....	15
Şekil 1.9 <i>Bacillus subtilis</i> 'ten elde edilen surfaktin.....	16
Şekil 1.10. <i>Pseudomonas rubescens</i> 'den (a) ve <i>Thiobacillus thiooxidans</i> 'den (b) elde edilen ornitin içeren lipidler	16
Şekil 1.11 <i>Candida antarctica</i> T34'den elde edilen MEL.....	18
Şekil 4.1. Uygun dalga boyunun saptanması.....	28
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas</i> sp. suşunun üreme eğrisi.....	29
Şekil 4.3. B-hemolitik <i>Streptococ</i> için zon çapları.....	32
Şekil 4.4. <i>Escherichia coli</i> için zon çapları.....	33
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> için zon çapları.....	34
Şekil 4.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> için zon çapları.....	35
Şekil 4.7. <i>Bacillus subtilis</i> için zon çapları.....	36
Şekil 4.8. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 için zon çapları.....	37
Şekil 4.9 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 için zon çapları.....	38
Şekil 4.10. <i>Candida albicans</i> için zon çapları.....	39

1. GİRİŞ

Biyosürfektanlar oldukça önemli olan biyolojik polimerlerdir. Bir çok literatür bilgisinde biyosürfektanların kullanımının giderek yaygınlaştığına dikkat çekilmektedir.

Hidrofilik ve hidrofobik alt fonksiyonel gruplar içerirler. Çok fazlı sistemlerde, polar ve polar olmayan fazlar arasındaki yüzeyde ya da yüzeyler arasında etkin olurlar ve hidrofobik grubun varlığı nedeniyle her iki fazın yüzey özelliklerini değiştirirler. Bu etkinlikleri nedeniyle ortamların yüzey gerilimini ya da ara yüzey gerilimini düşürürler.

Sürfektanlar kimyasal ya da mikrobiyal olarak sentezlenebilirler. Kimyasal yöntemlerle üretilen süfektanlar sentetik süfektanlar, mikrobiyolojik olarak bir çok farklı mikroorganizma tarafından çoğunlukla oksijenli ortamda üretilenler ise biyolojik süfektan (biyosürfektan) olarak adlandırılırlar. Günümüzde kullanılan sentetik süfektanların çoğu petrol türevlerinden elde edilmektedir. 1980'li yıllardan itibaren Kuzey Amerika pazarında sentetik süfektanların satış hacmi 25 milyon dolar olarak ifade edilmiştir ve bu rakamın yılda % 3-5 olarak artması beklenmektedir (LAYMAN, 1985; DESAI ve BANAT, 1997; CAMEOTRA ve MAKAR, 1998).

Biyosürfektanların bir çok sanayide uygulama alanı bulunmaktadır. Özellikle fermentasyon teknolojisinde ön plana çıkmalarının nedeni sentetik süfektanlara göre sahip oldukları avantajlarıdır. Bu maddeler daha öncedende değinildiği gibi yüzey ve ara yüzey gerilim katsayılarını düşürerek, ıslatma, geçirgenlik, dağıtma, hidrofobluk ve hidrofillik, emülsifiye etme ve emülsiyonu bozma, deterjanlık, jel oluşturma, köpürme, flokülasyon gibi etkilere sahiplerdir. Bu etkileri sonucu mikrobiyal büyümeyi sınırlayıcı yani antimikrobiyal özellik taşırlar (COOPER ve ZAJIC, 1980; LANG ve ark., 1989; LIN, 1996).

Ülkemizde klinik alanda biyosürfektanların kullanımına dair herhangi bir araştırma sonucu mevcut değildir. Bu alanda çalışma ilk olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmada temel olarak mikroorganizmalar üzerinde üremeyi engelleyici etkisi bulunan biyosürfektanların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. *Pseudomonas* Genusu Hakkında Genel Bilgi

Pseudomonas genusu yaklaşık 25 tür ile tanımlanmış *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alır (DOUDOROFF ve PALLERONI, 1974). Familya üyelerinin sınıflandırılması görünümlerine, pigment oluşturup oluşturmamalarına göre yapılmıştır. Son zamanlarda RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre de cins üyeleri temelde üç rRNA grubuna ayrılmışlardır (BİLGEHAN, 1996).

Genus üyeleri, 0,5-1,0 µm veya 1,5-5,0 µm uzunluğunda düzgün yada hafif kıvrımlı basilleri içerir. Bir yada birkaç polar flagella ile hareket edebilir, sap veya kılıf bulundurmazlar (PRESCOTT ve ark. 1990). Aynı zamanda familya üyeleri gram negatif, katalaz ve genellikle oksidaz pozitif, kemoorganotrof ve kuvvetli aerobtur. Spor oluşturmazlar, non-fermantatifdirler, G=C içerikleri %58-70 arasındadır (ROSE ve BARRON, 1983; BİLGEHAN, 1996).

Çok güçlü metabolizmaları bulunan cins üyelerinin çoğunun direkt izolasyonu yapılabilmektedir. Bunda doğada özellikle havada, toprakta ve sulara yaygın bulunmaları büyük rol oynar. Cins üyelerinin bir kısmı bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerinde patojenik özellikler gösterir. Özellikle memeli hayvan ve insanların bağırsağında az sayıda bulunan *Pseudomonas aeruginosa* son zamanlarda fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir (TORTORA, 1991).

Pseudomonas türleri yağları ve hidrokarbonları kolaylıkla parçalayabilme yeteneğine sahiplerdir. Kültür besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. Bazı suşlar kanlı agarda hemoliz yapar. Türlerin sentezleyip ortama ekstrakte ettikleri çok sayıdaki biyoaktif ürünler, pek çok doğal aktivitede rol almalarını sağlamıştır. Oluşturdukları pigmentler onlara seçici bir özellik kazandırmıştır. Genus içinde en detaylı çalışılmış olan tür *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*'nın piyoverdin (fluorescein), piyosiyanin, piyorubin ve piyomelanin gibi bakteriyolojik tanıda önemli olan pigmentleri bilinmektedir (TÖRECİ, 1981).

Piyoverdin, fluoresan grupta yer alan *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida* tarafından sentezlenen, suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresans veren, sarı-yeşil renkte bir pigment grubunu ifade eder. Piyoverdin siderefor olarak Fe^{+3} 'ün aktif transportunda rol oynar.

P. aeruginosa'nın oluşturduğu pigmentlerin en önemlisi piyosiyanindir. Piyosiyanin suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen fenazin grubundan mavi renkte kimyasal bir maddedir. Bu pigment, gram negatif çomak yapısındaki bakterilerden sadece *P. aeruginosa* tarafından oluşturulur ve bir *Streptomyces* türü tarafından sentezlenen siyanomisin (cyanomycin) adı verilen pigmentle aynıdır. Piyosiyanin, inorganik fosfatın bakteri hücrelerine alınmasında rol oynar (TÖRECİ, 1981).

Fenazin yapısında ve sadece *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu diğer bir pigment aeruginosin A veya aeruginosin B olarak da bilinen piyorubindir. *P. aeruginosa* karotenoid pigment oluşturmadığı için tanısı daha kolaydır. Tüm pH derecelerinde kırmızı renktedir (TÖRECİ, 1981).

Piyomelanin, klinik materyallerden izole edilen *P. aeruginosa* kökenlilerin % 2-3'ü tarafından oluşturulan ve başka hiçbir bakteri tarafından sentezlenemeyen, suda eriyen, kahverengimsi siyah renkte bir pigmenttir (TÖRECİ, 1981).

Plazmitler, *Pseudomonas*'ların genetik yapılarında önemli rol oynayan yapılardır. Çizelge 1.1'de plazmitlerde lokalize olmuş genler tarafından düzenlenen belli başlı özellikler verilmiştir (JACOBY, 1979).

Çizelge 1.1. Plazmitlerde lokalize olmuş genler tarafından düzenlenen özellikler

Dirençlilik Karakterleri :

Antibiyotikler: Karbenisillin, Kloramfenikol, Gentamisin, Kanamisin,

Streptomisin, Tetrasilin, Tobramisin, Sulfonamid

Kimyasal ve fiziksel ajanlar: Borat, Kromat, Civa iyonu, U.V.

Bakteriyofaj

Bakteriyosinler

Diğer Karakterler:

Kromozom alma yeteneği

Spesifik olarak verici faj duyarlılığı

Bakteriyosin üretiminin inhibisyonu

Verimlilik inhibisyonu

Diğer plazmitlerle olan uyumsuzluk

Bunlar bir yandan metabolizmayla ilgili olaylarda rol alarak bakterileri güçlü kılmakta bir yandan da kemoterapotik maddelere karşı direnç kazanmalarını sağlamaktadır.

Cinsin üyeleri klinik önemlerinin yanı sıra sahip oldukları metabolik aktiviteleriyle fermentasyon teknolojisinde çok tercih edilmeleri nedeniyle ayrı bir öneme sahiptirler. Kemoorganotrof olmalarına rağmen bazı türler fakültatif kemolitotroftur. Bu sebeple H_2 veya CO i enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Moleküler O_2 'nin evrensel elektron alıcısı olduğu bu grup üyelerinden denitrifiye edici olan türlerde nitrat alternatif elektron alıcısı olarak kullanılır. Metabolik aktiviteleri özellikle organik maddelerin mineralizasyonunda oldukça önem taşır. Parazitik olanların dışında bu grubun bir çok üyesi çok çeşitli organik bileşiği üreme için karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Bazı türlerin yaklaşık 100 farklı substratı kullanabildiği saptanmıştır. Bazı türler yüksek oranda aldoz şeker ve alkol içeren ortamlarda aerobik koşullarda asit üretirler. Bir çok tür ise azot yokluğunda intraselüler karbon deposu olarak poli- β hidroksibütirat biriktirir (DOUDOROFF ve PALLERONI, 1974).

Mikrobiyal üremeyi sınırlayan bir faktör olan sıcaklık grup üyeleri için 4-43 °C arasındadır. Bir çok türün üreme sıcaklığı 30 °C'dir. Bütün türler en iyi nötral ve alkali pH (7.0-8.5)'da ürerler.

Pseudomonas genusu üyelerinin kromozomlarında enterik bakterilerin plazmitlerinde bulunan bakteriyosinogenik genlerde bulunabilmektedir. Cins üyeleri genel olarak iki şekilde genetik madde aktarımını gerçekleştirirler. Bunlardan biri olan transdüksiyon yoluyla genetik transfer *P. aeruginosa* ve *P. putida* için gösterilmiştir. Diğer bir yol olan konjugasyonda ise prototip olarak *P. aeruginosa* kullanılmaktadır (DOUDOROFF ve PALLERONI, 1974).

1.2. Yüzey Aktif Ajanlar

Biyosüpfektanlar yüzey aktif ajanlar grubunda yer alırlar. Yüzey aktif ajanlar veya biyosüpfektanlar sıvıların yüzeyinde moleküller arası çekici güç nedeniyle oluşan ara yüzey ve yüzey gerilimini azaltabilirler. Bu gibi ajanlar genel olarak sabun ve deterjanlardır. Bir sıvı ortam içinde yer alan mikroorganizmalar ile ortam sıvısı arasında da yüzey gerilimi oluşur. Bu yüzey ve ara yüzey gerilimleri hücrenin yaşamsal

faaliyetleriyle yakından ilişkilidir. Yüzey gerilim kuvvetlerinde herhangi bir azalma hücrenin ölümü ile sonuçlanabilir. Gerilim kuvvetleri bazı faktörlerin etkisiyle örneğin sıcaklıkla değişebileceği gibi yüzey aktif ajanlar veya biyosüpfektanlarla da azaltılabilir.

Hafif germisidal etkiye sahip olan sabunlar ve deterjanlar büyük zincirli yağ asitlerinin sodyum ve potasyum tuzlarıdır. Bu maddelere karşı bakterilerin duyarlılıkları değişebilmektedir. Sabun ve deterjanların mikroorganizmalar üzerindeki etkisi daha ziyade mekanikselidir.

Biyosüpfektanlar hidrofilik ve hidrofobik alt-ünitelerden oluşur. Bir biyosüpfektan madde bir bakteri süspansiyonu içinde yeterince bulunduğunda , biyosüpfektanın hidrofobik kısmı bakteri yüzeyi tarafında ve hidrofilik kısmı da su tarafında yer alır. Böylece biyosüpfektan bakteri hücresi etrafında bir kabuk oluşturur. Bu durum daha önce var olan bakteri ve kültür ortamı arasındaki yüzey gerilimini azaltır. Kokusuz, tatsız, renksiz ve yüksek konsantrasyonlar dışında non-toksik olan yüzey aktif ajanlar üç temel grupta sınıflandırılabilir :

- 1) Sabunlar
- 2) Asit anyonik deterjanlar
- 3) Katyonik deterjanlar (kuaterner amonyum tuzları)

Asit anyonik deterjanlar, bakteri hücre duvarının negatif bir yüke sahip olmasından dolayı zayıf bir bakterisidal etkiye sahiptir.

Katyonik deterjanların bakterisidal etkileri incelenmiş ve yapılan çalışmalarda bunların anyonik deterjanlara nazaran daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Katyonik deterjanlarda en yaygın olarak bilinenler kuaterner amonyum tuzlarıdır (TORTORA, 1991).

Temel gruplar dışında akciğer alveollerinin duvarı içinde bulunan bir takım özel hücreler de yüzey gerilimini azaltan (süpfektan) maddeler salgırlar. Bu maddeler alveollerin kollabe olmasına yani büzölüp kapanmasına engel olur. Alveollerin yüzey gerilimini azaltan maddenin protein, lipid ve karbohidrat karışımı bir kimyasal yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir (NOYAN, 1996). Son zamanlarda yapılan medikal çalışmalarda bazı akciğer hastalıklarının yüzey gerilimini azaltan maddelerin eksikliğinden ileri geldiği düşünülmektedir. Örneğin, yeni doğan bebekleri solunum güçlüğü nedeniyle ölüme sürükleyen hiyalin membran ve atelectasis hastalıklarında, akciğer yüzey gerilimine etkili maddelerin bulunmadığı ispat edilmiştir (NOYAN, 1996).

1.3. Biyosüpfektanların Yapısal ve Karakteristik Özellikleri

Yüzey aktif ajanlar veya süpfektanlar düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında çözeltinin yüzey veya ara yüzeyine adsorbe olurlar. Böylece yüzey ve ara yüzey gerilimlerini azaltarak karakteristik olarak etkin bir özellik gösterirler (SUTTON, 1992; CONNELL, 1997). Bir süpfektan molekülü, tipik olarak hidrofilik ve hidrofobik iki kısımdan oluşur. Bu çift yönlü doğalarından dolayı ampifilik karakterdedirler. Hidrofilik kısım monomerin baş kısmı, hidrofobik kısmı ise kuyruk kısmı olarak kabul edilir ve bu kısım genel olarak uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşur (DESAI ve BANAT, 1997).

Yüzey ve ara yüzey gerilim katsayılarını azaltılmalarının yanı sıra biyosüpfektanlar, misel oluşturma özelliğine de sahiplerdir. Seyreltilmiş bir çözeltide bulunduklarında, monomerik misel grupları halinde şekillenirler. Misel formunun oluşumu için gerekli olan süpfektan konsantrasyonuna "Kritik Misel Konsantrasyonu" (KMK) denir (SUTTON, 1992). Kritik Misel Konsantrasyonu, biyosüpfektanın kalitesinin ölçülmesinde de önemli bir kriterdir.

Biyosüpfektanlar, bazı durumlarda misel formasyonunun oldukça etkili bir şekli olan mikroemülsiyon oluşumuna neden olurlar. Hem sulu çözeltilerde hem de hidrokarbon karışımlarında KMK'nu, yüzey ve ara yüzey gerilimini düşürürler. Bu nedenle az çözünür bileşiklerin sulu konsantrasyonlarını arttırırlar ve bu substratların mikroorganizmalara yaklaşmasına imkan tanımış olurlar (BANAT, 1995) (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Çeşitli Mikrobiyal Biyosüpfektanların Karbon Kaynakları ve Yüzey Gerilim Özellikleri

Biyosüpfektan	Mikroorganizma	C kaynağı	Yüzey gerilimi mN/cm ²	Ara yüzey gerilimi mN/cm ²	Kaynaklar
Glukolipidler	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	n-alkanlar	26	0,35	Ramsav & ark.1988
Glukolipidler	<i>Rhodococcus</i> sp. H13 A	hegzadekan	t.e.	0,02	Finnerty & Singer 1984
Glukolipidler	<i>Torulopsis apicola</i>	alkan/karbonhidrat	30	<0,9	Hommel & ark. 1987
Pentasakkarit lipid	<i>Nocardia</i> sp.	n-alkan	26	<1	Powalla & ark. 1989

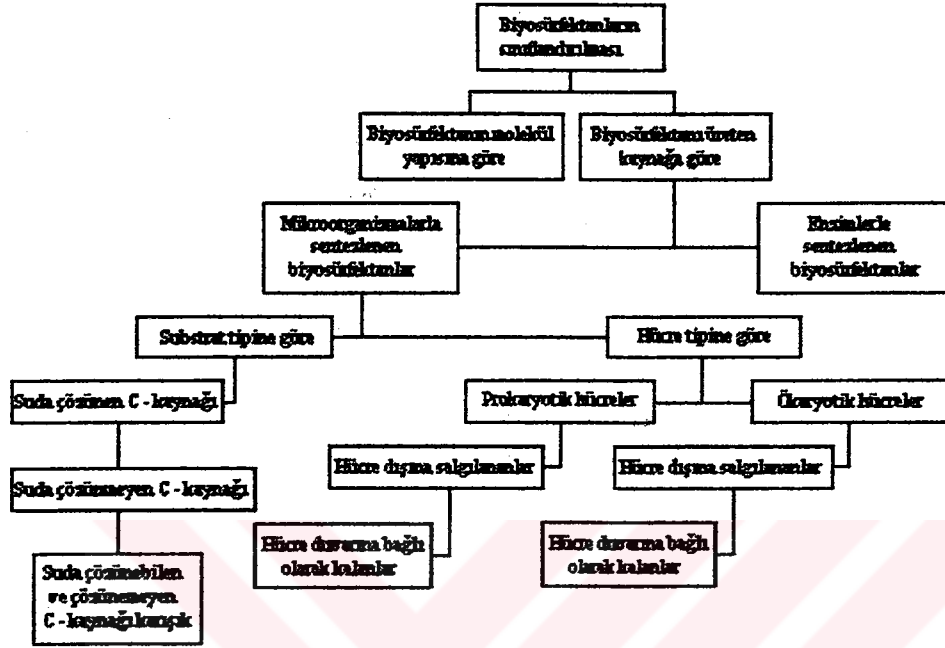
Çizelge 1.2. (Devam) Çeşitli Mikrobiyal Biyosüpfektanların Karbon Kaynakları ve Yüzey Gerilim Özellikleri

Ramnozlipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glukoz	29	0,25	Guerra & ark. 1986 Reiling & ark. 1986 Robert & ark. 1989
Rubivettinler	<i>Serratia rubidoea</i>	gliserol	25	t.e.	Matsuyama & ark. 1990
Sophoroz- lipidler	<i>Candida bombicola</i>	glukoz / oleikasit	33	1,8	Cooper & Paddock 1984 Gobbart & ark. 1984 Asmer 1988
Trehaloz- mono, dikorino Mikolatlar	<i>Nocardia</i> sp. <i>Corynebacterioides</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	n-alkan	32-36	14-17	Raap & ark. 1979 Powalla & ark. 1989
Lipopeptidler	<i>Bacillus licheniformis</i> JF2	glukoz	27	0,016	Javaheri & ark. 1985 Lin & ark. 1990
Lipopeptidler	<i>Bacillus licheniformis</i> 86	glukoz	27	0,36	Horowitz & ark. 1990
Vizkozozin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	gliserol	26,5	t.e.	Neu & ark. 1990
Serravettin	<i>Serratia marcescens</i>	gliserol	28,8- 33,9	t.e.	Matsuyama & ark. 1985, 1986
Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i>	glukoz	27-32	1	Arima & ark. 1968 Cooper & ark. 1981 Sheppard & Mulligan 1987 Sandrin & ark. 1990
Yağ asitleri	<i>Corynebacterium lepus</i>	kerosen /alkanlar	<30	2	Cooper & ark. 1979 Gerson & Zajie 1978
Yağ asitleri + doğal lipidler	<i>Nocardia erythropolis</i>	hegzadekan	32	<3	MacDonald & ark. 1981
Protein + karbonhidrat kompleksi	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	n-alkanlar	27	t.e.	Perffon & ark. 1988
Fosfotidil- etanol aminler	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	n-alkanlar	30	<1	Kretschmer & ark. 1982
Bilinmeyen	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	hegzadekan	28,5	0,55	Akit & ark. 1981

t.e. : tespit edilen bir değeri yok

1.4. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması

Biyosüpfektanlar Şekil 1.1.'de verildiğı gibi sınıflandırılabilirler.



Şekil 1.1. Biyosüpfektanların Sınıflandırılması

Çizelge 1.3'de görüldüğü gibi, birçok bakteri ve maya biyosüpfektan üretebilmektedir. Bu mikroorganizmalar, toprak, su (göller, denizler, okyanuslar) ve alkanlar (petrol rezervleri) gibi çok çeşitli habitatları seçebilirler veya bu ortamlara uyum sağlayabilecek duruma getirilebilirler. Biyosüpfektan üretimi de aerobik veya anaerobik koşullar altında gerçekleşebilir.

Pseudomonas aeruginosa'nın ürettiği ramnozlipidler, Venezuela'da birçok petrol kuyusunda var olan pH, sıcaklık değişimleri ile tuz, kalsiyum, magnezyum değerlerinin bile üzerindeki değerlerde denenmişler ve aktivitelerini kaybetmedikleri görülmüştür. *Bacillus licheniformis* JF-2 suşu izole edilmiş ve bu mikroorganizmanın hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında biyosüpfektan üretebildiği görülmüştür (BANAT, 1993).

Hidrokarbonlarla kirlenmiş olan topraklardan birçok mikroorganizma elde edilmiştir. Örneğin, *Rhodococcus* (SINGER ve FINNERTY, 1990; ABU-RUWAIDA ve ark., 1991), *Bacillus pumilus* (MORIKAWA ve ark., 1992), *Arthrobacter* sp. MIS38

suşu (MORIKAWA ve ark., 1993) gibi. ROJAS ve arkadaşları (1996), Marakabiyo nehrinden ham petrolü emülsülfıye edebilen iki tane bakteri suşunu, (*Pseudomonas aeruginosa* ve *P. fluorescens* biyotip-C), izole etmiştir (PEKİN, 2000).

Çizelge 1.3. Mikroorganizmalar Tarafından Sentezlenen Çeşitli Biyosürefektanlar

MİKROORGANİZMA	BİYOSÜREFEKTAN	REFERANS
<i>Arthrobacter</i> RAG-1	Hetropolsakkarit	Rosenberg & ark.(1979)
<i>Arthrobacter</i> MIS38	Lipopeptit	Morikawa & ark. (1993)
<i>Arthrobacter</i> sp.	Trehaloz, sukroz ve fruktoz lipitler	Suzuki & ark.(1974), Itoh & ark. (1974)
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Lipopeptit	Mcİnerney & ark. (1990)
<i>Bacillus licheniformis</i> 86	Lipopeptit	Arima & ark. (1968)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfaktin	Morikawa & ark. (1992)
<i>Bacillus pumilus</i> A1	Ramnolipit	Banat (1993)
<i>Bacillus</i> sp. AB-2	Hidrokarbon-Lipit-Protein	Eliseev & ark. (1991)
<i>Bacillus</i> sp. C 14	Mannozileritritol lipit	Kitamoto & ark. (1992)
<i>Candida antarctica</i>	Sophoroz lipit	Gobbet & ark. (1984)
<i>Candida bombicola</i>	Mannan-yağ asiti	Kappell & Fiechter (1976)
<i>Candida tropicalis</i>	Sophoroz lipit	Lesik & ark. (1989)
<i>Candida lipolytica</i> Y-917	Nötral lipitler	Cooper & ark.(1980)
<i>Corynebacterium hydrocarbolastus</i>	Protein-lipit-karbonhidrat	Zajic & ark. (1981)
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipitler	Akit & ark. (1981)
<i>Corynobacterium lepus</i>	Yağ asiitleri	Cooper & ark. (1979)
Strain MM1	Glukoz, lipit ve hidroksidekanoik asit	Passeri (1992)
<i>Nocardia erythropolis</i>	Nötral lipitler	MacDonald & ark. (1981)
<i>Ochrobactrum anthropii</i>	Protein	Wasco & Bratt (1990)
<i>Penicillium spiculisporum</i>	Spikulosporik asit	Ban & Sato (1993)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipit	Robert & ark. (1989)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptit	Neu & ark. (1990)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Karbonhidrat-lipit	Lesik & ark. (1991)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Terehaloz dikorinomikolat	Shulga & ark. (1990)
<i>Rhodococcus</i> sp. ST-5	Glikolipit	Abu-Ruwaida & ark. (1991)
<i>Rhodococcus</i> sp. 33	Polisakkarit	Neu & ark. (1992)
<i>Torulopsis bombicola</i>	Sophoroz lipit	Inoue & Ito (1982)

1.4.1. Biyosüpfektanların Molekül Yapısına Göre Sınıflandırılması

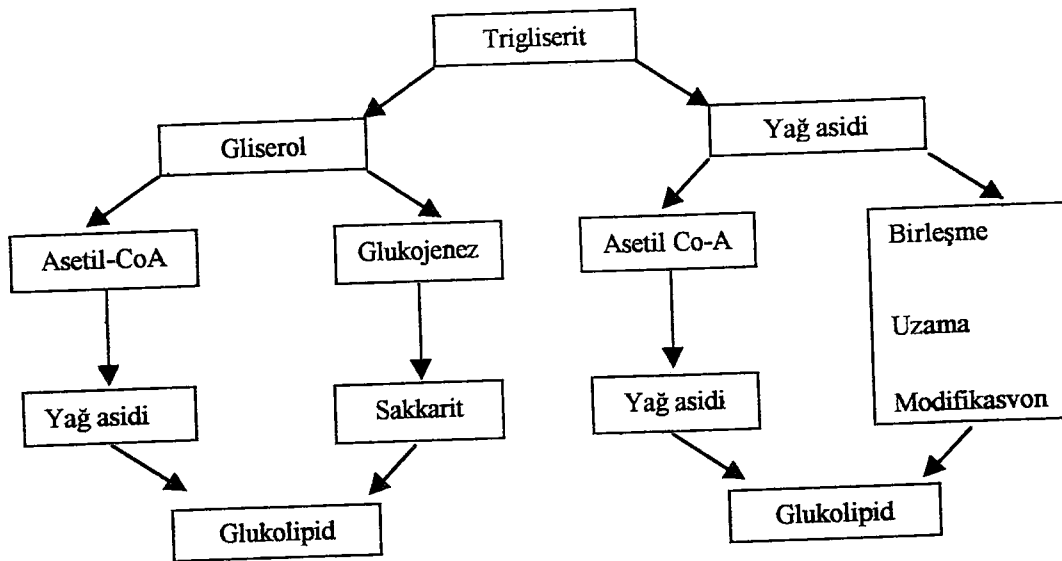
Biyosüpfektanlar molekül yapılarına göre, glukolipidler, lipoprotein-lipopeptitler, fosfolipidler, hidroksillenmiş ve çapraz bağlanmış yağ asitleri ve hücre yüzeylerinin tamamı olarak sınıflandırılırlar (PEKİN, 2000).

1.4.2. Biyosüpfektanların Üretim Kaynağına Göre Sınıflandırılması

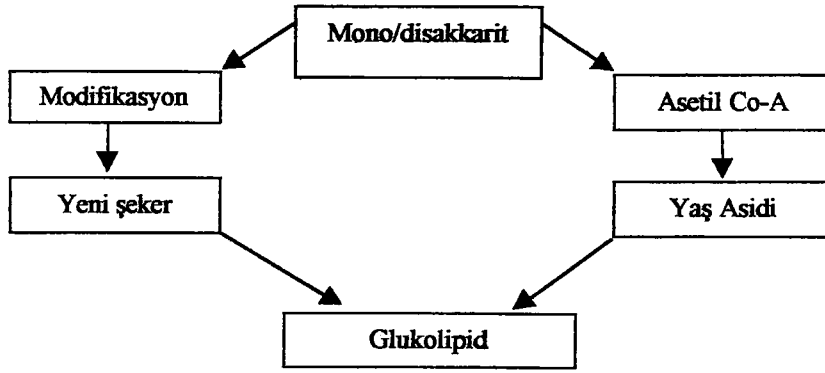
1.4.2.1. Mikrobiyal Orjinli Biyosüpfektanlar

Biyosüpfektan üreten mikroorganizmalar kullandıkları karbon kaynağına göre üç sınıfa ayrılabilir.

- 1) C- kaynağı olarak alkanları kullananlar (*Corynebacterium* sp., *Arthrobacterium* sp.).
- 2) C- kaynağı olarak suda çözünebilir maddeleri kullananlar (*Bacillus* sp.).
- 3) C- kaynağı olarak her ikisini de birlikte kullananlar (*Pseudomonas* sp.).
- 4) Bu karbon kaynakları tek başlarına veya birbirleriyle karıştırılarak kullanılabilirler. Bir µo Şekil 1.3’de verilen olası metabolik yollardan birini izleyerek bunları glukolipidlere dönüştürür.



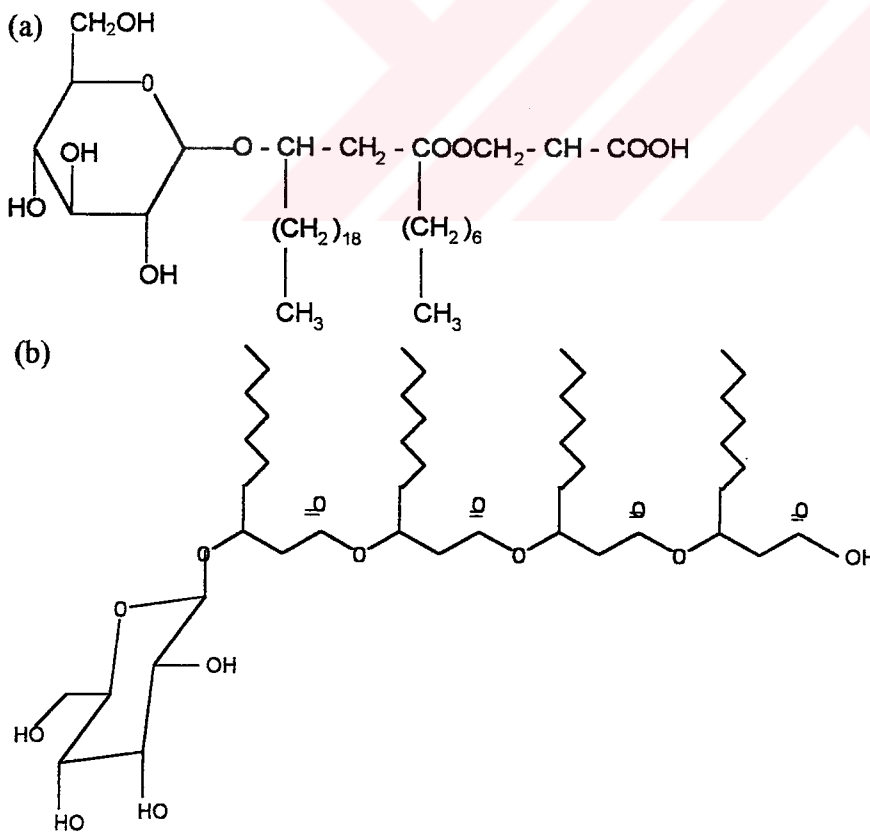
Şekil 1.2. Mikrobiyal glukolipid sentezinde kullanılabilecek metabolik yollar



Şekil 1.2. (Devam) Mikrobiyal glukolipid sentezinde kullanılabilecek metabolik yollar

1.4.2.1.1. Glukolipidler

Glukolipidler 3-hidroksi yağ asidi içeren glukolipidlerdir (Şekil 1.3.). Deniz bakterisi suşu olan MM1 (PASSERI ve ark., 1992), *Serratia rubidaea*'nın ürettiği Rubivettin RG1 (MATSUYAMA ve ark., 1990) bilinen iki önemli glukolipiddir.

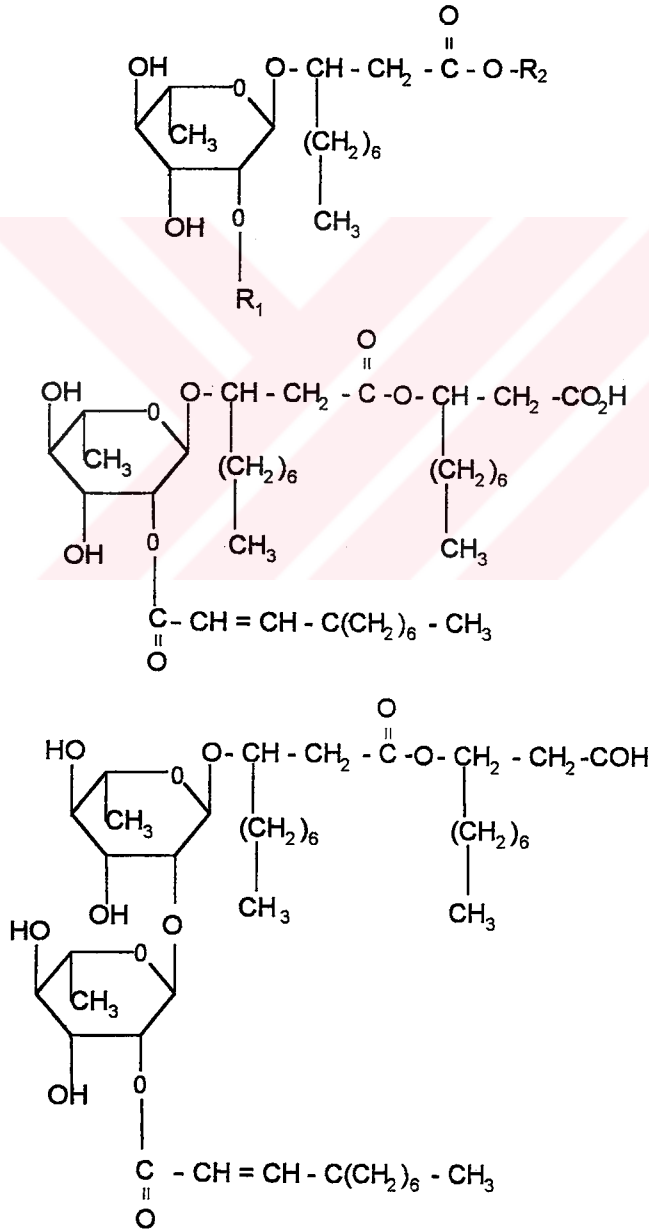


Şekil 1.3. *Serratia rubidaea* (a) ve deniz bakteriyal suşu MM1(b)'nin glukoz-lipidleri

1.4.2.1.2. Ramnozlipidler

Bu tip glukolipid moleküllerinin şeker kısmında ramnoz birimleri bulunur.

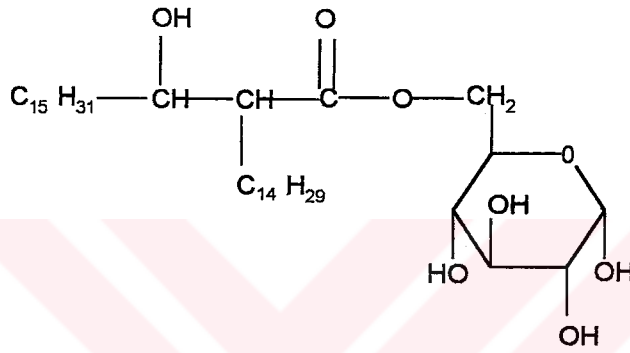
Ramnozlipidlerinde bir veya iki tane ramnoz halkası ve buna bağlanmış olarak da β -hidroksidekanoik asit zinciri bulunur. Bu ramnolipidler *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen en belli başlı glukolipidlerdir. İlk kez 1949 yılında Jarvis ve Johnson adlı bilim adamları tarafından tanımlanmıştır (DESAI ve BANAT, 1997; SIDAL, 1997). Şekil 1.4.'de molekül yapısında bir ve iki birim ramnoz şekeri olan ramnozlipidleri verilmiştir.



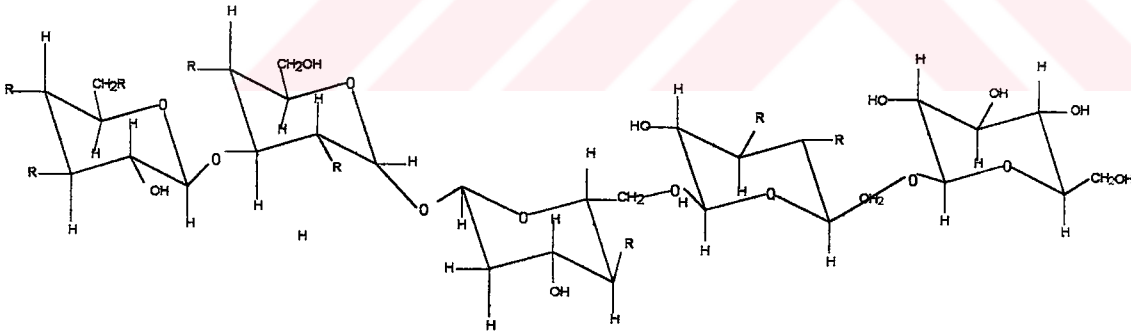
Şekil 1.4. *Pseudomonas* sp.'den elde edilmiş olan ramnozlipidler

1.4.2.1.3. Trehalozlipidler

Trehalozlipidler çoğunlukla hücre dışına salınmadan hücre duvarına bağlanmış olarak bulunurlar. Bunlar çoğu *Mycobacterium*, *Nocardia*, ve *Corynebacterium* türleri tarafından sentezlenirler. Bunların C- atom sayısı, mikolik asitin yapısı, büyüklüğü ile doymamışlık dereceleri türden türe değişiklik gösterir (DESAI ve BANAT, 1997). Şekil 1.5.'de *Corynebacterium diptheriae*'nin sentezlediği glukoz-6-monokorinomikolat, Şekil 1.6.'da da *N. corynebacterioides* in sentezlediği pentasakkarit gösterilmektedir.



Şekil 1.5. *Corynebacterium diptheriae*'nin sentezlediği glukoz-6-monokorinomikolat



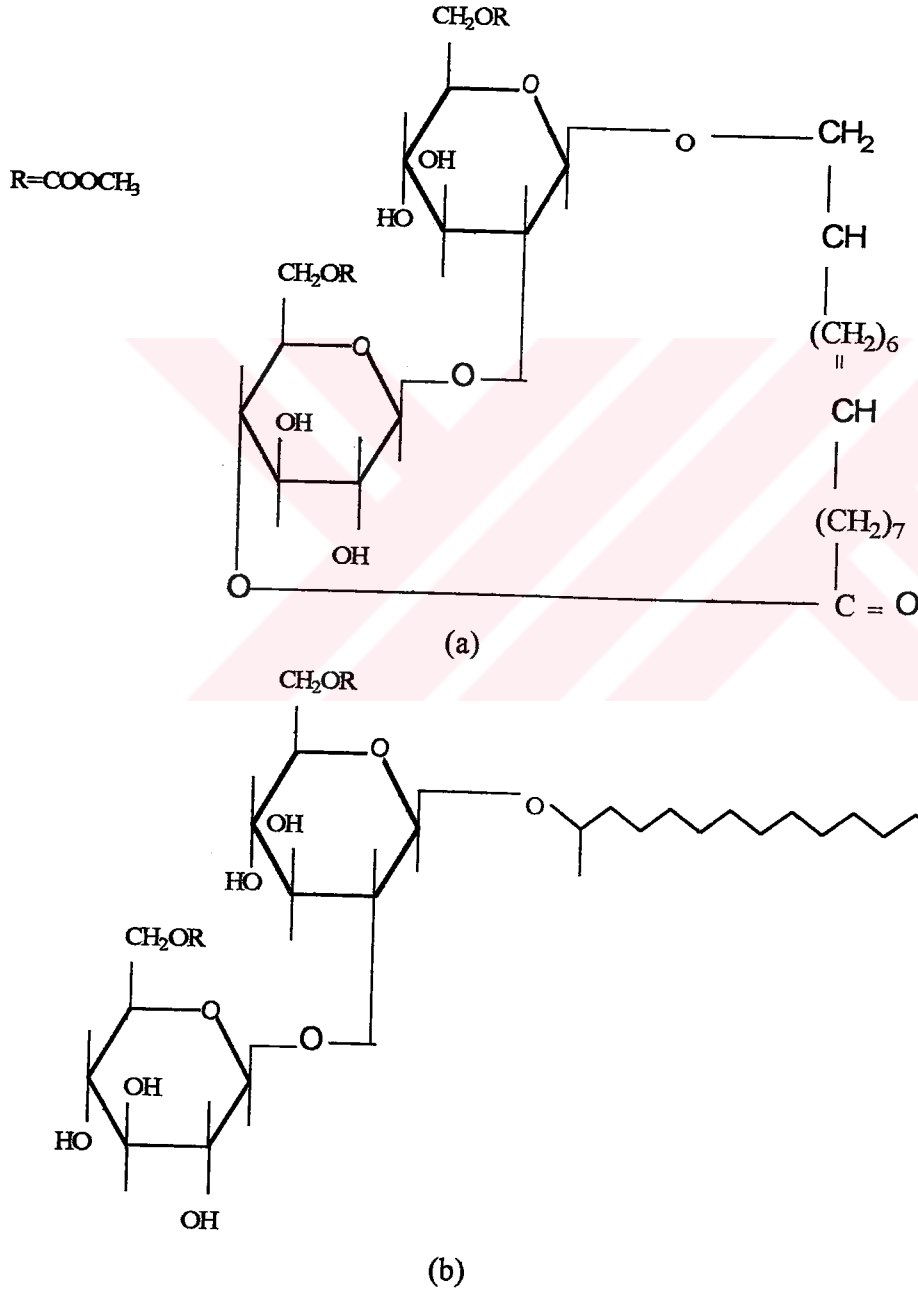
Şekil 1.6. *Nocardia corynebacterioides*'den elde edilmiş olan pentasakkaritin molekül yapısı

1.4.2.1.4. Sophorozlipidler

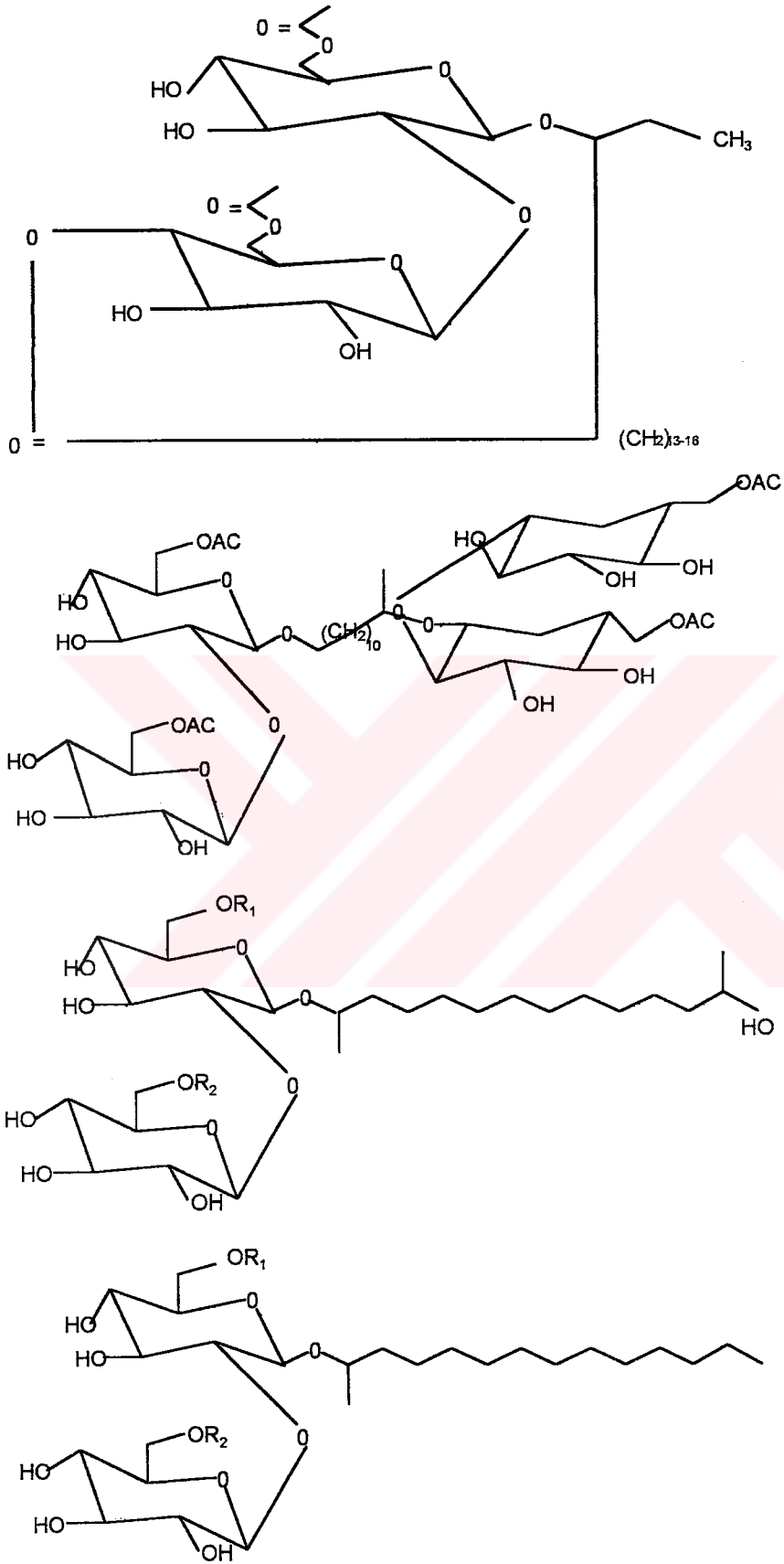
Sophorozlipidleri esasen, *Candida apicola*, *C. gropengiesseri* ve *C. bombicola* gibi mayalar tarafından sentezlenirler. Molekülün hidrofilik ucu bir disakkarit olan sophoroz (2-O-β-D-glukopiranozil-β-D-glukopiranoz) şekeridir.

Buna bir hidroksi yağ asidi birimi eter bağıyla bağlıdır. Genellikle de sophoroz birimi laktonik olarak doymuş veya doymamış olabilen yağ asidi birimine bağlanmıştır (Şekil 1.7., 1.8.).

Sophorozlipidlerin çalışma alanı oldukça geniştir. Sentez işleminde devreye giren anahtar enzimlerin üretilmesinde izlenen metabolik yol ve metabolik regülasyon konularında çalışmalar yapılmıştır (HOMMEL ve RATLEDGE, 1990; HOMMEL ve ark., 1994).



Şekil 1.7. *Candida bombicola* ATCC 22214'den elde edilmiş klasik tip (a) ve yeni tip (b) sophorozlipidleri



Şekil 1.8. Sophorozlipidlerin bilinen lakton halkalı molekül yapıları ve yenileri

Şekil 1.10. *P. rubescens*'den (a) ve *Thiobacillus thiooxidans*'dan (b) elde edilen ornitin içeren lipidler

1.4.2.1.6. Yağ Asitleri, Fosfolipidler ve Nötral Lipidler

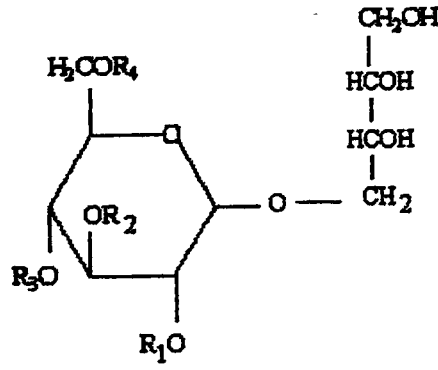
Mikrobiyal yağ asitleri genellikle sınırlı sayıda zincir uzunluğuna sahiplerdir (C_{12} - C_{20}) (DESAI ve DESAI, 1993). n-alkanlarda gelişen bazı maya ve bakteri türleri çok fazla sayıda yağ asidi ve fosfolipid üretirler. Fosfolipidlerin nicel olarak üretimi bazı *Aspergillus* sp. ve *T. thiooxidans*'da tespit edilmiştir (DESAI ve BANAT, 1997).

1.4.2.1.7. Polimerik Biyosüpfektanlar

Mannoprotein, alasan, liposan, emülsan gibi polisakkarit içeren kompleksler en iyi çalışılan polimerik biyosüpfektanlardır. Bunlar genellikle emülsifiye edici ve solubilize edici ajan olarak kullanılmaktadırlar (DESAI ve BANAT, 1997).

1.4.2.1.8. Kısmi Biyosüpfektanlar

Acinetobacter türlerinden saflaştırılan membran veziküllerinin lipopolisakkarit, fosfolipid, ve proteinden oluştukları görülmüştür. Aynı şekilde çoğu hidrokarbonları degrede edebilen patojenik mikroorganizmaların biyosüpfektan aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Örneğin, *Bacillus brevis* sporlarında bulunan gramisidinler, *Staphylococcus aureus*'ta bulunan Protein-A (DESAI ve BANAT, 1997). Şekil 1.11'de *Candida antartica* T-34 tarafından sentezlenen mannozileritritol lipidleri görülmektedir (KITAMOTO ve ark., 1990).



MEL-A : $R_1, R_4 = 2 - \alpha - \text{asetil} + 2 - \alpha - \text{alkonil} (C_8C_{14})$

MEL-B : $R_1, R_4 = 1 - \alpha - \text{asetil} + 2 - \alpha - \text{alkonil} (C_8C_{14})$

Şekil 1.11. *Candida antarctica* T-34 tarafından sentezlenen mannozileritritol lipidleri

1.4.2.2. Enzimlerle Sentezlenen Biyosüpfektanlar

Hayvan ve bitki yağları gibi oldukça ucuz ham maddeler kullanarak, kimyasal tepkimeleri katalizleyebilen enzimlerle monogliserit, fosfolipit, glukolipid ve aminoasit bazlı biyosüpfektanlar üretilmiştir. Klasik kimyasal sentezlerle karşılaştırıldığında enzimatik yöntemlerin birçok üstünlükleri vardır. Bu yöntemin enerji gereksinimi düşüktür, ısısal bozulma riski minimaldir, ürünün biyolojik olarak parçalanabilirliği yüksektir (PEKİN, 2000).

Bu alandaki ilk çalışmalar yaklaşık on yıl önce başlamıştır. En sık kullanılan enzimler immobilize mikrobiyal lipazlardır. Örneğin, *Rhizomucor miehei*'den elde edilen Lipozim ve *Candida antarctica*'dan elde edilen SP 435 en sık kullanılan enzimlerdir.

Çizelge 1.4.'de mikrobiyal ve enzimatik olarak sentezlenen biyosüpfektanların karşılaştırılması yapılmıştır (LIN, 1996).

Çizelge 1.4. Mikrobiyal biyosüpfektanlar ve Enzimle sentezlenen biyosüpfektanlar

Özellikler	Mikrobiyal Biyosüpfektanlar	Enzimle Sentezlenen Biyosüpfektanlar
Avantajlar	-Biyodegradasyon -Çeşitlilik -Düşük üretim maliyeti -In-situ uygulamalar	-Biyodegradasyon -Molekül yapılarında değişiklik yapabilmenin kolaylığı -Düşük ayırma masrafları -Saflaştırmanın kolaylığı
Dezavantajlar	-Pahalı alt akım işlemleri -Yüksek atık su hacmi	-Enzimlerin pahalı olması -Substratların çözünürlüklerinin düşük olması
Gelecekteki Gelişmeler İçin Esas Noktalar	-Suş geliştirme -Tüm hücrenin immobilizasyonu -Fermentasyon yöntemlerinin geliştirilmesi -Metabolizma mühendisliği	-Enzim immobilizasyonu -Enzim aktivite ve kararlılığının artırılması -Çok fazlı sistemleri -Süperkritik akışkan teknolojisi

1.5. Biyosüpfektanların Kullanım Alanları

Literatürlerde biyosüpfektanların bir çok kullanım alanları belirtilmektedir. Özellikle de mikrobiyolojik yollarla, klasik biyosüpfektan molekül eldesi ve enzimler kullanarak süpfektan eldesi çalışmaları ilgiyi daha çok arttırmıştır. Çizelge 1.5.'de çeşitli endüstrileri ve bu endüstrilerde biyosüpfektanların kullanımları verilmektedir.

Çizelge 1.5. Biyosüpfektanların uygulama alanları

Alan	Kullanım	Etki	Kaynak
Metaller	Cevherlere kesme ve biçim verme, pas giderme, kaplamacılık	Islatma, köpürme, emülsifiye etme ve yağlamada, korozyon engelleme, kalıpların kolay çıkarılması, kaplamacılık ve pas giderme	Kosaric, 1996
Kağıt	Kağıt hamuru işlemlerinde	Reçine alma, yıkama, köpük engelleme, renk dengeleme ve dağıtma	Kosaric, 1996
Boya ve koruyucu kaplama	Boya hazırlığında, lateks boyalarda, balımları ve cilalarda	Öğütme sırasında boyanın dağılmasında ve ıslanması, emülsiyonları stabilize etme	Kosaric, 1996
Petrol ürünleri ve üretimi	Sondaj akışkanlarında, üreten kuyulardan daha fazla ürün elde etmek, ikincil geri kazanım	Yağı emülsifiye etme, katıları dağıtma, ham petrolün deemülsüfikasyonu, taşma işlemlerinde	Yarbrough ve Coty, 1983; Tanner ve ark, 1991; Wagner, 1991

Çizelge 1.5. (Devam) Biyosüpfektanların uygulama alanları

Tekstil	Elyafaların hazırlanmasında, boya ve baskıda	Yün temizlenmesi deterjan ve emülsüfiyer	Masuoka ve ark, 1998
Yapı ve inşaat	Kaldırımcılık malzemesi, betonda, seramikte	Asfaltın kum ve çakılla yaptığı bağı kuvvetlendirmek	Kosaric, 1996
Tarım	Fosfatlı gübrelerde	Tarım ilacı çözeltilerinin emülsüfikasyonunu sağlamak	Kosaric, 1996
Gıda	Gıda üreten fabrikalarda, meyve ve sebzelerde	Temizlik ve hijyen bozulmayı önleme, yıkamayı kolaylaştırma	Kachhloz ve Schligman, 1987; Andlikonja ve Kosaric, 1993
Deri	Deri tabaklamada, boyamada	Yağ gidermede, deterjan ve emülsüfiyer, ıslatmayı artırıcı	Kosaric, 1996
Kozmetik ve ilaç	Böcek kovucu, banyo ürünleri, deodorant, makyaj malzemeleri	Emülsüfiyer, köpürtücü ajan, çözücü, ıslatıcı ajan	Abe ve ark., 1980; Tsutsami ve ark., 1980 ; Yamane, 1987
Çevre Kirliliği	Biyoremidasyon, petrol dökülen yerlerin temizlenmesi	Emülsüfiyer	Banat ve ark., 1991

1.6. Biyosüpfektanların Üretimi

Biyosüpfektanların büyümeyle ilgili ve büyümeyi engelleyici koşullar altında ve tutuklanmış hücrelerle çeşitli prekürsörler kullanılarak üretilmeleri mümkündür (DESAI ve BANAT, 1997).

Biyosüpfektan üretiminde ortamda kullanılan karbon, azot ve fosfat kaynakları ile diğer çevresel faktörlerin etkisi vardır.

1.6.1. Karbon Kaynağı

Karbon kaynağı oldukça önemlidir. DESAI ve DESAI (1993) yaptıkları çalışmalarda üretilen biyosüpfektanın yapısındaki C- kaynaklarının önemine dikkat çekmişlerdir. SYLDATK ve arkadaşları (1985) *Pseudomonas* cinsi bakterilerinde kullanılan farklı C- kaynaklarının biyosüpfektanın yapısını etkilediğini göstermişlerdir. Biyosüpfektan üretiminde C- kaynağının etkisi aynı mikrobiyal kültürlerde farklı karbon kaynakları kullanılarak tespit edilmiştir (DESAI ve DESAI, 1993; BANAT, 1995).

1.6.2. Azot Kaynağı

Azot kaynağı da önemlidir. *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 suşunda azot kaynağının yapısının ve derişiminin biyosürefektan üretimini etkilediğı saptanmıştır. Ramnozlipid üretiminde, ortamın azotu tükendiğinde glukolipidin üretiminin arttığı görülmüştür (DESAI ve BANAT, 1997). Azot sınırlaması sophorozlipid üretiminde de önemlidir. *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. ve *Torulopsis* sp.'ler ile yapılan fermentasyon çalışmalarında azotun karbona oranı veya kullanılan maya ekstraktının kontrol edilebildiğı görülmüştür (HOMMEL ve ark., 1987).

1.6.3. Fosfat Kaynağı

Fosfat kaynağı da biyosürefektan üretimini etkilemektedir. *Bacillus licheniformis* JF-2 suşu tarafından üretilen lipopeptit biyosürefektan konsantrasyonunun, ortamın fosfat derişimi düştüğünde yaklaşık iki kat arttığı görülmüştür (LIN ve ark., 1993).

1.6.4. Çevresel Faktörler

pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen gibi faktörlerin de biyosürefektan üretimini etkiledikleri belirlenmiştir. *Pseudomonas* türlerinde maksimum ramnozlipid üretiminin ortam pH'sının 6-6.5 olduğu zaman gerçekleştiğı, pH'nın 7'nin üstüne çıktığı zaman ise üretimin azaldığı gösterilmiştir (DESAI ve BANAT, 1997).

Termofilik *Bacillus* türlerinin değışik tuzluluk ve sıcaklıklarda üretimleri çalışılmıştır. *Bacillus subtilis* C9 suşunun oksijen kısıtlaması altında üç kat daha fazla üretim yaptığı tespit edilmiştir (DESAI ve BANAT, 1997).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünya çapında biyosüpfektanlarla ilgili pek çok çalışmanın yapıldığına literatürlerde değinilmektedir. Bu konuda en büyük etken biyosüpfektanların oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olmalarından kaynaklanır.

Buna karşın klinik anlamda biyosüpfektanlarla ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır. LANG ve arkadaşlarının 1989 yılında yapmış oldukları çalışmalarında kullandıkları test mikroorganizmalarından Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilere kıyasla daha duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu bakterilere karşı ramnolipid-1 ve ramnolipid-3'ün Gram (+) bakterileri inhibe ettiğini, buna karşın sophorolipid-2'nin *Glomorella cingulata* DSM 1116 (ascomycet)'da conidia çimlenmesini engellediğini tespit etmişlerdir (LANG ve ark., 1989).

POREMBA ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise deniz mikroorganizmaları (karışık ve saf bakteri kültürleri, mikro algler ve protozoalar) kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar üzerinde sekizi sentetik ve dokuzu biyolojik kökenli olmak üzere toplam 17 süpfektanın etkisi test edilmiştir. Sonuç olarak bakteriyel büyümenin oldukça önemli bir şekilde etkilendiği buna karşın, mikro alg ve flagellatların gelişimlerinde azalma olduğu gözlenmiştir (POREMBA ve ark., 1991).

1993 yılında KITOMATO ve arkadaşları mannozileritritolipid'in (MEL-A ve MEL-B) çeşitli test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak da MEL'in Gram (+)'lere karşı oldukça etkili, Gram (-) lere karşı ise daha az etkili ve mayalara karşı inaktif bir etki göstermiş olduklarını bulmuşlardır (KITOMATO ve ark., 1993). MEL'in biyosüpfektanlar arasında iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları çeşitli literatürde bildirilmiştir (HAFFERBURG ve ark., 1986; LANG ve ark., 1989).

1999 yılında NIELSEN ve arkadaşları *Pseudomonas fluorescens* DR54 suşundan elde ettikleri yeni bir siklik lipodepsipeptit viskosinamid antibiyotik biyosüpfektanın, bitki patojenleri olan *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani* türlerine karşı antifungal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (NIELSEN ve ark., 1999). Bir siklik lipopeptit antibiyotik olan süpfaktin üzerinde klinik biyokimya alanındaki çalışmaların devam ettiği kaynaklarda belirtilmektedir (PEYPOUX ve ark., 1999).

Ülkemizde biyosüpfektanlarla ilgili olarak yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Bunlardan bir tanesi zeytinyağı fabrikası atığından *Pseudomonas* suşları ile ramnolipid olarak bilinen biyosüpfektanın biyodisk reaktör yöntemiyle elde etme işlemine dayalı bir çalışmadır (SIDAL, 1997). Bir başka çalışmada ise endüstriyel atık sulardaki kalıcı organik kirleticilerin arıtımında biyosüpfektanların rolleri araştırılmıştır (SARPTAŞ, 1999). Çalışma sonunda biyosüpfektan kullanımının endüstriyel atık sulardaki zor ayrılabilir ya da kalıcı yüksek kirleticilerin biyodegradasyonu hızlandırdığı görülmüştür.

Klinik anlamda ülkemizde biyosüpfektanlarla ilgili herhangi bir çalışmanın olduğuna dair literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Bu açıdan çalışma bir ilk olma özelliği taşımaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Materyal

3.1.1. Biyosüpfektan (Ramnolipid) Eldesi İçin Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmamızda öncelikle biyosüpfektan (ramnolipid) sentezleme yeteğine sahip uygun *Pseudomonas* sp. suşu tespit edildi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundaki 10 adet *Pseudomonas* suşu arasında en yüksek aktiviteye sahip olan suş bundan sonraki bütün çalışmalarda kullanıldı. 121 °C'de 1 atm. basınç altında otoklavda steril edilen Nutrient Agar'da (Difco) 30 °C'de 24 saat süreyle üretilerek elde edilen stok kültürler +4 °C'de saklandı. Stok kültürlerin her 15 günde bir Nutrient Agar'lı (Difco) yatık besiyerlerine pasajları yapıldı (MERCADÉ ve ark., 1993; ROSE ve BARRON, 1983).

3.1.2. Biyosüpfektan Eldesi İçin Kullanılan Besiyeri

Biyosüpfektan (ramnolipid) eldesi için tespit edilen uygun *Pseudomonas* sp. suşunun üretimi için temel besiyeri olarak Medium A (45 mL/g/L) : NaNO₃, 1.28; K₂HPO₄, 0.87; MgSO₄.7H₂O, 0.1; NaCl, 0.1; KCl, 0.2; Tris (hidroksimetil aminometan), 6.5; glukoz, 20 ve Mineral Tuz Solusyonu (5 mL/g/L) : FeSO₄ (NH₄)₂SO₄.6H₂O, 0.116; H₃BO₃, 0.232; CoCl₂.6H₂O, 0.41; CuSO₄.5H₂O, 0.008; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0.022; ZnSO₄.7H₂O, 0.174 karışımı kullanıldı. Temel besiyeri 121 °C'de 1 atm. basınç altında steril edildi (RAMANA ve KARANTH, 1989). Suş bu besiyerinde pH 7'de 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutuldu.

3.1.3. Test Mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktiviteye karşı denenecek test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC

29213, β hemolitik *Streptococ* bakteri kültürleri ile *Candida albicans* maya kültürü kullanıldı. Bütün bakteri ve maya kültür örnekleri de Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Test mikroorganizmalarının üretimi için, çalışmanın özelliğine göre, Nutrient Broth ve Nutrient Agar besi ortamları kullanıldı. Besiyerleri 121 °C'de 1 atm. basınç altında otoklavda steril edildi. 15 günde bir pasaj edilerek yenilendi ve +4 °C'de saklandı (TORTORA ve ark., 1991).

3.1.5. Kullanılan Antibiyogram Diskleri

Antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesinde kontrol grubu olarak distile su (0,0118 mL), Penisilin G (10 µg/mL) ve III. Kuşak Cephalosporinler'den Ceftriaxone (30 µg/mL) emdirilmiş, steril standart antibiyogram diskleri kullanıldı. Bu antibiyogram diskleri Antakya Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı ve Antakya Doğum Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından temin edildi.

3.1.6. Ramnolipid Disklerinin Hazırlanışı

Stok ramnolipid 1000 µg/mL olacak şekilde dilüe edildi. Daha önceden hazırlanmış 50 adet Watman No 6 disklerine 0,59 mL biyosüpfektan (ramnolipid) çözeltisi pipetle emdirildi. Bu diskler 121 °C'de 1 atm. basınç altında otoklavda 15 dakika steril edildi (WHITE ve ark., 1971).

3.2. Yöntem

3.2.1. Üremenin Ölçülmesinde Uygun Dalga Boyunun Saptanması

Üremenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu saptamak amacıyla, 30 °C'de çalkalamalı (95 rpm) olarak 24 saat boyunca üretime bırakılmış *Pseudomonas* sp. kültürünün verdiği absorbans değerleri 400-700 nm dalga boyları arasında Shimadzu (UV/VIS spectrophotometer) spektrofotometre'de steril üretim ortamına karşı ölçüldü.

3.2.2. *Pseudomonas* sp. Suşunun Üreme Eğrisinin Çıkartılması

Bu amaçla, steril besiyerlerine (Medium A+ Mineral Tuz Solusyonu) 580 nm'deki absorbans değeri 1,10 olan *Pseudomonas* sp. suşunun stok kültüründen 2 mL ekim yapıldı. 30 °C'de çalkalamalı etüvde (95 rpm) inkübasyona bırakılan ortamlardan iki saatte bir alınan örneklerin 580 nm.'deki absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.3. Kültürlerde Biyosüpfektan(Ramnolipid) Miktarının Ölçülmesi

Biyosüpfektan(ramnolipid) miktarının tayini için öncelikle fenolsülfirik asit metodu kullanılarak ramnoz standartı çıkartıldı (DUBOIS ve ark., 1956). Seri dilüsyonlarla hazırlanan kültür ortamlarındaki ramnolipid değerleri 480 nm.'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bulunan optik yoğunluk değerleri standart ramnoz grafiğinden µg/mL cinsinden ramnolipid olarak hesaplandı.

3.2.4. Kültürlerden Biyosüpfektan (Ramnolipid) İzolasyonu ve Saflaştırılması

Bu amaçla uygun *Pseudomonas* sp. suşu seri pasajlarla Medium A ve Mineral Tuz Solusyonu karışımı (45 mL + 5 mL) olan sıvı besiyerlerinde çoğaltıldı. 30 °C'de çalkalamalı etüvde (95 rpm) inkübasyona bırakıldı. Kültürler üremenin 26. saatinde toplanarak 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Böylece kültür ortamı bakteri hücrelerinden ayrıldı. Daha sonra evapore edildi. Elde edilen ana stok biyosüpfektan

(ramnolipid) 1/1000 oranında dilüe edildi. Daha sonra 480 nm.'de Shimadzu (UV/VIS spectrophotometer) spektrofotometrede okuma yapıldı. Bulunan optik yoğunluk değerleri daha önceden hazırlanan ramnoz standardındaki değerlerle karşılaştırıldı. Böylece ana stokun ramnolipid miktarı hesaplandı (LANG ve ark., 1989).

3.2.5. Biyosüpfektanın (Ramnolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Seri Sulandırım Testi İle Saptanması (MİC : Minumum İnhibitör Konsantrasyonu)

Minumum İnhibitör Konsantrasyon değerleri ölçülecek olan test mikroorganizmaları Nutrient Broth besiyerlerinde 30 °C'de 95 rpm. Döngüsel çalkalama hızında 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kültürlerden elde edilen ana stok biyosüpfektan (ramnolipid) çözeltisinden (1000 µg/mL) dilüe edilmiş bir seri besiyeri ortamı hazırlandı. Bu besi ortamlarına Nutrient Broth'da kültüre edilen test mikroorganizmalarından 2 mL inoküle edildi. Besiyerlerinin 30 °C'de (95 rpm) 48 saat inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda besiyerlerindeki turbiditeye bakılarak MIC değerleri µg/mL cinsinden hesaplandı (TORTORA ve ark., 1995).

3.2.6. Kontrol Grubu Antibiyotiklerin ve Biyosüpfektan'ın (Ramnolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Plak-Difüzyon Testi İle Saptanması

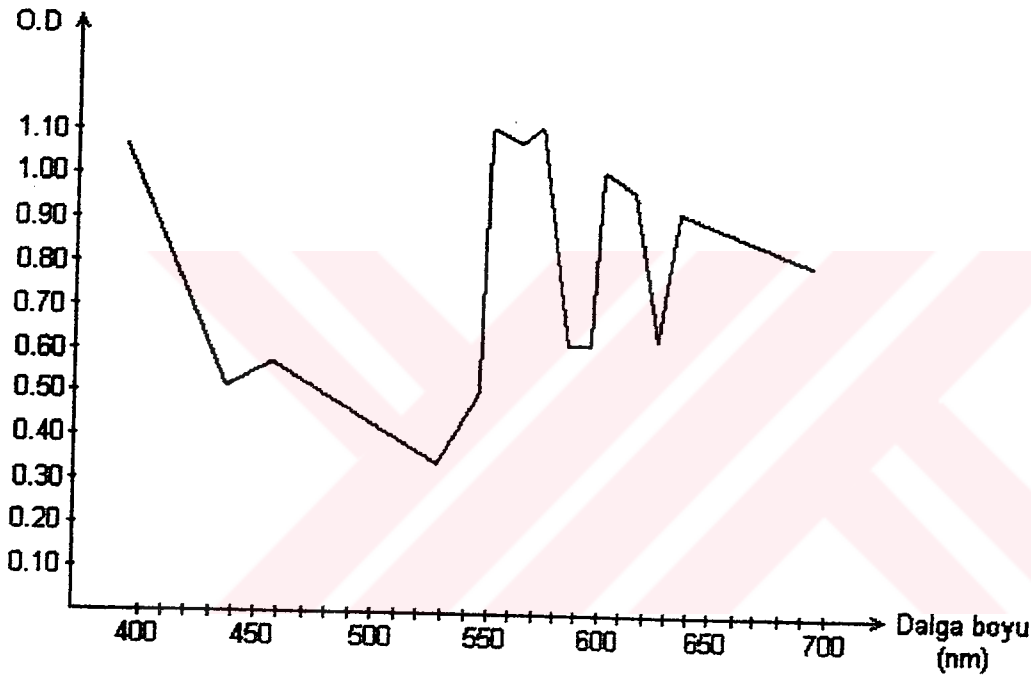
Bu çalışmada, biyosüpfektan (ramnolipid= 1000 µg/mL), Penisilin G (10 µg/mL) ve Ceftriaxone (30 µg/mL) steril antibiyotik disklerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi araştırıldı.

Bu amaçla, yaklaşık 15 mL Nutrient Agar içeren petri plakları üzerine daha önceden Nutrient Broth'da inkübe edilmiş test mikroorganizmaları ile birlikte Soft Agar (50 mL + 50 mL) içeren bakteri ve maya kültürleri tatbik edildi. Bunların Nutrient Agar plakları üzerinde homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Test edilecek biyosüpfektan (ramnolipid), distile su ve antibiyotiklerin antibiyogram diskleri bu homojen olarak dağıtılmış agar üzerine yerleştirildi. Daha sonra 37 °C'de bir günlük inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde oluşan zonların çapları milimetrik bir cetvelle (kumpas) ölçüldü (ZAHNER ve WERNER, 1972).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Üremenin Ölçülmesinde Uygun Dalga Boyunun Saptanması

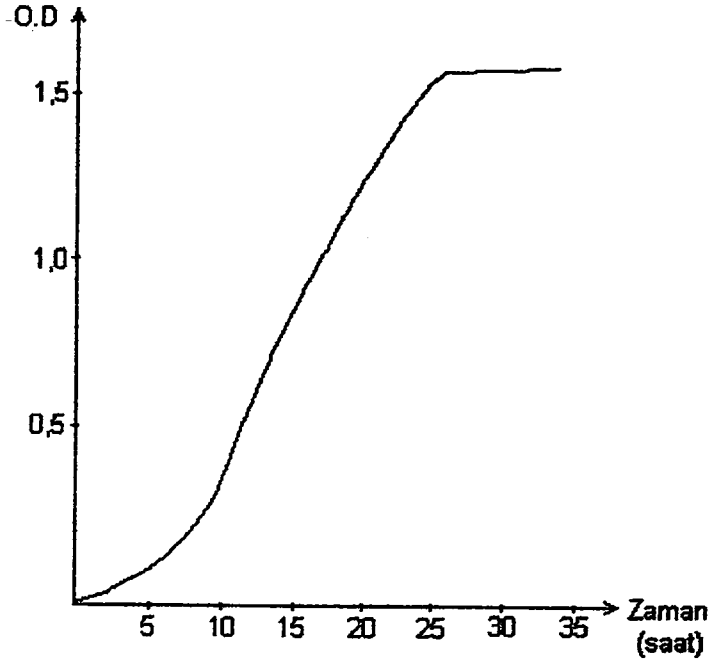
Uygun dalga boyunu saptamak amacıyla maksimum absorpsiyon spektrumunun çıkartıldığı bu çalışmada, 400-700 nm. dalga boylarında yapılan ölçümler sonucu, absorbansın 1,10 olarak ölçüldüğü 580 nm en uygun dalga boyu olarak seçildi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Uygun dalga boyunun saptanması (değerler 3 örnekle yapılan ölçümlerin ortalamasıdır).

4.2. *Pseudomonas* sp. Suşunun Üreme Eğrisinin Çıkartılması

Çalkalamalı etüvde (95 rpm) 30 °C'de inkübasyona bırakılmış kültürlerden üremenin ikinci saatinden itibaren iki saat aralıkla yapılan ölçümler sonucu, yirmialtıncı saatte durgunluk fazına geçildiği gözlemlendi. Üremenin bu saatinden itibaren absorbans değerlerinde düşüş tespit edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Pseudomonas* sp. suşunun üreme eğrisi (değerler 3 örnekle yapılan ölçümlerin ortalamasıdır)

4.3. Biyosüpfektan'ın (Rannolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Seri Sulandırım Testi İle Saptanması (MİC: Minumum İnhibitör Konsantrasyonu)

Biyosüpfektan'ın (rannolipid) test mikroorganizmalarının üremesine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada seri sulandırım testlerinin sonucuna göre her bir test mikroorganizması için tespit edilen MIC değerleri $\mu\text{g}/\text{mL}$ cinsinden Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Tespit edilen konsantrasyonlarda inhibisyon % 100'dür.

Çizelge 4.1. Test Mikroorganizmalarının MİC Değerleri

Mikroorganizma Adı	MİC Değeri ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
β hemolitik <i>Streptococ</i>	70
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	230
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	350
<i>P. aeruginosa</i>	250
<i>E. coli</i>	20
<i>S. epidermidis</i>	30
<i>C. albicans</i>	30
<i>B. subtilis</i>	40

4.4. Kontrol Grubu Antibiyotiklerin, Distile Su ve Biyosüpfektanın (Ramnolipid) Test Mikroorganizmalarının Üremesine Etkisinin Plak-Difüzyon Testi ile Saptanması

Kontrol grubu olarak kullanılan distile su disklerinin etrafında hiçbir test mikroorganizmasında zon oluşmadığından, zon çapı ölçülemedi. Biyosüpfektan (ramnolipid) ve kontrol antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları milimetrik cetvelle (kumpas) ölçüldü. Deney her mikroorganizma için 6 kez uygulandı. Test mikroorganizmaları için tespit edilen zon çapları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Test Mikroorganizmalarının Zon Çapları

Mikroorganizma Adı	RL. ÖRNEKLERİ						PG (10)	CRO (30)	Distile Su
	I	II	III	IV	V	VI			
β hemolitik <i>Streptococ</i>	25,4 $\pm$ 1,41	23,7 $\pm$ 1,41	21,2 $\pm$ 1,41	24,0 $\pm$ 1,41	24,6 $\pm$ 1,41	24,0 $\pm$ 1,41	20,9	31,5	*T. E
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14,4 $\pm$ 0,53	15,4 $\pm$ 0,53	15,2 $\pm$ 0,53	14,0 $\pm$ 0,53	15,1 $\pm$ 0,53	15,2 $\pm$ 0,53	19,4	20,8	*T. E
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	9,5 $\pm$ 1,05	7,5 $\pm$ 1,05	6,5 $\pm$ 1,05	6,0 $\pm$ 1,05	8,5 $\pm$ 1,05	9,0 $\pm$ 1,05	0,94	12,0	*T. E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,0 $\pm$ 0,28	7,0 $\pm$ 0,28	7,3 $\pm$ 0,28	6,8 $\pm$ 0,28	7,6 $\pm$ 0,28	7,3 $\pm$ 0,28	0,94	0,86	*T. E
<i>Escherichia coli</i>	18,0 $\pm$ 0,51	17,4 $\pm$ 0,51	17,2 $\pm$ 0,51	17,8 $\pm$ 0,51	18,2 $\pm$ 0,51	18,6 $\pm$ 0,51	8,3	15,0	*T. E
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11,5 $\pm$ 1,30	8,0 $\pm$ 1,30	10,0 $\pm$ 1,30	9,4 $\pm$ 1,30	8,6 $\pm$ 1,30	10,7 $\pm$ 1,30	0,99	18,6	*T. E
<i>Candida albicans</i>	10,7 $\pm$ 1,46	12,4 $\pm$ 1,46	12,6 $\pm$ 1,46	10,4 $\pm$ 1,46	10,2 $\pm$ 1,46	8,7 $\pm$ 1,46	0,94	9,4	*T. E
<i>Bacillus subtilis</i>	16,0 $\pm$ 0,99	15,2 $\pm$ 0,99	14,6 $\pm$ 0,99	14,6 $\pm$ 0,99	13,4 $\pm$ 0,99	13,5 $\pm$ 0,99	9,8	36,0	*T. E

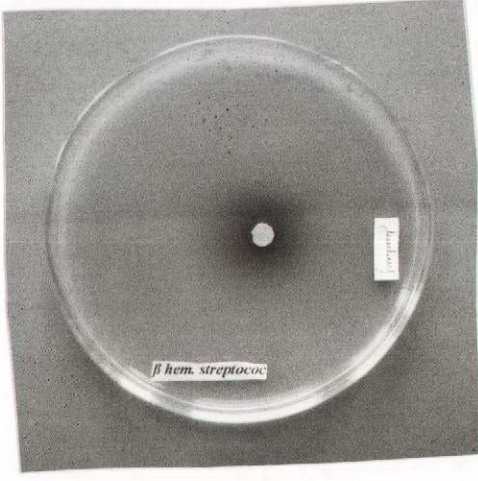
*T. E = Tespit edilmemiştir

Pseudomonas sp.'den ekstrakte edilen biyosüpfektan'ın (ramnolipid) antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmaların bulguları Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

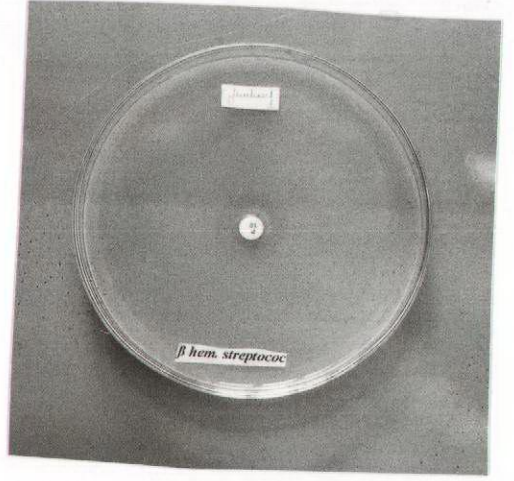
Bulgularımıza göre, *Pseudomonas* sp.'den elde edilen biyosüpfektan'ın (ramnolipid) test mikroorganizmalarının tümüne karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Tespit edilen MİC değerleri Çizelge 4.1.'de de gösterildiği gibi; β hemolitik *Streptococ* 70 μ g/mL, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 230 μ g/mL, *S. aureus* ATCC 29213 350 μ g/mL, *Pseudomonas aeruginosa* 250 μ g/mL, *Escherichia coli* 20 μ g/mL, *S. epidermidis* 30 μ g/mL, *Candida albicans* 30 μ g/mL, *Bacillus subtilis* 40 μ g/mL olarak saptanmıştır. Test mikroorganizmalarına karşı kontrol grubu olarak kullanılan distile su disklerinde hiçbir inhibisyon oluşmamıştır. Ancak kontrol

antibiyotiği olarak kullanılan Penisilin G (10)'nin inhibisyon zon çapları Çizelge 4.2.'de de görüleceği üzere; β hemolitik *Streptococ* 20,9 mm, *S. aureus* ATCC 25923 19,4 mm, *S. aureus* ATCC 29213 12 mm, *P.aeruginosa* 0,94 mm, *E. coli* 8,3 mm, *S. epidermidis* 0,99 mm, *C. albicans* 0,94 mm, *B. subtilis* 9,8 mm, Ceftriaxon (30) kontrol antibiyotiği için ise zon çapları β hemolitik *streptococ* 31,5 mm, *S.aureus* ATCC 25923 20,8 mm, *S. aureus* ATCC 29213 12 mm, *P. aeruginosa* 0,86 mm, *E. coli* 15 mm, *S. epidermidis* 18,6 mm, *C. albicans* 9,4 mm, *B. subtilis* için de 36 mm olarak saptanmıştır. Her test mikroorganizması için altı tekrarlı olarak denenen ramnolipid diskleri için en yüksek aktivite β hemolitik *Streptococ* için, en düşük aktivite ise *P. aeruginosa* bakterisi kültürleri için saptanmıştır. Bu kültürler için inhibisyon zon çaplarının ortalaması sırasıyla 23,8 mm ve 7,2 mm'dir (Şekil 4.3., Şekil. 4.4., Şekil. 4.5., Şekil. 4.6., Şekil. 4.7., Şekil. 4.8., Şekil. 4.9., Şekil. 4.10.).

Biyosüpfektanların antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yapılan daha önceki çalışmaların sonuçları yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (HAFERBURG ve ark., 1986; KITOMATO ve ark., 1993; LANG ve ark., 1989; NIELSEN ve ark., 1999; POREMBA ve ark., 1991).



a



b

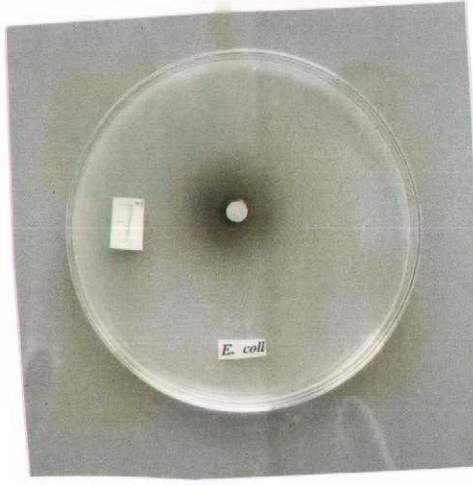


c



d

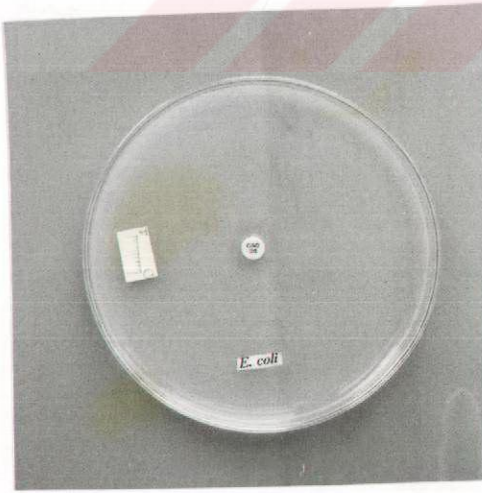
Şekil 4.3. β hemolitik *Streptococ* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



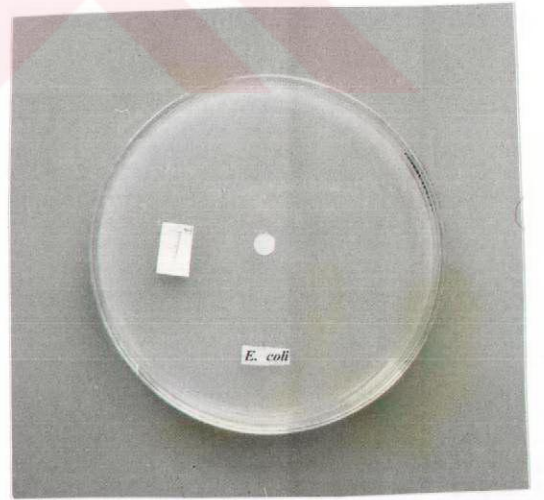
a



b

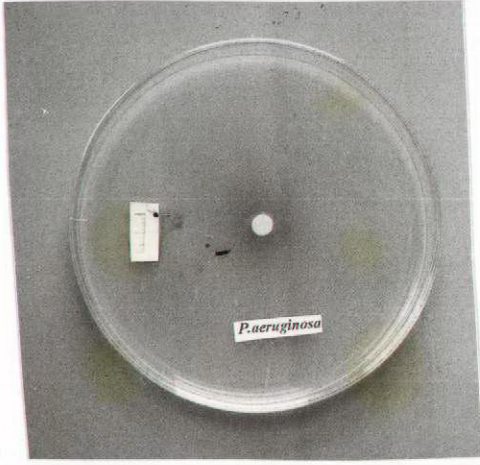


c

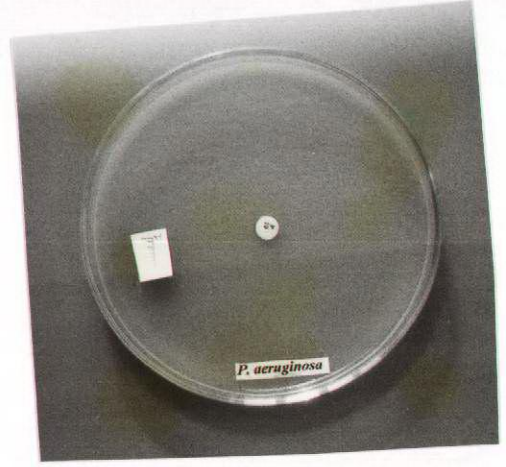


d

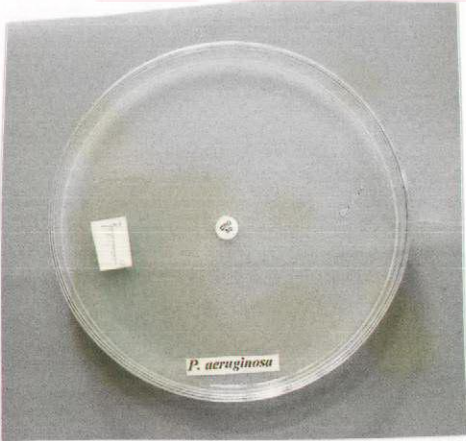
Şekil 4.4. *E. coli* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



a



b



c



d

Şekil 4.5. *P. aeruginosa* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



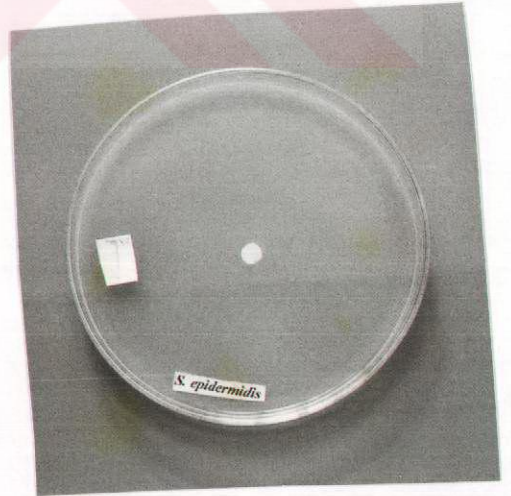
a



b

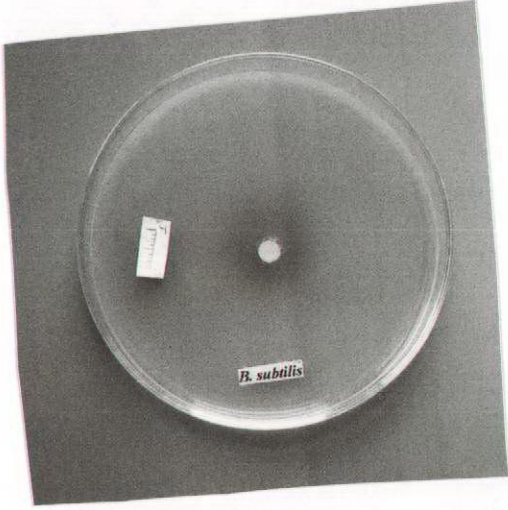


c

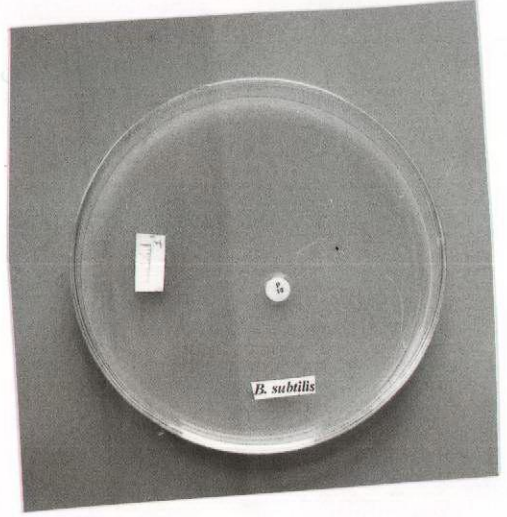


d

Şekil 4.6. *S. epidermidis* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



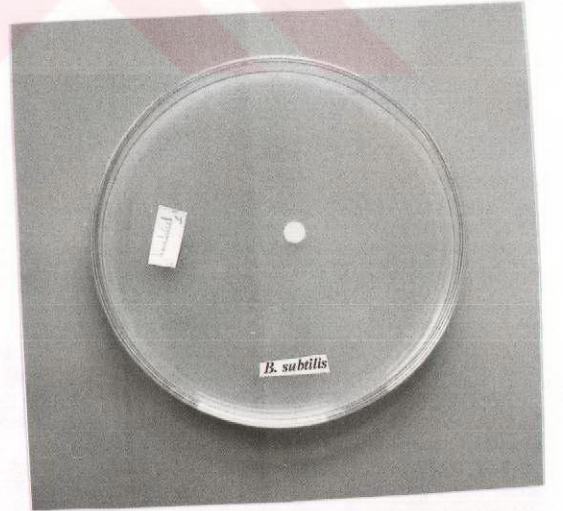
a



b

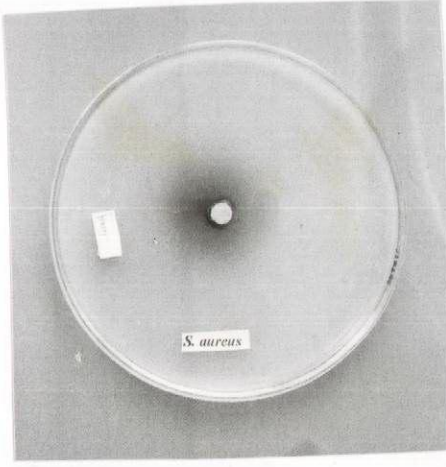


c



d

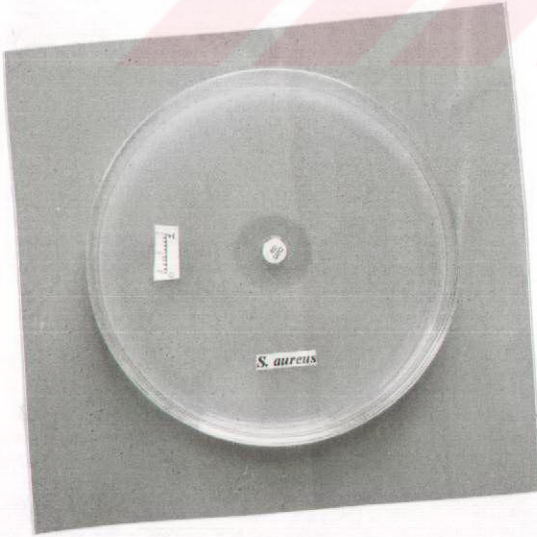
Şekil 4.7. *B. subtilis* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



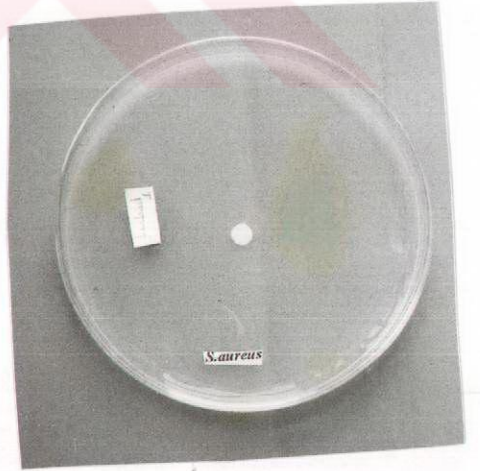
a



b

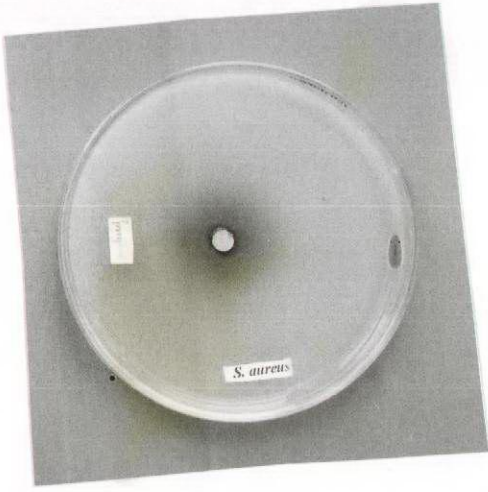


c

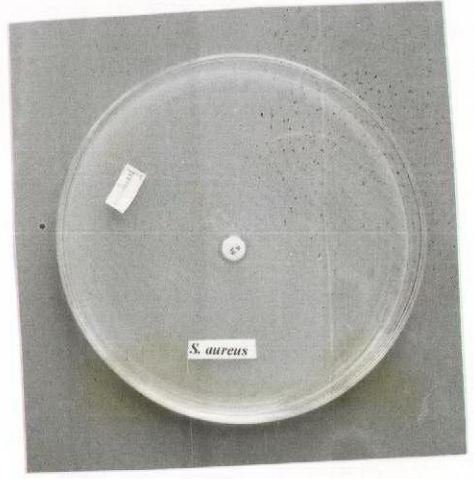


d

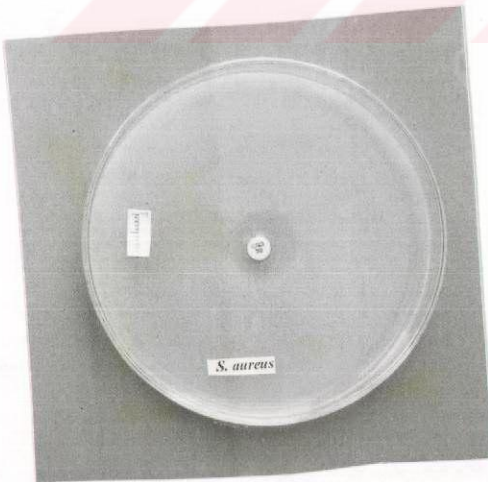
Şekil 4.8. *S. aureus* ATCC 25923 suşu için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



a



b

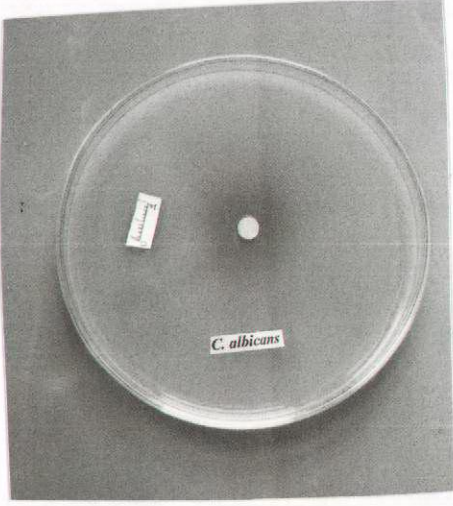


c

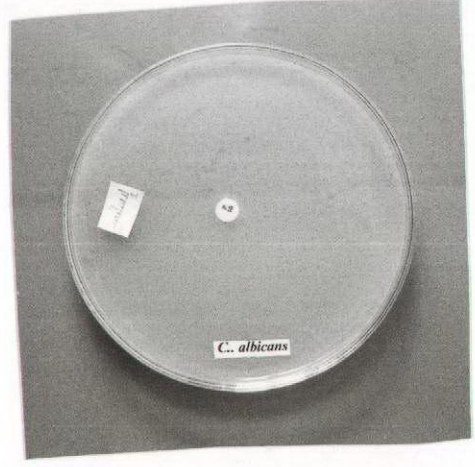


d

Şekil 4.9. *S. aureus* ATCC 29213 suşu için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)



a



b



c



d

Şekil 4.10. *C. albicans* için zon çapları (a- RL, b- PG (10), c-CRO (30), d-Distile su)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyosüpfektanların antimikrobiyal etkileriyle ilgili olarak yapılan daha önceki araştırmaların sonuçlarına göre;

- Yüzey aktif maddelerin absorbsiyon alanı sitoplazmik membrandır.
- Düşük konsantrasyonlar osmotik stabilitenin ve sitoplazmik komponentlerin (K, nükleotit, aminoasit vs.) kaybına neden olur. Yüksek konsantrasyonlar ise hücre içindeki proteinleri bağlar.
- Gram pozitif bakteriler gram negatif bakterilere göre daha kolay inhibe olmaktadır (LANG ve ark., 1989).

Çalışmamızda daha önceden de değinildiği üzere biyosüpfektan (ramnolipid) sentezleme yeteneğine sahip *Pseudomonas* sp. suşundan elde edilen bu polimer bileşiklerin antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda göstermektedir ki kullanılan tüm test mikroorganizmalarında üreme inhibe olmaktadır.

Sonuç olarak, biyosüpfektan'ın (ramnolipid) antimikrobiyal etkisine karşı denenen test mikroorganizmalarından Gram (+) ve Gram (-) bakterilere ve mayalara karşı aktivite göstermiştir. Aynı zamanda kontrol antibiyotiği olarak kullanılan Penisilin G (10) ve Ceftriaxone (30) disklerinin zon değerleri biyosüpfektan (ramnolipid) disk değerlerine yakın bulunmuştur. Optimize edilmiş bu çalışmamızın konu ile ilgili bundan sonra yapılacak klinik çalışmalara katkı sağlayacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

- ABU-RUWAIDA, A. S., BANAT, I. M., HADITIRTO, S., SALEM, A., KADRI, M., 1991. Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria; Product, Characterization and Evaluation. **ACTA Biotechnologica**, 11 (4); 315-324.
- BANAT, I. M., 1993. The Isolation of a Thermophilic Biosurfactant Producing *Bacillus* sp. **Biotech. Lett.**, 13; 591-594.
- BANAT, I. M., 1995. Characterization of Biosurfactants and Their Use in Pollution Removal State of Art. (Review) **ACTA Biotechnologica**, 15; 251-267.
- BANAT, I. M., 1995. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation. (Review). **Bioresource Technol.**, 51; 1-12.
- BİLGEHAN, H., 1996. **Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları**. Barış Yayınları: 139, 550s., Ankara.
- CAMEOTRA, S. S. and MAKKAR, R. S., 1998. Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions. **Appl. Microbiol. Biotech.**, 50 (5); 520-529.
- CONNELL, N., 1997. Correlation of Nitrogen Metabolism With Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. And Environ. Microbiol.**, 3016-3019.
- COOPER, D. G. and ZAJIC, J. E., 1990. Surface Active Compounds from Microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.**, 26; 229-253.
- DESAI, J. D. and DESAI, A. J., 1993. Production of Biosurfactants. In Kosaric, N (Ed.). **Biosurfactants: Production, Properties, Applications**. Marcel Dekker, Inc.
- DESAI, J. D. and BANAT, I. M., 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, 61(1); 47-67.
- DOUDOROFF, F. M. and PALLERONI, N. J., 1974. Genus *Pseudomonas*. In **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (Ed.). R. F. Buchanan and N. E. Gibbons Williams and Wilkins, Baltimore, M.d., pp 217-243.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, B. A. and SMITH, F., 1956. Colorimetric Method of Determination of Sugar and Related Substances. **Anal. Chem.**, 28; 350-356.
- HAFERBURG, D., HOMMEL, R., CLAUS, R. and KLEBER, H-P., 1986. Extracellular microbial Lipids as Biosurfactants. **Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.**, 33; 53-93.
- HOMMEL, R., STUWER, O., STUBER, W., HAFERBURG, D. and KLEBER, H-P., 1987. Production of Water Soluble Surface-Active Exolipids by *Torulopsis apicola*. **Appl. Microbiol. Biotech.**, 26; 199-205.
- HOMMEL, R. and RATLEDGE, C., 1990. Evidence for Two Fatty Alcohol Oxidases in The Biosurfactant-Producing Yeast *Candida (Torulopsis) bombicola*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 70; 183-186.
- HOMMEL, R., WEBER, L., WEISS, A., HIMELRICH, U., RILKE, O., KLEBER, H-P., 1994. Production of Sophorose Lipid by *Candida apicola* Grown on Glucose. **Journal of Biotechnol.**, 33; 147-155.
- JACOBY, 1979. Genus *Pseudomonas*. In **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (Ed.). R. F. Buchanan and N. E. Gibbons Williams and Wilkins, Baltimore, M.d., pp 217-243.

- KITAMOTO, D., AKIBA, S., HIOKI, C. and TABUCHI, T., 1990. Extracellular Accumulation of Mannosylerythritol Lipids by a Strain *Candida antarctica*. **Agric. Biol. Chem.**, 54; 31-36.
- KITAMOTO, D., YANAGISHITA, H., SHINBO, T., NAKANE, T., KAMISAWA, C., NAKAHARA, T., 1993. Surface Active Properties and Antimicrobial Activities of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants Produced by *Candida antarctica*. **Journal of Biotechnol.**, 29 (1); 91-96.
- LANG, S., KATSIWELA, E. and WAGNER, F., 1989. Antimicrobial Effects of Biosurfactants. **Fat. Sci. Technol.**, 9; 363-366.
- LAYMAN, P. L., 1985. Industrial Surfactants Set for Strong Growth. **Chem. Eng. News**, 23; 23-48.
- LIN, S. C., MINTON, M. A., SHARMA, M. M., GEORGIU, G., 1994. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by a *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 31-38.
- LIN, S. C., 1996. Biosurfactants: Recent Advances. **J. of Chem. Technol. Biotechnol.**, 66; 109-120.
- MATSUYAMA, T., KANEDA, K., ISHIZUKA, I., TOIDA, T., YANO, I., 1990. Surface Active Glycolipid and Linked 3-hydroxy Fatty Acids Produced by *Serratia rubidae*. **J. of Bacteriology**, 172; 3015-3022.
- MERCADÉ, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., ESPUNY, M. J., ANDRÉS, C. De., GUINEA, J., 1993. Olive Oil Mill Effluent (OOME). New Substrate for Biosurfactant Production. **Bioresource Technology**, 43; 1-6.
- MORIKAWA, M., ITO, M., IMANAKA, T., 1992. Isolation of a New Surfactin Producer, *Bacillus pumilis* A-1, Cloning and Nucleotide Sequence of the Regulatory Gene *psf-1*. **J. of Ferment. Bioeng.**, 74; 255-261.
- MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y., IMANAKA, T., 1993. A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. **J. of Bacteriology**, 175; 6459-6466.
- NIELSEN, T. H., CHRISTOPHERSEN, C., ANTHONI, V., SORENSEN, J., 1999. Viscosinamide, a New Cyclic Depsipeptide With Surfactant and Antifungal Properties Produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **J. of Appl. Microbiol.**, 87(1); 80-90.
- NOYAN, A. 1996., **Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. Meteksan Yayınları**, 9. Baskı, 1157, 514s., Ankara.
- PASSERI, A., SCHMIDT, M., HAFFNER, T., WRAY, V., LANG, S., WAGNER, F., 1992. Marine Biosurfactants II. Production and Characterization of an Anionic Trehalose Tetraester from The Marine Bacterium *Arthrobacter* sp. **Appl. Microbiol. Biotech.**, 37; 281-286.
- PEKIN, G., 2000. Biyosüpfektanların Ayrılması ve Saflaştırılması. **Doktora Tezi**. Ege Üniv., İzmir.
- PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., WALLACH, J., 1999. Recent Trends in The Biochemistry of Surfactin. **Appl. Microbiol. Biotech.**, 51(5); 553-563.
- POREMBKA, K., GUNKEL, W., LANG, S., WAGNER, F., 1991. Marine Biosurfactants III. Toxicity Testing With Marine Microorganisms and Comparison With Synthetic Surfactants. **Z. Naturforschung (C)** 46(3-4); 210-216.
- PRESCOTT, M. L., HARLEY, P. J. and KLEIN, A., 1990. Prokaryotic Cell Structure and Function: **Microbiology**, Kane, K (Ed.). Wm. C. Brown Publishers, USA, p., 49-51.

- RAMANA, K. V. and KARANTH, N. G., 1989. Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotech. Lett.**, 11 (6), 437-442.
- ROSE, N. R., BARRON, A. L., 1983. Microbiology: Basic Principles and Clinical Applications. **MacMillan Publishing Company**, New York. p., 181-185.
- SARPTAŞ, H., 1999. Enhanced Biodegradation of Persistent Organic Pollutants in Industrial Waste Waters by Biosurfactants. **Yüksek Lisans Tezi**. Dokuz Eylül Ün., İzmir.
- SIDAL, U., 1997. *Pseudomonas* sp. İle Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biyosürfektan Eldesi. **Doktora Tezi**. Trakya Ün., Edirne.
- SINGER, M. E. V. and FINNERTY, W. R., 1990. Microbial Biosurfactants. **J. of Microbiol.**, 36; 746-750.
- SUTTON, R., 1992. Use of Biosurfactants Produced by *Nocardia amarae* for Removal and Recovery of Non-ionic Organics from Aqueous Solutions. **Water Science and Technol.** 26; 2393-2396.
- SYLDATK, C., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V. and WITTE, L., 1985. Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from *Pseudomonas* Spec. DSM 2874 Grown on n-alkanes. **Z. Naturforschung.** 40; 51-60.
- TORTORA, G. J., 1991. **Microbiology: An Introduction**. The Benjamin Cummings Publishing Company, California, p., 217-276.
- TÖRECİ, G. Ü., 1981. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Pigmentleri Toksinleri ve Enzimleri . **II. Ulusal Kükem Kongresi**. s., 76-91.
- WHITE, M. G. and ASCH, M. J., 1971. Acid-Base Effects of Topical Mafenide Acetate in The Burned Patient. **New Eng. J. Med.**, p., 284-1281.
- ZAHNER, H. and WERNER, K.M., 1972. **Tests of Antibiotic Activity: Biology of The Antibiotics**. Springer-Verlag, New York Inc. p., 25-33.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İskenderun'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı ilçede, sırasıyla Şükrü Kanatlı İlköğretim Okulu, Barbaros Lisesi'nde tamamladı. 1993 yılında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğrenimini 1997 yılında başarıyla tamamladı. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. 1998-1999 Güz yarıyılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına kayıt oldu. Halen Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

