

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACİLLUS* SP. TÜRLERİNDE SİDEROFOR**
ÜRETİMİ ve *BACİLLUS CEREUS* DSM 4312'DE
SİDEROFOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

ENİS GÜNEY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2014

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS* SP. TÜRLERİNDE SİDEROFOR
ÜRETİMİ ve *BACILLUS CEREUS* DSM 312'DE
SİDEROFOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

ENİS GÜNEY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE

2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.01.2014. tarih ve 2014/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/02/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Enis GÜNEY'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Doç Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Doç. Dr. Mehmet Salim ÖNCEL

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bakteriler, diğer organizmalarda olduğu gibi birçok biyolojik süreçte kullanmak ve hücresel yaşamın devamlılığı için demire ihtiyaç duymaktadırlar. Demir yeryüzünde çok miktarda bulunmasına rağmen biyolojik pH'da aerobik şartlar altında, çözünmeyen oksihidroksit polimer yapıda bulunmalarından dolayı kullanılamamaktadır. Birçok bakteri demir ihtiyacını karşılayabilmek için siderofor adı verilen düşük molekül ağırlıklı molekülleri sentezler ve salgırlar. Hücre dışında oluşan Fe-siderofor kompleksi, özelleşmiş reseptörler olarak davranan dış membran proteinleri tarafından hücreye alınırlar. Sideroforların biyosentezi ve salgılanması sıkı bir şekilde çevresel faktörler ile düzenlenmektedir.

Bu tez çalışmasında, bazı *Bacillus* türlerinde siderofor üretiminin tespiti ve *Bacillus cereus* DSM 4312 tarafından siderofor üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır. Tüm suşlarda CAS agar plate üzerinde siderofor üretimi gözlenmiştir. Ancak CAS sıvı deneyleri sonucunda sadece *Bacillus cereus* DSM 4312 suşunda siderofor üretimi saptanmıştır. *Bacillus cereus* DSM 4312 için Csaky deneyi pozitif sonuç vermemiştir fakat Arnow testi katekol tipi siderofor için pozitif sonuç vermiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 maksimum siderofor üretimi 1 μ M FeCl₃ varlığında 48. saatte % 35,2 olarak tespit edilmiştir. Siderofor üretimi için optimum pH 6,5, optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir. C kaynağı olarak 1,5 M glikoz hücre büyümesini olduğu gibi siderofor üretimini de teşvik etmiştir. En yüksek demir absorpsiyonunu (%63), 1 μ M FeCl₃ varlığında siderofor üretiminin de maksimum olduğu 48. saatte tespit edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu *Bacillus cereus* DSM 4312 tarafından siderofor üretiminde çevresel faktörlerin etkileri ile ilgili ilk rapordur.

Anahtar kelimeler: Sideroforlar, Siderofor üretimi, % Siderofor Birimi, Katekolat, Demir alınımı, Katekolat, Demir alınımı.

SUMMARY

Bacteria, as well as in other organisms requires iron to use in many biological processes and for the continuity of life. In spite of the abundance in nature, iron can not be used by bacteria since they are found as insoluble oxyhydroxide polymer structure under aerobic conditions at biological pH. To fulfil their iron requirements, many bacteria synthesize and excrete low molecular weight molecules known as siderophores. The iron-siderophore complexes which form outside the cells are then taken up by outer-membrane proteins acting as specialized receptors. Biosynthesis and secretion of siderophores is strictly regulated by environmental factors.

The aim of this thesis were to determine siderophore production of some *Bacillus* species and to optimisation of environmental conditions for maximum siderophore production by *Bacillus cereus* DSM 4312. All strains produced siderophores on CAS agar plate. However, with CAS liquid assay only *Bacillus cereus* DSM 4312 showed siderophore production. There was no positive result for Csaky's assay with *Bacillus cereus* DSM 4312 but Arnow's assay showed a positive result for catechol type siderophore. The maximum siderophore production was obtained 35,2% at 48 hours in the presence of 1 μM FeCl_3 . Optimum pH for siderophore production was 6.5, while optimum temperature was 37°C. As a carbon source, 1.5 M glucose induced siderophore production as well as cell growth. The highest iron absorption (63%) was determined in the presence of 1 μM FeCl_3 at 48. hours which was also time for the maximum siderophore production. To the best of our knowledge this is the first report on effects of environmental factors on siderophore production by *Bacillus cereus* DSM 4312.

Keywords: Siderophore, Siderophore Production, % Siderophore Units, Catecholate, Iron Uptake.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi arz ederim.

Tez çalışmamda önemli yeri olan optik emisyon spektrometresi ile hücre sel demir alınıminin saptanması analizlerimizi yapabilmemiz için gerekli laboratuvar koşullarını sağlayarak destek olan GYTE Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mehmet Salim ÖNCEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamızda kullandığımız bakteri suşlarının teminini sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER, Dr. Mine GÜL ŞEKER ve Raci KELEŞ'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her konuyu danışabildiğim, her zaman desteğini ve sonsuz sabrını gördüğüm Dr. Güler TOPRAK ve Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY'a, Her türlü sıkıntımı ve mutluluğumu paylaştığım yardım ve dostluklarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım; Bahadır AYDIN, Ahmet TÜLEK, Şerif YILMAZ, Gözde GÖRGÜLÜ, Elif SIRMA, Tuba KORKMAZ, Zişan ASAL KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca pek çok konuda desteğini gördüğüm her türlü sıkıntımı ve mutluluğumu paylaşabildiğim çok kıymetli dostum Ziraat Yüksek Mühendisi Berk ÜNAL'a çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca aldığım her kararında yanımda olan, sevgisini benden esirgemeyen, maddi manevi yaptıkları yardım ve desteklerin değerini ifade edilebilceği bir kelimenin bulunmadığına inandığım değerli ailem; Ali GÜNEY, Aysel GÜNEY, Elif GÜNEY, Esra GÜNEY'e, Tez çalışmalarım sırasında kaybettiğim hayat felsefesini örnek edindiğim anneannem Münnevver DEMİRCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. DEMİRİN BAKTERİLER İÇİN ÖNEMİ	3
2.1. Bakteriyel Demir Kazanımı Mekanizmaları	3
2.1.1. Ferrik Demir Alınımı	3
2.1.2. Hem'den Yararlanarak Demir Alınım Mekanizması	4
2.1.3. Demir Bağlanma Proteinlerinden Demir Alınımı	5
2.1.4. Sideroforlar	5
3. SİDEROFOR YAPI VE İŞLEVLERİ	7
3.1. Kimyasal Yapılarına göre Siderofor Grupları	8
3.1.1. Hidroksamatlar Sideroforlar	10
3.1.2. Katekolat (Fenolat) Sideroforlar	10
3.1.3. Karboksilat Sideroforlar	11
3.1.4. Karışık Ligant Sideroforlar	11
3.2. Siderofor Biyosentezi	12
3.2.1. Bacillibaktin Sentezi	15
3.3. Bakterilerde Siderofor Taşıma Sistemleri	18
3.4. Siderofor Üretiminin Genetik Regülatörü	19
3.5. Sideroforların Uygulama Alanları	21
3.5.1. Sideroforların Tıbbi Uygulamaları	21
3.5.2. Sideroforların Tarımsal Uygulamaları	21
3.5.3. Sideroforların Çevresel Uygulamaları	22

3.6. Denizel Ekosistemlerde Sideroforlar	23
3.7. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar	25
3.7.1. Actinomicetesler	25
3.7.2. Mantarlar	25
3.7.3. Algler	25
3.7.3. Bakteriler	26
3.8. <i>Bacillus</i> Türlerinin Özellikleri	26
3.8.1. <i>Bacillus cereus</i>	27
3.8.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
4.1. Gereçler	30
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	30
4.1.2. Kullanılan Besiyerleri	30
4.1.3. Kullanılan Solüsyon ve Çözeltiler	33
4.1.4. Kullanılan Cihazlar	37
4.1.5. Kullanılan Bakterileri Türleri	38
4.2. Yöntemler	38
4.2.1. Siderofor Tespiti	38
4.2.1.1. Chrome Azurol S Agar Deneyi	38
4.2.1.2. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi	39
4.2.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi	40
4.2.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi	40
4.2.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi	41
4.2.3.1. Arnow Testi	41
4.2.3.2. Csaky Testi	41
4.2.4. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu	42
4.2.4.1. Farklı Demir Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi	42
4.2.4.2. Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi	42
4.2.4.3. pH'ın Siderofor Üretimine Etkisi	43
4.2.4.4. Farklı Karbon Kaynaklarının Siderofor Üretimine Etkisi	43
4.2.4.5. Farklı Glikoz Konsantrasyonlarının Siderofor	44

Üretimine Etkisi	
4.2.4.6. İnokülasyon Miktarının Siderofor Üretimine Etkisi	44
4.2.5. Hücresel Demir Alınımının Saptanması	45
5. BULGULAR	46
5.1. Siderofor Tespiti	46
5.1.1. Chrome Azurol S Agar Deneyi	46
5.1.2. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi	49
5.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi	50
5.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi	50
5.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi	51
5.4. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu	53
5.4.1. Farklı Demir Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi	53
5.4.2. Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi	54
5.4.3. pH'ın Siderofor Üretimine Etkisi	54
5.4.4. Karbon Kaynaklarının Siderofor Üretimine Etkisi	55
5.4.5. İnokülasyon Miktarının Siderofor Üretimine Etkisi	57
5.5. Hücresel Demir Alınımının Saptanması	58
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
Da	: Dalton
dk	: Dakika
G	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
pM	: Pikomolar
s	: Saat
μM	: Mikromolar
A	: Absorbance
aa	: Amino asit
ABC	: Atp-binding cassette
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
Ar	: Absorbance Reference
Arg	: Arjinin
As	: Absorbance Sample
ATP	: Adenozin trifosfat
C	: Kondensasyon
CAS	: Chrome azurol sulfonate
Cy	: Siklizasyon
DFB	: Desferrioksamin B
DHB	: Dihydroxybenzoate
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Epimeraz
Fur	: Ferric uptake repressor

HDTMA	: Hexadecyltrimethylammonium
L-fOHOrn	: L-formyl-hydroxyornithine
Lys	: Lizin
MFS	: Major facilitator superfamily
MM9	: Minimal medium 9
MT	: Metil transferaz
NIS	: Non-ribozomal bağımsız peptid sentetaz
NPRSs	: Nonribozomal peptid sentetaz
OD	: Optical density
P	: Peptidil-taşıyıcı
PBP	: Periplazmik siderofor bağlayıcı protein
PEP	: Fosfoenolpiruvat
PIPES	: Piperazinediethanesulfonic acid
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolutions per minute
SAM	: S-adenozil metionin
Ser	: Serin
SU	: Siderophore Units
TBDT	: TonB-dependent transporters
TCA	: Trikarboksilik asit
TE	: Tiyoesteraz
Thr	: Treonin
Zur	: Zing uptake repressor

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Demir kazanım mekanizmaları a. Direk demir alınımı b. Hem'den yararlanarak demir alınımı birinci sistem c. Hem'den yararlanarak demir alınım ikinci sistem d. Demir bağlanma proteinlerinden demirin alınımı e. Sideroforlar	6
3.1: Çeşitli sideroforların kimyasal yapıları	8
3.2: Ferrikrom tipi sideroforun kimyasal yapısı	10
3.3: Vibriobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	11
3.4: Mikobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	11
3.5: Yersiniabaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı	12
3.6: Piyoverdin biyosentezi	13
3.7: Bacillibaktin biyosentezi a) Bacillibactin sentezi b) sentezden sorumlu gen kümeleri	17
3.8: Sideroforların hücre içine alınımı	19
3.9: Fur proteininin çalışma mekanizması	20
3.10: Sideroforların hücre içine taşınımı ve fur proteininin sistemdeki rolü	20
3.11: Sideroforlar aracılığı ile pas giderimi a. Paslı demir içeren materyal b. Siderofor sonrası aynı materyalde pas giderimi	23
3.12: <i>Bacillus cereus</i> ve <i>Bacillus thuringiensis</i> türlerinin filogenetik ağacı	29
3.13: <i>Bacillus cereus</i> DSM 4312 suşunun filogenetik ağacı	29
4.1: Optik emisyon spektrometresi	45
5.1: Chorome azürol s agar deneyi sonuçları a) Kontrol b) <i>Bacillus cereus</i> /B. <i>thuringiensis</i> 235/İK3 c) <i>Bacillus cereus</i> /B. <i>thuringiensis</i> A77/K-1 d) <i>Bacillus cereus</i> DSM 4312 e) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PO1	47
5.2: CAS agar üzerinde zamana bağlı siderofor üretimi	48
5.3: Chrome azürol s sıvı deneyi sonuçları a) Kontrol b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PO1 c) <i>Bacillus cereus</i> /B. <i>thuringiensis</i> 235/İK3 d) <i>Bacillus cereus</i> /B. <i>thuringiensis</i> A77/K-1 e) <i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	49

5.4:	Zamana bağlı siderofor üretiminin değişimi	51
5.5:	Arnow testi sonuçları a) Birinci aşama b) İkinci aşama	52
5.6:	Demir konsantrasyonlarının siderofor üretimine etkisi	53
5.7:	Sıcaklığın siderofor üretimine etkisi	54
5.8:	pH'ın siderofor üretimine etkisi	55
5.9:	Karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi	56
5.10:	Glikoz konsantrasyonlarının siderofor üretimine etkisi	57
5.11:	İnokülasyon miktarının siderofor üretimine etkisi	58
5.12:	Demir konsantrasyonlarına ve zaman bağlı demir alınımı	59
5.13:	Demir absorpsiyonunun siderofor üretimi ile karşılaştırılması	59
5.14:	Farklı demir konsantrasyonlarında büyümeye bağlı demir absorpsiyonu	60

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Bazı mikroorganizmalarda görülen siderofor tipleri	9
5.1: Siderofor üretiminin CAS agarda derecelendirilmesi	48
5.2: CAS sıvı deneyinde siderofor üretiminin derecelendirilmesi	50

1. GİRİŞ

Demir, hemen hemen tüm canlı hücreler için en önemli mikroelementlerden biridir. Demir, fotosentez, oksijen salınımı, solunum, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü, gen regülasyonu, nitrat sentezi, azot fiksasyonu, ATP sentezi ve DNA sentezi gibi biyolojik süreçlerde özellikle kofaktör olarak birçok metabolik işlemlerde düzenleyici rol oynamaktadır [Ratledge and Dover, 2000], [Skaar, 2010], [Hammer and Skaar, 2011]. Demir, yeryüzünde yüksek oranda bulunmasına rağmen biyolojik pH'da oksik şartlarda genelde çözünmemiş olan ferrik demir (Fe^{+3}) formunda bulunmaktadır. Bu sebeple, doğada canlılar tarafından kullanılabilir olan çözünmüş demir miktarı oldukça sınırlıdır. Mantarlar ve alglerde olduğu gibi birçok bakteriler, demir stresi altında çözünmemiş formdaki demiri hücre bünyelerine alıp kullanılabilir forma dönüştürmek için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Mikroorganizmaların demir ihtiyaçlarını karşılayabilmek için geliştirdiği demir kazanım mekanizmalarından biri de Fe^{+3} şelatlayıcı siderofor molekülleridir.

Sideroforlar, hücre dışına salgılanan düşük moleküler ağırlıklı (400-1500 Da), ribozomal olmayan peptitlerdir. Demir stresi altında hücre dışına salgılanan sideroforlar çevredeki Fe^{+3} bağlandıktan sonra aktif taşıma ile hücre içine alınırlar [Kraemer, 2004]. Siderofların yapısı türler arasında oldukça büyük değişiklikler göstermektedir. Şimdiye kadar yaklaşık 500 siderofor değişik mikroorganizmalardan izole edilmiştir [Boukhalfa and Crumbliss, 2002]. Birçok farklı yapıdaki sideroforlar genellikle hidroksamatlar ve catecholate gibi iki yapısal grupta sınıflandırılırlar. Yapısal farklılıklarına rağmen hepsi Fe^{3+} için altı bağlanma koordinatları ile bir oktahedral kompleksi oluştururlar.

Mikroorganizmaların yaşamlarının sürdürülmesinde ve ekosistemin iyileştirilmesinde önemli rol oynayan sideroforların, başta klinik ve tarım olmak üzere birçok alanda uygulanabiliği bu sekonder metabolitlerin önemini daha da arttırmaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas*

aeruginosa PO1 tarafından üretilen sideroforların tespiti ve *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin siderofor üretimini etkileyen çevresel şartların optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamız, siderofor üretiminin CAS metodu ile belirlenmesinin ardından *Bacillus cereus* DSM 4312 suşunun maksimum siderofor üretimi için optimum siderofor üretim zamanı, demir konsantrasyonu, sıcaklık, pH, karbon kaynakları ve inokülasyon oranlarının belirlenmesini içermektedir. Yaptığımız literatür taramalarına göre bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Bacillus cereus* tarafından üretilen siderofor için optimizasyon çalışması yer almamaktadır dolayısıyla bu çalışma literatür açısından bir ilk oluşturmıştır.

2. DEMİRİN BAKTERİLER İÇİN ÖNEMİ

Demir tüm mikroorganizmaların büyüebilmesi gerekli olan bir iz elementidir. Mikroplar optimum olarak büyüebilmek için besi ortamında 0.4-1.0 μM demire ihtiyaç duyarlar [Neiland, 1981].

Demir elementi primer metabolizma enzimleri için gerekli olduğundan birçok organizma için demir alınımı gerekli bir işlemdir. Yaşayan birçok organizma demire redoks reaksiyonlarında yer alan kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadır. Hücresel düzeyde demir, fotosentez, H_2 üretimi, nitrit hidroksilasyon, sitrik asit döngüsü, oksijen transportu, gen regülasyonu, DNA biyosentezi ve serbest radikallerin detoksifikasyonu gibi önemli biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Diğer organizmalarda olduğu gibi bakteriler de biyolojik süreçlerde kullanmak üzere hücresel yaşamın devamlılığı için demire ihtiyaç duymaktadır. Bakteriler demiri çevresel ortamdan taşıyıcı sistemleri ile sağlamaktadır. Demir yer kabuğunda fazla bulunan elementlerden birisi olmasına rağmen; toprak veya deniz gibi birçok ekolojide Fe^{+3} iyonunun çok düşük çözünürlüğünden dolayı alınımı sınırlı olmaktadır. Demir iki stabil oksidasyon değişimi basamağına sahiptir bunlar Fe^{+2} ve Fe^{+3} tür. Oksijenden yoksun şartlarda demir genelde Fe^{+2} yükseltgenme halindedir ve suda çözünmektedir. Ancak, oksijenin bol olduğu şartlarda, demir genelde Fe^{+3} yükseltgenme halinde olur ve suda çözünmez mineraller oluşturmaktadır. Fe^{+3} iyonlarının nötral pH'da da çözünürlükleri çok düşüktür ve dolayısıyla organizmalar tarafından kullanılamamaktadır. Oldukça kararsız olan Fe^{+3} 'ün, demir (III) oksit denilen ferrik oksite (Fe_2O_3) dönüşme eğilimi vardır. Ferrik oksit, oksijeni bol bir ortamda demirin yakılmasıyla elde edilmektedir. Fe_2O_3 moleküllerinden oluşan bu madde “pas” olarak isimlendirilmektedir [Madigan and Martinko, 2005]. Bakteri fungus ve bitkiler demir kazanımı için birçok mekanizma kullanmaktadırlar.

2.1. Bakteriyel Demir Kazanım Mekanizmaları

2.1.1. Direkt Demir Alınımı

Ferrik demirin çözünmüş formu olan Fe^{+2} hiç bir spesifik dışsal mebran reseptörüne ihtiyaç duymadan porlar vasıtası ile organizma tarafından kolayca difüze

edilebilir Fe^{+2} 'nin alınımı daha önce bir çok bakteri türünde gösterilmiştir [Hosokawa and Stanier, 1966], [Eppink et al., 1998], [Eppink et al., 1999]. Bu mekanizmada demir ABC taşıyıcıları içeren sitoplazmik mebran boyunca taşınmaktadır (Şekil 2.1). Bakteriyel yaşamı desteklemek için ihtiyaç duyulan miktardaki demirin sadece ferrik demirin alınımı yoluyla sağlanamayacağı açıktır. Bundan dolayı birçok bakteri bu tip değerli nutrientleri elde etmek için diğer demir alımın metotlarını kullanmaktadırlar [Kathleen, 2007].

2.1.2. Hem'den Yararlanarak Demir Alım Mekanizması

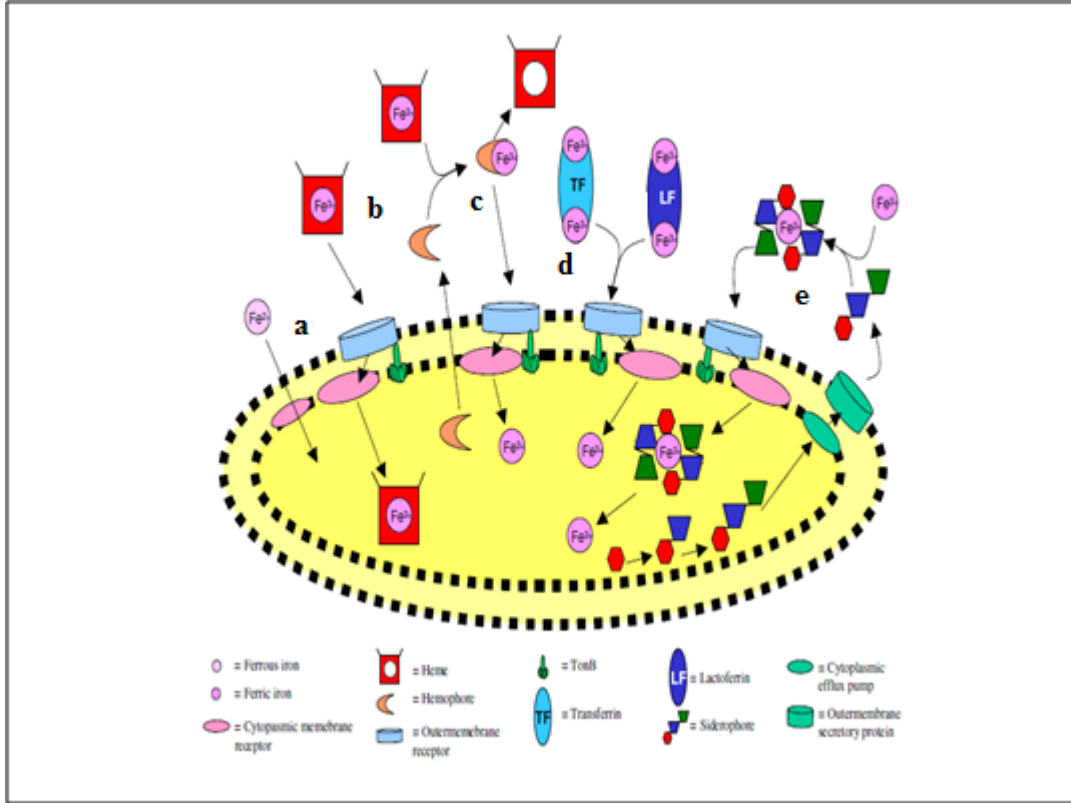
Hem, eritrositlerde bulunan ve kana kırmızı rengini veren hemoglobinin yapısında bulunan bir moleküldür. Oksijen molekülü hem yapısındaki Fe^{+2} 'ye bağlanarak taşınır. Konakçı organizmada hem, hemolizle veya epitel hücrelerden kaynaklanarak salınmaktadır [Stehr et al., 1998]. Birçok bakteriyel organizma çevresindeki hem ya da hemoglobinden yararlanmaktadırlar. Daha önceki araştırmalar sonucunda *Pseudomonas aeruginosa*'nın iki farklı hem'den yararlanma mekanizması ortaya konulmuştur [Higgins et al., 1994]. Birinci sistem hem için dışsal mebran reseptörü ve ABC transporturu içerir. Bu sistem *phu* lokusu içeren genler tarafından kodlanmaktadır. İkinci sistem ise demirin alınması için seçici olarak hem'e bağlanan bir hemofor, özelleşmiş bir ekstraselüler protein ve *has* lokusu tarafından kodlanan genlerden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Kolera etmeni olarak bilinen *Vibrio cholerae* eritrositleri lizize etmek için hemolizi tetikler ve hem'i serbest bırakır [Eppink et al., 1999]. Genel olarak hemolizin sentezi ve salgılanması çevresel demir konsantrasyonu ile düzenlenmektedir. *Hemophilus influenzae* aerobik koşullar altında ve enfeksiyonlar esnasında hem'e çok yüksek bir ihtiyaç duymaktadır [Stehr et al., 1999]. Bunun dışında hem'den yararlanan: *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* ve *Escherichia coli* O157 bakterileri de literatürde gösterilmiştir [Thariathet al., 1993], [Stehr et al., 1999], [Eppink et al., 1997], [Schreuder et al., 1988].

2.1.3. Demir Bağlanma Proteinlerinden Demirin Alınımı

Çevreden demirin alınımına dair diğer bir direk metotta transferrin ve laktoferrin gibi proteinler ile demirin bağlanmasıdır. Transferrin serum ve lenfte işlev görürken laktoferrin fagositik hücrelerde ve mukozal salgılarda bulunmaktadır. Birçok patojenik bakteride bu iki proteine bağlı olan demir alım sistemleri vardır (Şekil 2.1). *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* bu iki tip sistemi de demir alımını için kullanmaktadırlar [Thariath et al., 1993], [Stehr et al., 1998], [Eppink et al., 1999]. Bazı bakteriler sadece transferrini kullanırken (*Staphylococcus aureus* ve *Haemophilus influenzae*) bazıları da sadece laktoferrini kullanmaktadırlar (*Mycoplasma pneumoniae* ve *Trichomonas vaginalis*) [Thariath et al., 1993], [Eppink et al., 1999], [Stehr et al., 1998], [Stehr et al., 1998]. *Listeria monocytogenes* transferrin için Fe^{+3} 'ten Fe^{+2} 'ye demir bağını indirgerler ve demir alımını için demir-transferrin kompleksini ayrılmasını uyarırlar [Stehr et al., 1998]. Bu tip sistemlerin hepsi patojenin konakçıya saldırabilmesi ve kolonize olabilmesi için oldukça önemlidirler. Bu sistemlerin sınırlı olması patojenitenin etkisinin azalmasına sebep olmaktadır. [Eppink et al., 1995].

2.1.4. Sideroforlar

Mantar, alg ve yüksek yapılı bitkilerde olduğu gibi birçok bakteri türünde ortamdaki demir iyonlarını bağlamak amacı ile biyolojik şelatlayıcı bileşikler kullanmaktadırlar. Bu bileşiklerden en önemlilerinden biri de sideroforlardır. Sideroforlar demiri yüksek afinite ile bağlayıp, hücre bünyesinden salgılanan sekonder metabolitlerdir [Neilands, 1995], [Miller, 2008]. Sideroforlar düşük moleküller ağırlıklı (500-1000 Da) organik bileşikler olup biyosentezleri yetersiz demir seviyesiyle ($<10^{-5}$ mol/l) tetiklenerek gerçekleştirilmektedir [Neiland, 1981], [Neilands, 1995]. Sideroforlara bağlanan demir hücre içini alınması için aktif transport meknizmasını kullanmaktadır. Sideroforların aynı zamanda alüminyum, galyum, krom, bakır, çinko, kurşun, manganez, kadmiyum gibi diğer metallere bağlanma yeteneği olduğu ancak daha düşük afiniteler ile bağlayıp hücre bünyesine alındığı tespit edilmiştir [Neilands, 1995], [Miller, 2008], [Cornelis and Andrews, 2010] (Şekil 2.1)



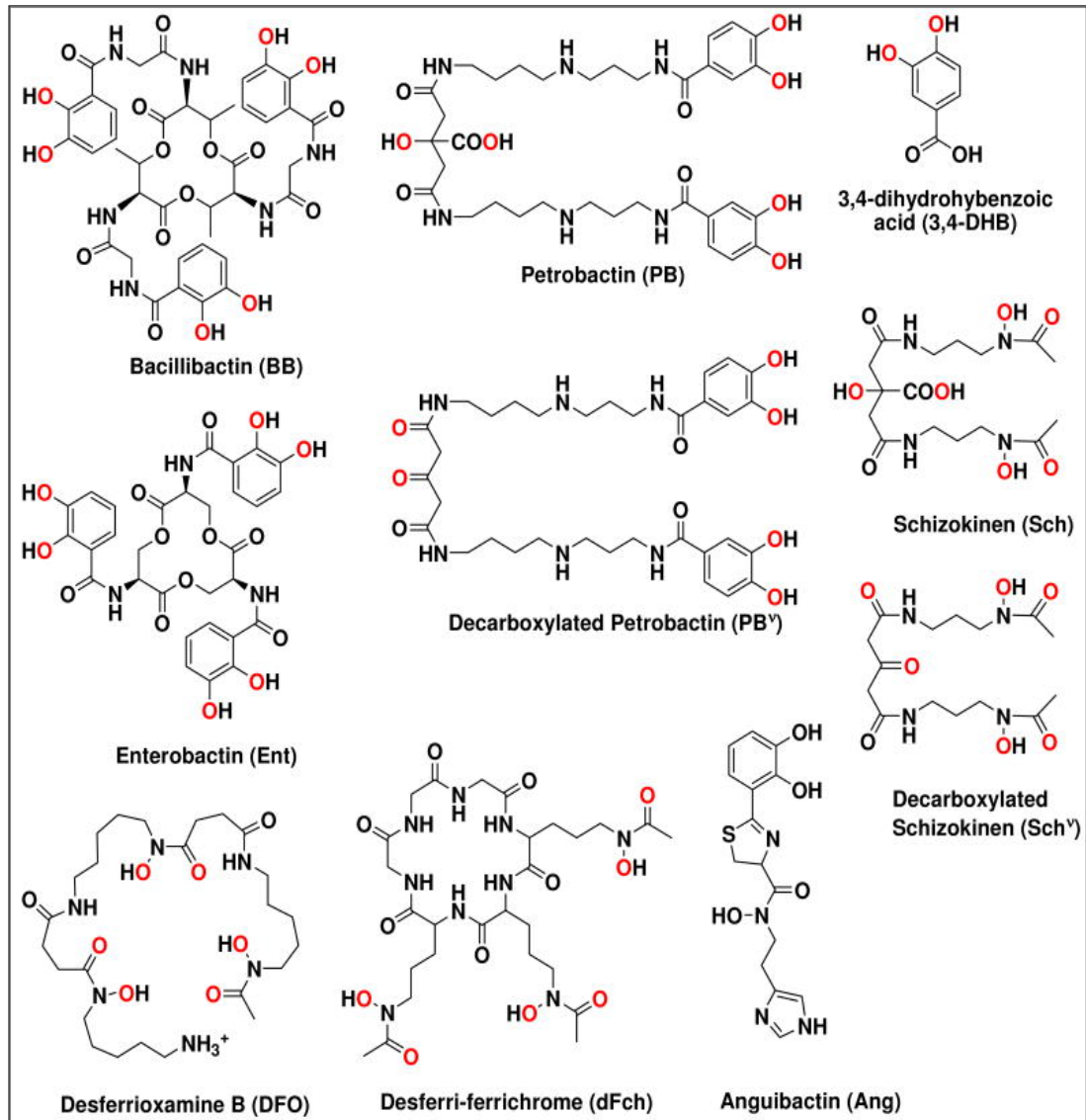
Şekil 2.1: Demir kazanım mekanizmaları a) Direk demir alınımı b) Hem'den Yararlanarak Demir Alınımı birinci sistem c) Hem'den Yararlanarak Demir Alınım ikinci sistem d) Demir Bağlanma Proteinlerinden Demirin Alınımı e) Sideroforlar.

3. SİDEROFOR YAPILARI VE ÖNEMİ

Kimyasal anlamda, siderofor (Yunanca demir taşıyıcı) demirin yetersiz bulunduğu ortamda ökaryotik, prokaryotik ve yüksek organizmalar tarafından salınan düşük molekülağırlıklı metal şelat bileşiklerdir [Miethke and Marahiel, 2007]. İlk çalışmalarda siderofor; siderokrom, sideramin, sideromisin ve ionofor olarak kullanılmaktadır. Ancak, artık bu terimler Yunancada sideros: demir ve phores: taşıyıcı anlamına gelen siderofor terimi ile yer değiştirmiştir [Thomashow and Weller, 1995].

Sideroforlar doğadan başka yerde bulunmayan pek çok değişik amino asitleri yapısında bulunduran 400-1500 Da moleköl ağırlığındaki demir bağlayan proteinlerdendir. Siderofların yapısı türler arasında oldukça büyük değişiklikler göstermektedir. Şimdiye kadar yaklaşık 500 siderofor değişik mikroorganizmalardan izole edilmiştir [Boukhalfa and Crumbliss, 2002].

Bazı fungus ve bakteriler tarafından üretilen sideroforlara örnek olarak ferrikrom (*Ustilago sphaerogena*), enterobaktin (veya enterokelin) (*Escherichia coli*), mikobaktin (*Mycobacterium*), enterobaktin ve basillibaktin (*Bacillus subtilis*), ferrioksamin B (*Streptomyces pilosus*), fusarinin C (*Fusarium roseum*), yersiniabaktin (*Yersinia pestis*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*), azotobaktin (*Azotobacter vinelandii*), psödobaktin (*Pseudomonas B 10*), eritrobaktin (*Saccharopolyspora erythraea*) ve ornibaktin (*Burkholderia cepacia*) sayılabilir [Miethke and Marahiel, 2007]. Bazı siderofor tiplerinin kimyasal yapıları şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Çeşitli sideroforların kimyasal yapıları.

3.1. Kimyasal Yapılarına göre Siderofor Grupları

Mikroorganizmalar farklı kimyasal özellikte yüzlerce siderofor üretmektedir [Ratledge and Dover, 2000]. Sideroforlar demir iyonlarına bağlanmadan önce kararlı bir formdadır. Demir iyonları (Fe^{+3}) ile karşılaşan oktahedral (düzgün sekizyüzlü) yapıdaki bir siderofor, demir kompleksi oluşturarak ona kuvvetli bir şekilde bağlanır. Daha sonra mikraoorganizmalar, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye dönüştürerek sideroforlar aracılığı ile demirin alınımını sağlarlar [Miethke and Marahiel, 2007]. Hücre dışında bulunan sideroforların hücre içine tekrar geri alınması için hücre zarında özel reseptörler

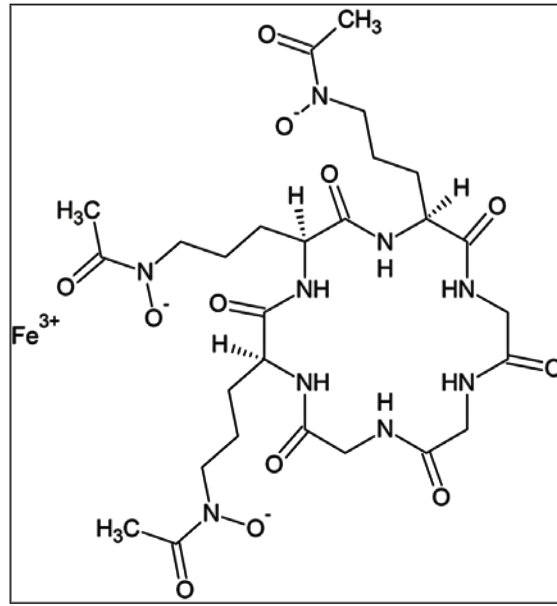
bulunur. Demir ile kompleks oluşturan sideroforlar bu reseptörler tarafından tanınır ve bu reseptörlere bağlanarak hücre zarının içinden çeşitli taşıma mekanizmaları ile hücre içine taşınırlar [Martinez et al., 2003], [Raymond and Denz, 2004]. Fe^{3+} 'ün hücre içinde indirgenmesinin ardından oluşan Fe^{+2} 'nin sideroforla zayıf bir yapı kazanması, demirin hücre içine salınmasını da kolaylaştırır. Sideroforlar çoğunlukla kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre hidroksamat, katekolat (fenolat) ve karboksilat (örneğin, sitrik asit türevleri) ve karışık ligantlar olmak üzere dört önemli gruba ayrılmıştır [Modi et al., 2012].

Tablo 3.1: Bazı mikroorganizmalarda görülen siderofor tipleri.

Sideroforun Kimyasal tipi	Siderofor	Mikroorganizma
Hidroksamat	Ferrikrom	<i>Ustilago sphaerogena</i>
	Desferrioksamin B	<i>Streptomyces pilosus</i>
	Desferrioksamin E	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	Fusarinin C	<i>Fusarium roseum</i>
	Ornibaktin	<i>Burkholderia cepacia</i>
Katekolat	Enterobaktin	<i>Escherichia coli</i>
	Bacillibaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus anthracis</i>
	Vibriobaktin	<i>Vibrio cholerae</i>
Karboksilat	Rhizobaktin	<i>Rhizobium meliloti</i>
	Rhizoferrin	<i>Rhizopus microspores</i>
	Staphyloferrin A	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Karışık ligant	Azotobaktin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Pyoverdin ve pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yersiniabaktin	<i>Yersinia pestis</i>
	Maduraferrin	<i>Acinomadura madurae</i>

3.1.1. Hidroksamat Sideroforlar

Bu grup sideroforlar bakteri ve mantarlar tarafından üretilir. Ferrikrom *Ustilago sphaerogena* mantarı tarafından üretilen ilk siderofordur. Bütün hidroksamatlar N^{δ} -acyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornitin içerirler [Van der Helm and Winkelmann, 1994]. Hidroksamat siderofor üç sekonder hidroksamat grup içerir ve her bir hidroksamat grup iki oksijen molekül sağlar. Bir siderofor demire bağlandığında 425 ile 500 nm arasında güçlü bir absorpsiyon gösterir [Messenger and Ratledge, 1985]. Hidroksamat sideroforlara örnek, Desferrioksamin B (deferoksamin), desferrioksamin E, fusarinin C, ornibaktin, enterobaktin, ferrioksamin ve ferrikromdur [Crosa and Walsh, 2002]. Hidroksamat tipi sideroforlara örnek olarak ferrikromun kimyasal yapısı şekil 2.3'te gösterilmiştir.

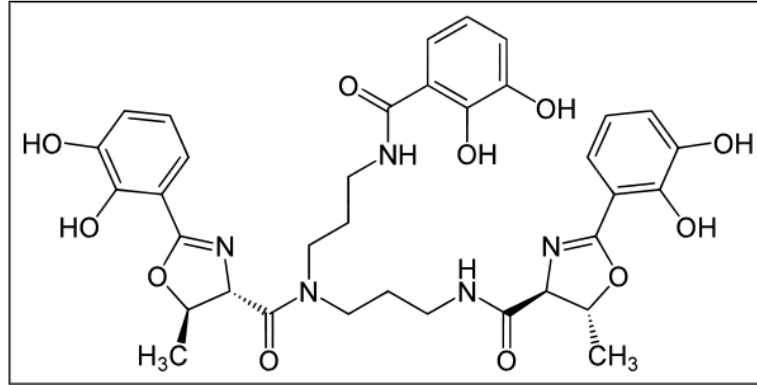


Şekil 3.2: Ferrikrom tipi sideroforun kimyasal yapısı.

3.1.2. Katekolat (Fenolat) Sideroforlar

Sideroforların en yaygın olan ikinci grubunu oluştururlar ve yalnızca belli bakteriler tarafından üretilmektedirler. Hidroksamat sideroforlarda olduğu gibi, katekolat sideroforlar da bir heksadentat oktahedral kompleksini oluşturmak için yapılarında iki oksijen atomu içerirler. Katekolat sideroforlar için en iyi örnekler bacillibaktin, enterobaktin, vibriobaktin, agrobaktin, pyochelin ve yersiniabaktindir

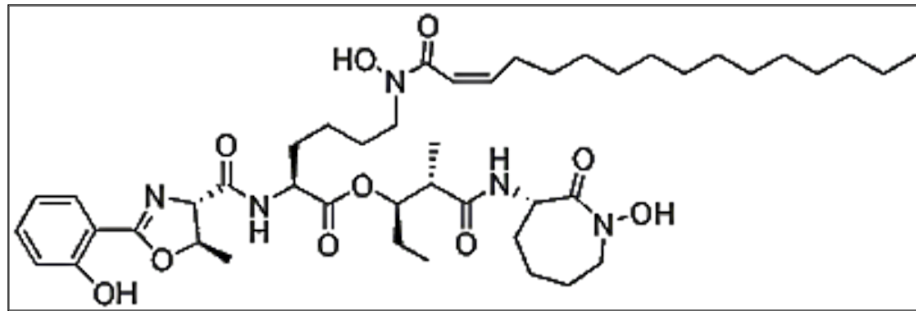
[Neilands, 1981]. Bir katekolat tipi siderofor olan vibriobaktinin kimysal yapısı şekil 2.4’te gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Vibriobaktin tipi sideroforun kimysal yapısı.

3.1.3. Karboksilat Sideroforlar

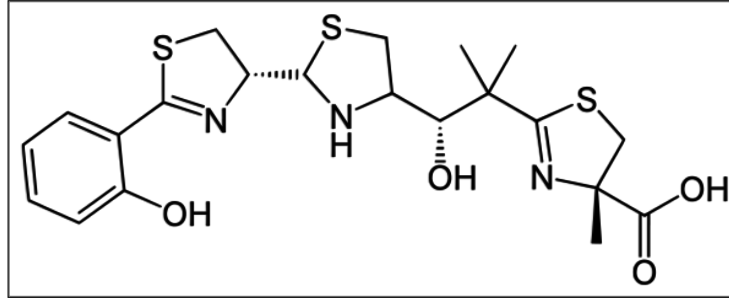
Bu gruptaki sideroforlar hidrosamat ve fenolat ligandlara sahip değildir. Fe^{3+} ’ü bağlamak için daha çok, α -hidroksikarboksilat ve karboksilat tarafından özel olarak elde edilirler. Karboksilat sideroforlara örnek, Staphyloferrin A, mikobaktin, rhizoferrin, petrobaktin, piyoverdin, azotobaktin ve ferribaktindir [Dave and Dube, 2000], [Jimenez et al., 2010]. Mikobaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Mikobaktin tipi sideroforun kimysal yapısı.

3.1.4. Karışık Ligant Sideroforlar

Bu grup sideroforlar karboksilat ve hidroksil gruplarını içerirler. Karışık ligand tipi sideroforlar heterosiklik şelatlama gruplarında ihtiva edebilirler. 55 yıl önce alüminyum kompleksinin kristalizasyonu ile izole edilen ilk siderofor olan mycobaktin, Gram-pozitif bir bakteri *Mycobacteria*'lar tarafından üretilmiştir [Francis et al., 1949]. *Nocardia*'lar tarafından üretilen bir başka siderofor türü olan karışık ligant siderfor nocobaktin, mycobaktinler ile oldukça benzer özellik ve yapı ihtiva etmektedir, nocobaktinler lipit içerisinde çözünebilir sideroforlardır ve bakterilerin lipit zengini kısımlarında lokalize olurlar Karışık sideroforlara örnek, mikobaktin, petrobaktin, azotobaktin, pyoverdin, yersiniabaktin ve maduraferindir [Modi et al., 2012], [Ratul, et al., 2012].

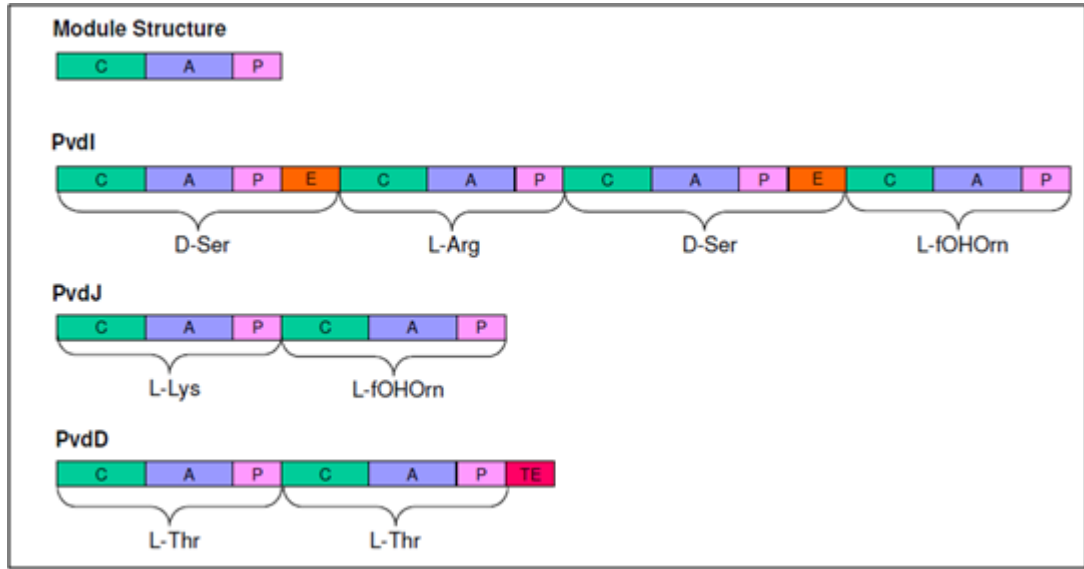


Şekil 3.5: Yersiniabaktin tipi sideroforun kimyasal yapısı.

3.2. Siderofor Biyosentezi

Siderofor biyosentezi iki farklı yolak ile açıklanmıştır. İlk yolakta, aminoasitler RNA kalıbına ihtiyaç duymadan direk olarak peptid bağları kurarlar. Bu bağlar çoklu fonksiyonel işlev görebilen proteinler olarak bilinen nonribozomal peptid sentetazlar tarafından gerçekleştirilir (NRPSs) [Crosa and Walsh, 2002]. Diğer yolak; NPRS-Bağımsız yolaktır. Bu yolakta amid yada ester bağlarıyla bağlanmış, amino-alkol veya diamin yapıtaşları ve dikarboksilik asitler bulunmaktadır. NRPS-Bağımsız yolaklar; aerobaktin, alcaligin, staphobaktin ve petrobaktin gibi hidroksamat ve karboksilat sideroforların sentezinde kullanılmaktadır [Challis, 2005], [Miethke et al., 2007].

NRPS-Bağımlı yollar ise enterobaktin, yersiniabaktin, pyochelin, pyoverdin, vibriobaktin ve mycobaktin gibi sideroforların üretiminde kullanılmaktadır [Crosa and Walsh, 2002], [Quadri, 2000], [Ackerley et al., 2003]. Bu tip yolların NRPS-Bağımsız olarak adlandırılmasının nedeni sentez esnasında kalıp olarak RNA kullanılmamasıdır. Bu yollarda aminoasitlerin peptid oluşturması esnasında tekli bir modül, kondensasyon (C), adenilasyon (A) ve peptidil-taşıyıcı (P) bölgeleri birlikte çalışırlar [Crosa and Walsh, 2002], [Fischbach et al., 2006]. Piyoverdin biyosentezi Şekil 3.6’de gösterilmiştir.



Şekil 3.6: Piyoverdin Biyosentezi.

Kondensasyon bölgesi 50 kDa luk bir kısımdır. Bu bölge zincir uzaması için peptid bağının kondensasyon bölgesini katalizlemektedir [Crosa and Walsh, 2002]. *Vibrio cholera*’daki vibriobaktin biyosentezinde kondensasyon bölgesi VibH olarak isimlendirilmiştir [Keating et al., 2002]. Bu fonksiyonel “C” bölgesi, her biri α - β - α sandviç bölgelerinden oluşan iki yapısal bölge içermektedir. “C” bölgesinin fonksiyonel bir modifikasyonu ise siklizasyon (Cy) bölgesi olarak adlandırılır [Crosa and Walsh, 2002]. “Cy” bölgesi “C” bölgesine benzer olarak peptid katalizler fakat ek olarak siklik sistein, serin veya treonin katalizlemektedir.

Bir diğer fonksiyonel bölge olan modül 50 kDa’luk adenilasyon bölgesidir, bu bölge amino veya aril asitleri seçip, aktive ederek bir ATP- bağımlı yolla peptid oluşturur [Crosa and Walsh, 2002]. Bu aktivasyon aminoasit- AMP’yi oluşturur ve peptidil- taşıyıcı bölgeye transfer edilir. PheA yapıları antibiyotik gramisidin ve

Bacillus subtilis' de belirlenmiş olan bir aril asit olan 2,3 dihydroxybenzoate (DHB)'ı aktive eden DhbE' nin birleştirilmesi için fenilalanini aktive eder [Conti et al., 1997], [May et al., 2002]. Adenilasyon bölgeleri firefly lusiferaz ile benzer yapıya sahiptir ve iki yekpare yapısal bölge içermektedir.

NRPS'ler için son fonksiyonel bölge, peptidil-taşıyıcı bölge veya aril asitler kullanıldığında aril- taşıyıcı bölge olarak isimlendirilir [Crosa and Walsh, 2002]. Bu 8-10 kDa'luk küçük bölgeler fosfopantetionil (pPant) bir kuyruğun eklenmesi ile farklılaşmış post- transkripsiyonel olması gereken korunmuş bir serin dizisi içermektedir. Fosfopantetionil kuyruk aktive olmuş aminoasit-AMP'ye kovalent olarak bağlanır ve uzayan zincir için bir iplik gibi görev alır. Kuyruk, fosfopantetionil transferaz (PPTase) tarafından peptidil- taşıyıcı bölgeye bağlanır. PPTase'lar birincil ve ikincil metabolizmada içerilir ve genellikle her bir yolak için belirgindirler. Siderofor üretimi için PPTase'lar *Bacillus subtilis*'lerdeki Sfb' ler gibi, *Y. pestis*'lerdeki YbtD gibi çeşitli bakteriler için belirlenmiştir [Quadri et al., 1998][Bobrov et al., 2002]. Buna karşın, *P. aeruginosa* primer ve sekonder metabolizmasının her ikisinde de sadece bir PPTase (PcpS) içermektedir [Barekzi et al., 2004].

Üstte bahsedilen bölgelere ek olarak NRPS modüllerinde üç gerekli fonksiyonel modül daha vardır. Uzayan peptidin modifiye edilmesinde ek olarak bir grup bölge mevcuttur. Bunlar, epimeraz (E), metil transferaz (MT) ve tiyoesteraz (TE) bölgelerdir [Crosa and Walsh, 2002]. Epimerizasyon bölgeleri, L- aminoasitleri, D- aminoasitlere çevirmektedir. Metil transferaz bölgeleri ise metil donörü olarak s-adenozil metionin (SAM) kullanarak aminoasitleri metile etmektedirler. Tiyoesteraz bölgeleri ise zincir uzamasını bitirir ve hazır sideroforu serbest bırakır. Bazı bakteriler sideroforu farklılaştırmak için bazı yardımcı proteinler içermektedirler. *P. aeruginosa* ve *Yersinia* spp., bir tiazolidin halkasının içinde yersiniabaktin ve pyochelinin ikincil tiyazolin halkasını çeviren bir NADPH-bağlı redüktaz kullanırlar [Reimann et al., 2001], [Geoffroy et al 2000].

P. aeruginosa'da pyoverdin ve pyochelin biyosentezi NRPS-bağlı bir yolaktır ve bu yolak ne kadar farklı sideroforların oluşturduğunu göstermektedir. Yersiniabaktinin oluşum yolağı, pyocheline çok benzemesine rağmen, hibrit bir sistem kullanmaktadır yani bu yolak, NRPS- bağlı ya da NRPS- bağımsız sistemlerin ikisini birden içermektedir [Kathleen, 2007].

3.2.1. Bacillibaktin Sentezi

Bacillus cereus türü bakterilerin bacillibaktin ve petrobaktin tipi siderofor ürettiği bilinmektedir. Her iki tipte katekol kimyasal yapısına sahip sideroforlardır. Tüm sideroforlar tamamen (bacillibaktin) veya kısmen (petrobaktin) dihydroxybenzoate (DHB) ünitelerine bağlıdır. Her iki durumdada moleküller, demiri bağlama ve çözmek için yeteneklidir. Genetik, biyokimyasal ve patojenik çalışmalar bu sideroforlar önemli biyolojik fonksiyonlarda rol oynadığını göstermiştir [Hotta et al.,2010].

Adından da anlaşılacağı gibi bacillibaktin ilk olarak *Bacillus subtilis* kültürlerinde keşfedilmiştir [May et al., 2001]. Bu sideroforlar, glisin, treonin ve DHB'den oluşan siklik trimer yapısından meydana gelmektedir. Katekolat tipi sideroforların çoğu gibi bacillibaktinlerde 2,3-dihydroxylatedbenzoyl (2,3-DHB), metalin etkili biçimde şelasyonu için iyi bir sığınaktır. Çoğu siderofor gibi bacillibaktinler non-ribozomal peptid sentetaz (NRPSs) ile sentez edilirler. Marahiel ve arkadaşları bacillibaktinin biyosentezinden sorumlu enzimleri ortaya çıkarmışlardır (Şekil 3.7 B.).

Bacillibaktin biyosentezini sağlayan gen dizisi *fur* adı verilen tek bir operonun düzenlemesi altındadır (Şekil 3.7.b.1). Bu dizi *mtbH* adı verilen bir gen kümesi daha içerir. Bu genlerin fonksiyonu henüz belirsiz olmasıyla birlikte aril-iltiva eden doğal ürünlerin biyosentezinde NRPS'ye yardım ettiği düşünülmektedir [Drake et al., 2007]. Sentezden sorumlu olan *sfp* geni 4'-fosfopantetheinil transferaz enzimini kodlar ve bu enzim post-tranlasyonel modifikasyonlar için önemlidir. Major facilitator superfamily (MFS)-type effluxtransporterını, ubiC ise korismat pürivat liaz enzimini kodlamasına rağmen yine bu genin biyosentezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir [Siebert et al., 1994]. Bacillibaktin tipi sideroforların demire bağlanma afinitesi $K_f = 10^{47.6}$ dır. Bu değer memelilerde bulunan demir depolayan büyük molekülerden (transferrin, laktoferrin) daha yüksektir [Dhungana et al., 2004], [Dhungana et al 2005], [Ratledge and Dover, 2000].

Bacillibaktin üretimi tümüyle ilk olarak *Bacillus anthracis* ve *B. cereus* türleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda açıklanmıştır [Koppisch et al., 2008]. Bu molekülün sentezi *Bacillus* suşları arasında korunmuşken tüm suşların canlılığı için gerekli değildir [Cendrowski et al., 2004]. Gram pozitif bakterilerde siderofor alınımı;

mebrana bağlı substrat bağlayıcı protein ve zar geçişli ABC taşıyıcılar ile kolaylaştırmıştır [Heinrichs et al., 2004]. Bacilibaktin alınımı gerçekleştiren *B. cereus* bakterileri *FeuA*, *B* ve *C* ve ayrıca trilactone hidrolaz YuiI (BesA) kodlayan genleri barındırır [Ollinger et al., 2006], [Miethke et al., 2006], [Miethke et al., 2008]. Bu dört gene ek olarak ABC-taşıyıcılarının ATPaz bileşenini kodlayan *feuD* gen dizisini barındırır Operon Fur'un 5' ucundan organize edilir (şekil 3.7.B.2). FeuABC sistemi, *B.subtilis*'te ferrik siderofor alınımını sağlar ve FeuA ferrik siderofora nanomolar bağlanma afinitesine sahiptir. Diğer taraftan YuiI. bacillibaktin ve ferrikbacillibaktini hidroliz eder. Böylece YuiI sitozolde demirin serbest bırakılmasından sorumludur [Miethke et al., 2008].

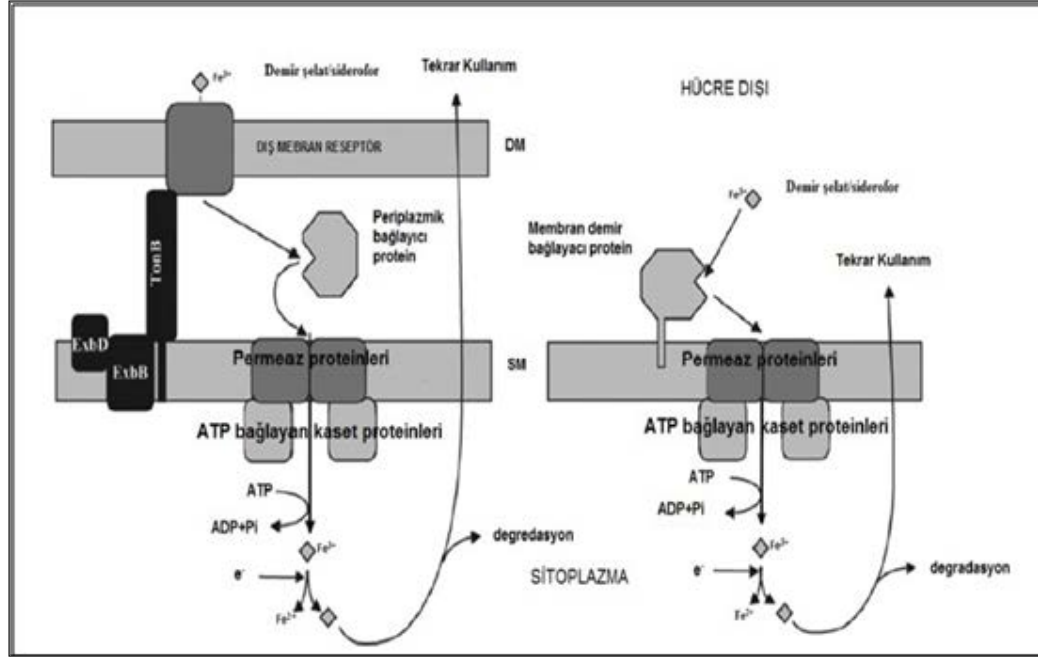
3.3. Bakterilerde Siderofor Taşıma Sistemi

Sideroforlar çok özel taşıma sistemleri tarafından bakterilere taşınır. Mikroorganizmalarda demir alınımında; dış membran reseptörü, periplazmik siderofor bağlayıcı protein (PBP) ve iç membranda ATP'ye bağlı kaset (ABC) taşıyıcılarının siderofor taşıma sisteminde görevleri vardır [Ratul et al., 2012]. Gram negatif bakterilerde dış membran bir permabilite bariyeridir ve bakteriyi toksinlerden ve kimyasal ajanlardan korur [Nikaido, 2003]. Fe^3 -siderofor komplekslerinin hücre içine alınması için öncelikle hücre zarı porinlerinden geçmesi gerekmektedir. Kompleksler özel dış membran reseptörler yardımı ile hücre içine alınırlar. Dış membran reseptörleri *E. coli*'de FhuA, (ferrikrom için), FecA (ferrik sitrat için) ve FepA (enterobaktin için), iken *P. aeruginosa* ise FpvA (piyoverdin için) ve FptA (piyokelin için) olarak bilinmektedir [Ferguson et al., 2001]. Sitoplazmik membranın hareketi için dış membrana bağlanan TonB, ExbB ve ExbD proteinleri bulunmaktadır. Periplazmadaki ferrik sideroforların taşınmasındaki enerji ihtiyacı bu proteinler tarafından salgılanır. Bu proteinler sitoplazmik membrandan dış membrana enerji aktarırlar [Larsen, 1999]. Bu proteinlerden ExbB ve ExbD proteinleri, membranın elektrokimyasal değişikliğinde kullanılırlar [Higgs ve ark.,2002]. Gram pozitif bakterilerde ise dış membran olmadığından taşıma için gerekli olan enerji ATP'den sağlanır.

Gram negatif bakterilerde hücre zarı porinlerinden geçen sideroforlar periplazmaya gelir. Periplazmada siderofor bağlayan protein (PBP), bakteri hücresinin sitoplazmasına ve sitoplazmik membrana sideroforların taşınması için önemlidir. Periplazmadaki proteinler hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır [Clarke et al., 2000], [Koster et al., 2001]. Örneğin, *E. coli*'de periplazmada siderofor bağlayıcı proteinlerden FhuD, FepB ve FecB bulunmaktadır [Tam and Saier, 1993], [Clarke et al., 2000].

ATP Bağlayan Kaset (ABC) taşıyıcıları membran proteinlerindendir. Temelde ATP hidrolizi ile oluşan enerjiyi kullanarak hücre membranından maddelerin taşınmasından sorumludurlar. Siderofor bir PBP (periplazmada siderofor bağlayıcı protein)'ne bağlandıktan sonra Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin sitoplazmik membranları boyunca ABC (ATP bağlayan kaset) taşıyıcıları tarafından sitoplazmaya taşınır ve bu taşınma ATP hidrolizi ile birleşen bir ABC taşıyıcı protein

kompleksi tarafından gerçekleştirilir [Locher, 2002]. ATP ye bağlı kaset (ABC) taşıyıcılar hücre membranları boyunca çeşitli maddelerin taşınmasında ATP hidrolizinin enerjisini kullanırlar ve ABC sistemleri sitozol ve sitoplazmik membran boyunca sideroforların taşınmasını kolaylaştırmaktadırlar [Koster, 2001], [Locher, 2002] (Şekil 3.8)



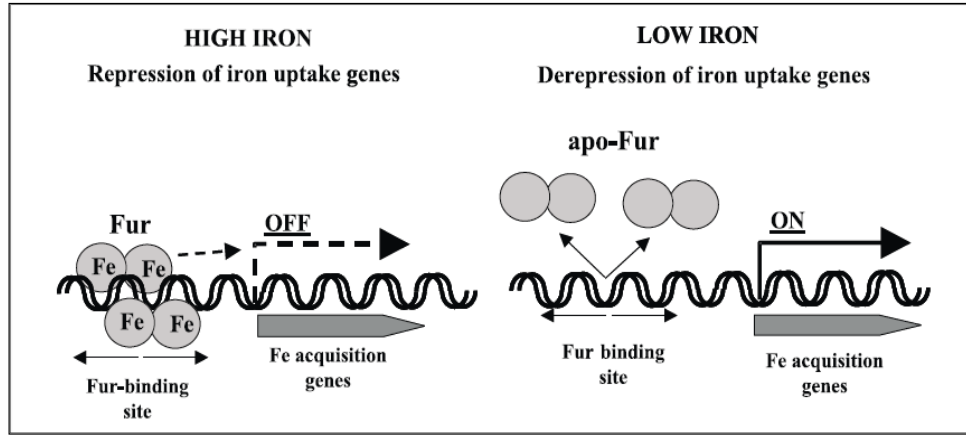
Şekil 3.8: Sideroforların hücre içine alınımı.

ABC trasnsport sistemlerinin yanında sideroforların sitoplazmik mebrana alınımı için permeatik sistemlerde iş görmektedir bu iki mekanizmanın işlevleri benzerdir. Bazı durumlarda periplazmaya alınan ferrisiderofor (siderofor-Fe³⁺) periplazmada ayrılarak serbest demir hücre içine alınmaktadır pompa sistemi periplazmik bölgedeki sideroforu tekrar kullanılmak üzere dışsal membrandan pompalamaktadır.

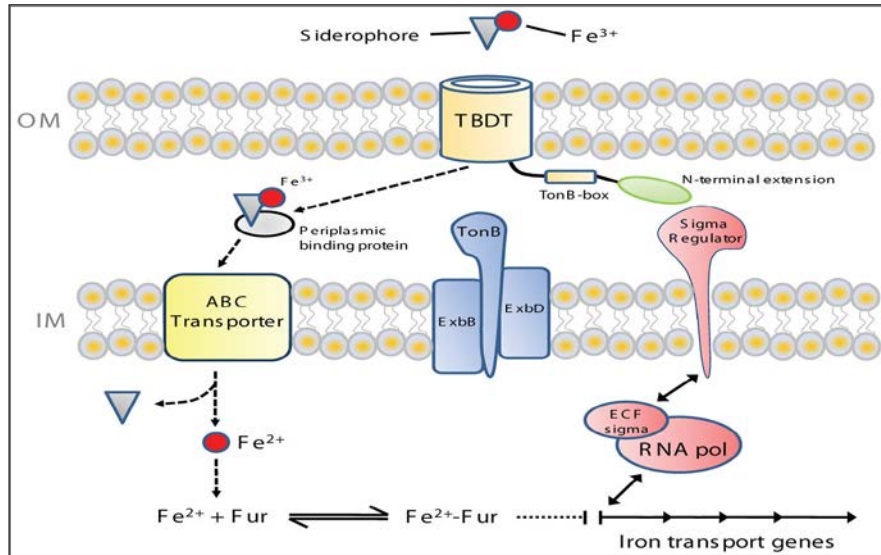
3.4. Siderofor Üretiminin Genetik Regülatörü

Bakterilerde siderofor biyosentezinin çevresel demir varlığı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Demir bağlamada görevli olan siderofor türlerinin üretildiği genetik bölge Fur (ferric uptake repressor) adı verilen bir protein tarafından baskılandığı daha önce ortaya konulmuştur (Şekil 3.9). Yapılan bir çalışmada iki

siderofor türü olan piyoverdin ve piyocheline üretimi sitoplazmik fur proteini ile demir fazlalığı koşullarında baskılandığı ortaya konulmuştur [Duncan et al., 2005]. Demir yokluğunda ise fur proteini siderofor üretiminden sorumlu gen bölgelerine bağlanamayarak siderofor üretimini baskılayamaz (Şekil 3.10). *Bacillus* türlerinde de fur proteininin varlığı bilinmektedir. Fur proteinini ek olarak zur (zing uptake repressor) proteinlerinin varlığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu proteinin görevi de fur proteininin görevi benzerdir.



Şekil 3.9: Fur proteininin çalışma mekanizması.



Şekil 3.10: Sideroforların hücre içine taşınımı ve fur proteininin sistemdeki rolü.

3.5. Mikrobiyal Sideroforların Uygulama Alanları

Son yıllarda, mikrobiyal sideroforlar ve ürünleri biyoteknoloji alanında oldukça önem kazanmıştır [Mohandass, 2004], [Chincholkar, et al., 2005], [Chaudhari et al., 2007]. Çeşitli bakterilerin sideroforlarının hastalıklar üzerindeki biyokontrol yetenekleri bilim adamları tarafından çalışılmıştır [Chincholkar, et al., 2005], [Whipps, 2001]. Özellikle bakteriostatik ve fungistatik ajan olarak, biyogübre ve biyokontrol ajanı olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir [Walsh et al., 2001], [Montesinos et al., 2002], [Nagarajkumar et al., 2004], [Mark et al., 2006].

3.5.1. Sideroforların Tıbbi Uygulamaları

Demir; insan, bitki, hayvan ve mikroorganizmaların yaşamlarındaki değişik fizyolojik aktiviteler için gereklidir ve fazlalığı ve eksikliği değişik hastalıklara sebep olması nedeni ile sideroforlar tıpta bazı klinik uygulamalarda kullanılmaktadır [Eisendle et al., 2006]. Sideroforlar bazı insan hastalıklarının tedavisinde potansiyel uygulamalara sahiptir. Sideroforlar bilinen en büyük Fe^{+3} bağlayıcıları arasındadır ve bu nedenle tıp dünyasında oldukça ilgi çekmektedir. Özellikle metal şelat tedavisinde önem kazanmıştır. Örneğin, siderofor desferrioksamin B (DFB), malariya, romatoid arthrit, alzheimer, talasemi, yaralanma, demir zehirlenmesi, tümör, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde geniş kullanıma sahiptir [Krewulak and Vogel, 2008], [Del Olmo et al., 2003]. *Klebsiella pneumoniae*'nin sideroforları antimalarial ajan olarak ve kozmetik alanında deodorant olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir [Johnson et al., 2003], [Krewulak and Vogel, 2008].

3.5.2. Sideroforların Tarımsal Uygulamaları

Bakteriler tarafından üretilen sideroforların bitki patojenleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir [Vessey, 2003]. Bitki köklerinin çevresindeki (rizosferdeki) mikroorganizmalar tarafından üretilen kimyasal bileşikler demir gibi bazı gerekli minerallerin varlığını ve alımını artırır. Rizosferik bakteriler tarafından üretilen hidroksamat ve katekolat sideroforlar bitkiler tarafından kullanılmaktadır [Carrillo-Castañeda et al., 2002]. Özellikle *Azotobacter* ve *Pseudomonas* bakterileri; ürün,

kalite ve veriminin arttırılmasına yönelik tarım uygulamalarında, tuzluluğa bağlı olarak kurak, endüstriyel kaynaklı kirletilmiş toprakların tarıma daha elverişli hale getirilmesinde ve bazı bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele gibi biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir [Cornelis and Matthijs, 2007], [Couillerot et al., 2009].

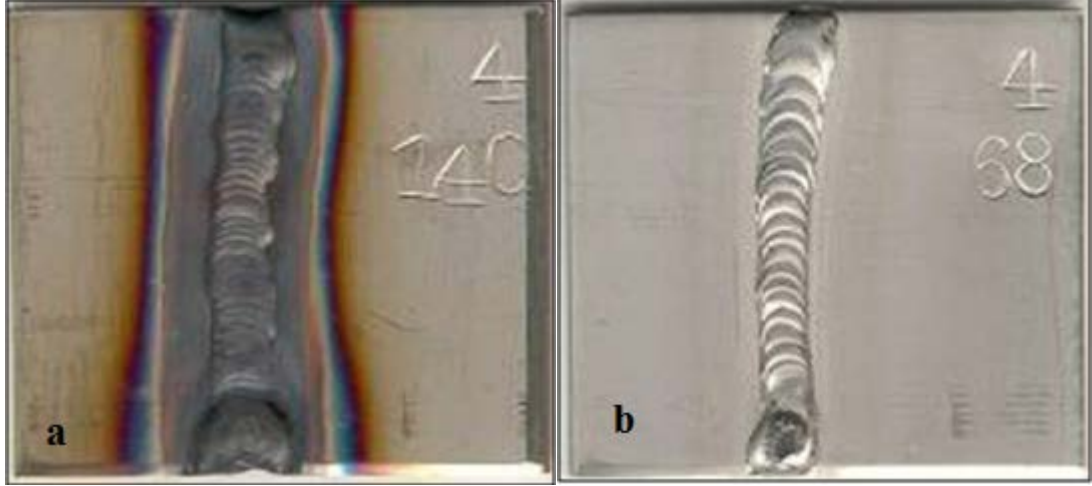
Pseudomonaslar tarafından üretilen sideroforlar, gerekli olan Fe^{3+} e bağlanarak, fungal patojenlerin spor oluşumunu engellediği ve hastalığı ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [Montesinos et al., 2002]. Bitki büyümesini geliştiren bakteri olarak bilinen (PGPB) floresan Pseudomonasların bazı suşları vardır. Bunlar tohum veya bitkinin yeraltı parçalarına inoküle edildiği zaman bitki patojenlerini baskılamaktadırlar [Couillerot et al., 2009]. PGRB tarafından hastalığın baskılanmasındaki mekanizmalarından biri de pyoverdin ve pyochelin gibi sideroforların üretimidir. Siderofor köklerin çevresindeki demiri yakalar ve böylece solgunluk ve kök çürüklüğüne sebep olan *Fusarium oxysporum* ve *Pythium ultimum* gibi patojenlerin üremesini engellemiş olurlar [Weller, 2007], [Sahu and Sindhu, 2011].

3.5.3. Sideroforların Çevresel Uygulamaları

Sideroforlar ağır metal birikimi, pas, boya giderimi ve kanalizasyon sularının temizlenmesi gibi değişik çevresel sorunlarıçözme yeteneğine sahiptirler. Sideroforlar demirin çözülmesinde önemli bir rol oynarlar. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının metal bağlama özelliği oldukça güçlüdür. Metallerden örneğin, manganez (Mn), nikel (Ni) ve demir (Fe), belirli reseptörler boyunca emilirler. Ortamda demir yetersizliği durumunda, bakteriler ferrik demiri (Fe^{+3}) bağlayan sideroforları üretirler. Siderofor üreten bakteriler ağır metaller ile kontamine olan çevreden ağır metallerin fitoekstraksiyonuna yardım etmede kullanılmaktadırlar [Sunita et al., 1994], [Bezbaruah and Saikia, 1998].

Mannheim Üniversitesi uygulamalı bilimler bölümünde (2005) yürütölmüş bir çalışmada Prof. Dr. Peter M. Kunz sideroforların pas giderimi üzerine etkisini çalışmıştır. Çalışmanın öne sürdüğü yenilikçi yan sideroforların doğal bir pas giderici ajan olması ve diğer pas giderici ajanlara nazaran çevreye zararsız olmasıdır. Yapılan çalışmada birçok bakteri türü bir araya getirilerek bu bakterilerden alınan sideroforlar

demir içeren sanayi materyalleri üzerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak ta saflaştırılan sideroforların pas giderimini yaptığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmada kullanılan sideroforların tipi desferoksamindir [Kunz,2005] (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Sideroforlar aracılığı ile pas giderimi a) Paslı demir içeren materyal b) Siderofor sonrası aynı materyalde pas giderimi.

3.6. Denizel Ekosistemlerde Sideroforlar

Karasal habitatlarda olduğu gibi deniz habitatlarında yaşayan mikroorganizmalar organik bileşiklerle bağ yapmış demiri sideroforlar aracılığı ile hücre bünyesine katmaktadırlar. Deniz yüzeyinde çözünmüş demir oranı düşük olup demir, organik bileşikler ile bağ yapmaktadır. Deniz sideroforları deniz yüzeyindeki demiri etkili bir şekilde asimile etmektedirler. Bu asimilasyon denizdeki patojenik mikroorganizmalar için virülans faktörler açısından önemli olduğu söylenmektedir. Deniz sideroforlarının biyosentezinde görev alan proteinler terapötik ilaçların hedefi olduğu için önemli olduğu düşünülmektedir bu nedenden dolayı deniz sideroforının biyosentez yolları ile ilgili çalışmalar günümüzde artmaktadır [You et al, 2008].

Sideroforlar, deniz suyu yüzeyinde 20 pM to 1 nM bu konsantrasyonlarda bulunmaktadır [Bruland et al., 1991], [Wu and Luther 1996], [Butler, 1998], [Butler and Martin, 2005]. Deniz bakterilerinin ürettiği sideroforlar karasal habitatlarda yaşayan bakteriler tarafından üretilen sideroforlara benzerlik gösterdiği gibi deniz bakterilerine özel sideroforlar da üretmektedirler [Wu and Luther, 1996].

Karasal ortamda yaşayan bakterilerde siderofor yapıları büyük çoğunlukla belirlenmiştir fakat deniz sideroforlarının yapıları henüz çok az sayıda tespit edilmiştir. Deniz bakterileri arasındaki düşük filogenetik benzerliklere rağmen bu bakteriler tarafından üretilen birçok sideroforun yapısı benzer olarak görülmektedir. Bu yapıların benzerlikleri horizontal gen transferi veya konvergent (yakınsak) evrim sonucu olduğu düşünülmektedir [Neilands 1995].

Deniz sideroforlarının yapıları ve aktivitesi onların biyosentetik mekanizması ile bağlantılı olarak çeşitlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda denizde yaşayan bakterilerin ürettiği sideroforlarının biyosentetik yollarında genler ve enzimlerle ilişkili olarak bakılarak aktivitelerine ışık tutulmaktadır. Biyosentetik mekanizma 2 farklı gruptan olabilir. Non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) ve bağımsız sentetaz (NIS). Siderofor yapıların ve onların biyosentezinin analizleri bakteriyel deniz iç dengesinde sideroforların rolünü anlamada önemli bir konudur [Miethke and Marahiel 2007].

Deniz sideroforları deniz bakterilerinin birçok farklı guruplarından izole edilmektedir. Deniz sideroforları çok çeşitli bakterilerden salgılanmasına rağmen sideroforlardaki bazı kimyasal yapıların sürekli tekrarlandığı gözlemlenmiştir. Karasal sideroforlar gibi deniz sideroforlarında amino asit ve ketokolat kullanılarak amid bağları veya peptid bağları tarafından oluşmaktadır. Sideroforlar bazı özellikleri ile proteinlerden ayrılmaktadır. D-amino asit , nadir olarak proteinlerde bulur fakat sıklıkla sideroforlarda bulunmaktadır. L-amino asitlerin D-aa leri peptidazlar tarafından sindirimden kaçınmasında yardımcı olduğu tahmin edilmektedir. Çoğu olayda amid bağlarındaki nitrit hidroksilasyon ve asilasyon tarafından değiştirilmektedir. Ayrıca aminoasitlerin kenar zincirleri; sideroforlarda amid bağlarına katkıda bulunabilir. Diğer bir durumda amid bağları dikarboksilik asit alternatif birimlerinden oluşmaktadır. Sideroforlar sadece aminoasit ve katekalatlar içeren ve birçok deniz sideroforlarını içeren yapısal özellikleri nadiren karasal sideroforlardada gözlemektedir. İlk olarak birçok deniz sideroforları amfifiktir. İkinci olarak birçok deniz sideroforları sitrat veya beta hidroksi aspartatın formlarında foto reaktif alfa hidroksi karboksilik asit içermektedir [Martinez et al., 2000].

3.7. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar

Birçok mikroorganizma için siderofoların sentezi, yapıları, özellikleri ve kullanım alanları, bilimsel araştırmalarla ortaya konulmuş ve bakteri, aktinomycetes, mantar ve alglerin farklı siderofor türlerini ürettiği bildirilmiştir [Winkelmann, 2002].

3.7.1. Aktinomisetler

Aktinomicetesler aerobik gram pozitif filamentli bakteriler olup, aseksüel spor formundadır. Doğada saprofit olarak bulunurlar ve yoğunluğu fazla olan metalleri tolere edebilirler. Aktinomicetesler hidroksamat ve karışık tipde siderofor üretirler. Siderofor üreten aktinomicetesler arasında *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides*, ve *Streptomyces griseus* vardır [Bergeron and Burne, 2001].

3.7.2. Mantarlar

Mantarlar da bakteriler kadar önemli siderofor üretirler. Mantarların katekolat (Capon et al., 2007) ve karboksilat tipde sideroforlara sahip oldukları bilinmesine rağmen, esas olarak hidroksamat siderofor üretirler (Holinsworth ve Martin, 2009). Siderofor üreten mantarlar arasında *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Trametes versicolor*, *Ustilago sphaerogina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula minuta* yer almaktadır. Diğer taraftan *Saccharomyces cerevisiae*, siderofor üretmez fakat siderofor demir sistemine sahiptir ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen sideroforu kullanırlar [Eisendle et al., 2006], [Philpott and Protchenko, 2008], [Ozan vand Maden, 2010].

3.7.3. Algler

Bazı araştırmacılar birkaç algin siderofor ürettiğini bildirmişlerdir. Schizokinen, *Anabaena* sp. tarafından üretilen sideroforun bir hidroksamat tipidir ve demir alınımasını kolaylaştırır. *Anabaena flos-aquae* ve *Anabaena cylindrica* bakırı biriktiren siderofor üretirler [Lesuisse et al., 2001].

3.7.4. Bakteriler

Bakteriler metal bulunan ortamlarda yaygın olarak bulunurlar ve ağır metallere tutunarak birikirler. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları metal bağlama özelliğine sahiptir. Bazı bakteriler metal bağlayan polisakkarit üretirler. Buna ilaveten manganez, nikel ve demir gibi metalleri özel reseptörlerle yoluyla absorbe ederler. Demir bulunan ortamda, bakteriler ferrik demiri bağlayan ve taşıyan siderofor üretirler. Bu sideroforlar mineral ya da organik maddelerden demirin hücre dışında çözünür duruma getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Siderofor üreten bazı önemli bakteriler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum*, *Aerobacter aerogenes* ve *Mycobacterium tuberculosis*dir [Crosa and Walsh, 2002].

3.8. *Bacillus* Türlerinin Özellikleri

Bacillus cinsi, Bacillaceae familyasına dahil olup, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir [Kalkan ve Halkman 2006]. Aerobik ve fakültatif anaerobtururlar. Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluşturmurlar. Vejetatif hücreler 0.5x1.2 µm ile 2.5x10 µm çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir [Kalaylı ve Beyatlı 2003].

Bacillus 'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C da ve pH 7 civarında ürerler [Kalaylı ve Beyatlı 2003].

Bacillus cinsi uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus* türlerinin hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamıyla örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* türleri genellikle karbonhidrat kapsülü bulundurmurlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilirler [Kalaylı ve Beyatlı 2003].

Ellye yakın türü ihtiva eden *Bacillus* türlerinde, endosporun hücre içindeki yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekeri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G + C mol oranı % 32–62'dir [Kalkan ve Halkman 2006].

Bacillus türleri'nin yapılan çalışmalar sonucunda basilibaktin, entrobaktin ve petrobaktin olmak üzere üç tip siderofor ürettiği tespit edilmiştir. Basilibaktin entrobaktin ve petrobaktin birbirinin analogu olup sideroforların ketokolatlar grubuna girmektedir [Waseem et al., 2008], Basilibaktin sentezinde 2,3-dihydroxybenzoate (DHB)'ın öncü olduğu ispatlanmıştır [Rowland and Taber, 1996], [May et al., 2001].

3.8.1. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis aerobik, hareketli, çubuk şeklinde, Gram ve katalaz pozitif, endospor oluşturan, fermentatif, mikroaerofilik ve anaerobik koşullarda üreme yeteneğine sahip bir mikroorganizmadır. Hücreler 1 µm genişliğinde 5 µm boyundadır. Taksonomik olarak *Bacillus cereus* ile yakından ilgilidir. Ancak *B. thuringiensis* serotipleri *Bacillus cereus*'tan farklı olarak spor oluşum aşamasında hücre içinde delta toksin veya parasporal kristalin varlığı ile karakterize edilmektedir. Endotoksin, diğer hücre materyalleri gibi boyanmakta, eksosporium oluştuğunda serbest halde görülmekte, sporelerden kolaylıkla ayrılmaktadır [Schnepf et al., 1998].

3.8.2. *Bacillus cereus*

Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *B. cereus*, toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır [Kalkan ve Halkman 2006]. Optimum üreme sıcaklığı, suşlara göre 28–35 °C arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C' dir. Maksimum üreme sıcaklığı yine suşlara göre 37 ile 48°C arasında değişir. Minimum üreme sıcaklığı ise suşa bağlı olarak 10 ile 18 °C arasındadır. Bazı kaynaklarda minimum sıcaklık 4–5 °C, maksimum sıcaklık ise 50 °C olarak verilmektedir. Spor germinasyonu için optimum sıcaklık 30 °C, minimum -

1 °C ve maksimum 59 °C' dir. Gelişebildiği pH aralığı 4.9-9.3 olup optimum 7.0'dir. *Bacillus cereus*; lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup, nitratı indirger ve polimiksine dirençlidir. Birçok suşu da % 7,5 tuzda üreyebilir. *Cereus* adını tahıl anlamındaki “cereal” dan alır.

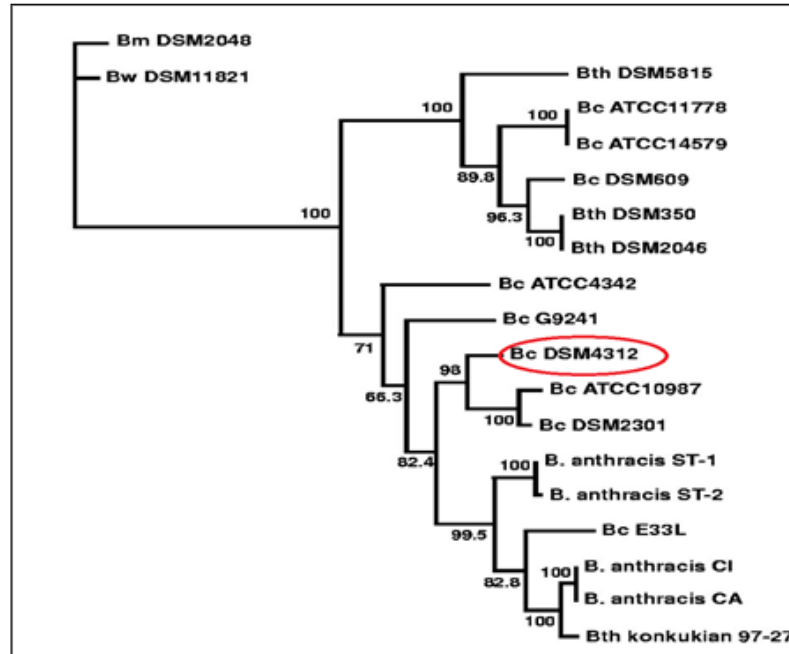
Çalışmalarımızda kullandığımız *Bacillus cereus* türünün filogenetik ağacı şekil 3.12'de, *Bacillus cereus* DSM 4312 ise şekil 3.13'te gösterilmiştir [Silke et al., 2006].

Bacillus cereus ve *Bacillus thuringiensis* türlerinin taksonomik sınıflandırılması aşağıda gösterilmiştir [Kalkan ve Halkman 2006].

- Bacteria
- Firmicutes
- Bacilli
- Bacillaceae
- Bacillales
- Bacillus
- *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*



Şekil 3.12: *Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* türlerinin filogenetik ağacı.



Şekil 3.13: *Bacillus cereus* DSM 4312 suşunun filogenetik ağacı.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gereçler

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Mono potasyum fosfat, sodyum klorür, amonyum klorür, demir (III) klorür, hekzadesiltrimetil amonyum bromür (HDTMA), 8-hidroksikuinolin, kloroform, sodyum hidroksit, magnezyum klorür, kalsiyum klorür, sülfanilik asit, sodyum asetat, alfa-naftilamin, fruktoz, galaktoz, laktoz, sodyum nitrit, sodyum molibdat ve sodyum tiosülfat pentahidrat Merck KGaA (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Chrome azurol S (CAS), hidroklorik asit, glikoz, mannitol, piperazin, sülfosalisilik asit ve asetik asit Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Piperazine diethanesulfonik asit (PIPES) AppliChem GmbH (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Bakto agar Fluka AG - Chemische (St. Gallen, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Sükroz Duchefa Biochemie B.V. (Hollanda, Haarlem) firmasından temin edilmiştir. İyodin Alfa Aesar GmbH (Karlsruhe, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

4.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri 121 °C’de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

- Luria Broth (1 L, pH 7.5)
 - Trypton: 10 g
 - Maya Özütü: 5 g
 - NaCl: 10 g
 - dH₂O ile 1 L’ye tamamlanır.
- Luria Agar (1 L, pH 7.5)
 - Trypton: 10 g

- Maya Özü: 5 g
 - NaCl: 10 g
 - Agar: 15 g
 - dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
-
- Triptic Soy Broth (1L, pH 7.3)
 - Kazeinden elde edilmiş pepton: 17 g
 - Soyadan elde edilmiş pepton: 3 g
 - Glikoz: 2.5
 - NaCl: 5 g
 - KH₂PO₄: 2,5 g
 - dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
-
- Triptik Soy Agar (1L, pH 7.3)
 - Kazeinden elde edilmiş pepton: 17 g
 - Soyadan elde edilmiş pepton: 3 g
 - Glikoz: 2,5 g
 - NaCl: 5 g
 - KH₂PO₄: 2,5 g
 - Agar: 15 g
 - dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
-
- MM9 Broth (1L pH 6.5)
 - dH₂O: 855 ml
 - NaOH: 6 gr

MM9 broth besiyerini hazırlanırken öncelikle NaOH distile suyun içerisinde çözülmüştür. NaOH bunu takiben ilave edilecek PİPES'in çözülmesine aracılık etmektedir. En son olarak çözeltiye PİPES eklenmiştir.

- PİPES: 30,24 g
- 10 x MM9: 100 ml

Bu aşamada besiyeri için gerekli diğer kimyasallar eklenmeden önce karışım 121°C’de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 50 °C kadar soğuması beklenip aşağıdaki kimyasal malzemeler eklenmiştir.

- Deferrated casamino asit: 30 ml
- 1 M Glikoz: 10 ml
- 1 M MgCl₂: 1 ml
- 100 mM CaCl₂: 1 ml

- MM9 Agar (1L pH 6.5)

- dH₂O: 850 ml
- NaOH: 6 gr

MM9 Agar besiyerini hazırlanırken öncelikle NaOH distile suyun içerisinde çözülmüştür. NaOH bunu takiben ilave edilecek PİPES’in çözülmesine aracılık etmektedir. En son olarak çözeltiliye PİPES eklenmiştir.

- PİPES: 30,24 g
- 10 x MM9: 100 ml
- Bacto-agar: 15 g

Bu aşamada besiyeri için gerekli diğer kimyasallar eklenmeden önce karışım 121°C’de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 50 °C kadar soğuması beklenip aşağıdaki kimyasal malzemeler eklenmiştir

- Deferrated casamino asit: 30 ml
- 1 M Glikoz: 10 ml
- 1 M MgCl₂: 1 ml
- 100 mM CaCl₂: 1ml

- Chorome Azurol S Agar (1L pH 6.5)

- dH₂O: 750 ml
- NaOH: 6 gr

CAS Agar besiyerini hazırlanırken öncelikle NaOH distile suyun içerisinde çözülmüştür. NaOH bunu takiben ilave edilecek PİPES'in çözülmesine aracılık etmektedir. En son olarak çözeltiye PİPES eklenmiştir.

- PIPES: 30,24 g
- 10 x MM9: 100 ml
- Bacto-agar: 15 g

Bu aşamada besiyeri için gerekli diğer kimyasallar eklenmeden önce karışım 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 50 °C kadar soğuması beklenip aşağıdaki kimyasal malzemeler eklenmiştir.

- Deferrated casamino acids: 30 ml
- 1 M Glikoz: 10 ml
- 1 M MgCl₂: 1 ml
- 100 mM CaCl₂: 1 ml
- CAS-HDTMA solüsyonu: 100 ml

4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Çözeltiler

Aşağıda kullanılan tüm solüsyon ve çözeltiler 121 °C'de 20 dk süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

- MM9 Ortamı Bileşenleri (1 L)
 - KH₂PO₄: 3 g
 - NaCl: 5 g
 - NH₄Cl: 10 g
 - dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
- CAS-HDTMA Solüsyonu (1 L)
 - Chrome azurol S: 0,605 g
 - dH₂O: 500 ml

İlk olarak CAS distile suyun içinde çözülmüştür.

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2,703 g
- HCl: 40 ml
- dH_2O : 100 ml

Distile suyun içinde çözülmüş olan CAS'ın üzerine yukarıda oluşturulmuş karışım eklenmiştir.

- HDTMA: 0,729 g
- dH_2O : 400 ml

Son olarak tüm karışıma, distile suyun içinde çözülmüş olan HDTMA eklenmiştir.

- MgCl_2 Çözeltisi (1 M, 100 ml): 9.5g MgCl_2 , dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır.
- CaCl_2 Çözeltisi (100 mM, 100 ml): 1.12 g CaCl_2 , dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Glikoz Çözeltisi (100 ml, 1M) 18 g Glikoz, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.
- Fruktoz Çözeltisi (100 ML, 1M): 18 g fruktoz, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.
- Galaktoz Çözeltisi (100 ML, 1M): 18 g galaktoz, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.
- Mannitol Çözeltisi (100 ML, 1M): 18 g mannitol, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.
- Sükroz Çözeltisi (100 ml, 1M) 34,23 g galaktoz, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.
- Laktoz Çözeltisi (100 ml, 1M) 34,23 g laktoz, dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır.

Aşağıdaki solüsyonlar ve çözeltiler ise otoklavlanmadan kullanıma hazır hale getirilmiştir.

- CAS Stok Solüsyonu (1 L, 2 mM) CAS: 1,21 g, dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır.
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi (1L, 1 mM): 2,703 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır.

- HCl Çözeltisi (1 L, 10 mM) HCl 40 ml, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
- Fe Stok Solüsyonu (1 mM)
 - 1mM FeCl₃.6H₂O: 1000 ml
 - 10 mM HCl: 40 ml
- Piperazine Tamponu (100 ml, pH 5.6)
 - Piperazin: 14.35 g
 - Distile su: 100 ml

Piperazin distile suyun içinde çözülmüştür. Devamında çözelti pH'ı 5.6 olana kadar HCl eklenmiştir.

- HCl: 67,5 ml

- HDTMA Çözeltisi (1L): 0,44 g HDTMA, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
- CAS Testi Solüsyonu (1L)
 - Fe Solüsyonu: 15 ml
 - CAS Solüsyonu: 75 ml
 - HDTMA Çözeltisi: 500 ml
 - Piperazin Tamponu: 367.5 ml
 - Distile su: 42.5 ml

CAS testi solüsyonunu hazırlamak için CAS solüsyonun üzerine Fe solüsyonu eklenmiştir. Bu karışımın üzerine HDTMA çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak piperazin tamponu eklenip solüsyonun toplam hacmi 1000 ml oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir.

- Shuttle solüsyonu (100 ml, 0,2 M) 2,77 g Sülfosalisilik asit, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

- HCl Çözeltisi (1 L, 0,5 N): 40 ml HCl, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
 - Nitrit - Molibdat Ayıracı (100 ml)
 - NaNO₂: 10 g
 - Na₂MoO₄: 10g
 - dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
 - NaOH Çözeltisi (100 ml, 1N): 4 g NaOH, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
 - HCl Çözeltisi (1 L, % 10): 100 ml HCl, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
 - Asetik Asit Çözeltisi (1 L, % 30): 300 ml asetik asit, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.
 - Sülfanilik asit çözeltisi (1 L)
 - Sülfanilik asit: 10 g
 - Asetik asit çözeltisi: 1000 ml
- Sülfanilik asit çözeltisi hazırlanırken sülfanilik asit asetik asit çözeltisi içinde ısıtılarak çözülmüştür.
- İyodin Solüsyonu
 - İyodin: 13 g
 - Glasial asetik asit: 1000 ml
 - Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi (100 ML)
 - Sodyum Tiyosülfat: 24,8 g
 - dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
 - Sodyum Asetat Çözeltisi (100 ML): 35 g Sodyum Asetat, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
 - Alfa-Naftilamin Solüsyonu (1L)
 - Alfa-Naftilamin: 3 g
 - Glasial asetik asit: 1000ml

- Deferrated casamino asit(1L)
 - Casamino asit: 100 g
 - Distile su: 1000 ml
 - 8-hidroksikuinolin: 30 g
 - Kloroform: 1000 ml

Casamino asit distile suyun içerisinde 8-hidroksikuinolin ise kloroform içerisinde ayrı ayrı çözülmüştür. Daha sonra casamino asit'in üzerine kloroform içinde çözülmüş 8-hidroksikuinolin ilave edilip karıştırılmış ve faz oluşumuna kadar beklenmiştir. Casamino asit karışımının üst kısmında, kloroform alt kısımda toplanmıştır. Üst kısımda toplanan casamino asit enjektör yardımı ile farklı bir cam behere aktarılmıştır. Bir süre beklendikten sonra faz oluşum işlemi daha önce belirtilen şekilde gerçekleşmiş ve Casamino asit demirden uzaklaştırılmıştır. Casamino asit enjektör ile cam şişeye aktarılıp kullanıma hazır hale getirilmiştir.

4.1.4. Kullanılan Cihazlar

- +4°C ve -20 °C Buzdolabı: Arçelik
- -80 °C derin dondurucu: Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer
- Steril Kabin: Heraeus, HP48
- Masa Üstü Santrifüj: Heraeus, Labofuge 400R
- Spektrofotometre: Bio-Rad, Smartspec 3000
- Otoklav: HIRAYAMA, HICLA HVE-50
- pH metre: Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
- Buz Makinesi: BAR-LINE BF85
- Mikrodalga Fırın: Kumtel
- İnkübatör: Heraeus TipB6
- Floresans Mikroskobu: Nikon Eclipse Ti-S
- Optik Emisyon Spektrometresi: Perkin Elmer

4.1.5. Kullanılan Bakteri Türleri

Marmara ve karadenizin farklı bölgelerinden alınan örneklerden izole edilen ve VITEK 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanmış *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 bakteri türleri Yrd. Doç.Dr. Yosun MATER'in laboratuvarından temin edilmiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterileri Dr. Mine GÜL ŞEKER'den temin edilmiştir.

4.2. Yöntemler

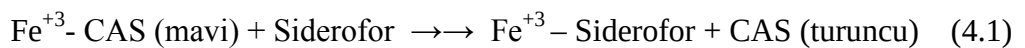
4.2.1. Siderofor Tespiti

Bakterilerde siderofor tayini Payne'nin çalışması referans alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre bakterilerin siderofor tayini için Chrome Azurol Sulfonate agar ve Chrome Azurol sulfonate sıvı olmak üzere iki test uygulanmıştır [Payne,1994].

Bakteri kültürleri tüm deneylerde demir içermeyen MM9 besiyerlerinde büyütülmüşlerdir. Kullanılan tüm cam malzemeler; ortamdaki demiri uzaklaştırmak amacı ile % 10'luk HCl ile muamele edilip daha sonra distile sudan geçirilmiştir. Cam gereçler son olarak 121 °C'de 20 dk süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle kullanılma hazır hale getirilmiştir.

4.2.1.1. Chrome Azurol S Agar Deneyi

Chorome Azurol S agar deneyi, ferrik demir (Fe^{+3}) için sideroforun yüksek afinite göstermesini temel alan ve sideroforun tespitinde kullanılan evrensel bir testtir. CAS agar plateleri, Fe^{+3} ile Chrome Azurol Sulfonate (CAS) boyasının kompleks oluşturmasından dolayı mavi renktedir. Siderofor varlığında aşağıda belirtilen reaksiyon gerçekleşir, serbest boya açığa çıkar ve renk turuncuya dönüşür.



Siderofor üretimi için *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kültürleri Chorome Azurol S Agar besiyerine kürdanla delme ekim tekniği ile transfer edilmiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bakterileri 37 °C’de *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 bakterileri ise 30 °C’de 168 s inkübe edilmiştir. Koloni oluşturan bakterilerin oluşturdıkları üreme halkalarının hemen dışında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumunu ve dolayısıyla CAS agar deneyi için pozitif sonuç verdiğini göstermektedir [Payne, 1994]. Her bir bakteri örneğinin oluşturduğu turuncu zonların yarıçapı 24 s aralıklarla ölçülmüş ve turuncu renkte zon oluşturan bakteriler belirlenip siderofor üretimi derecelendirilmiş ayrıca petriler fotoğraflanmıştır.

4.2.1.2. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi

Chorome Azurol S sıvı deneyi ile siderofor üretiminin tespit edilmesi amacıyla *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bakterileri demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine ön kültüre alınmıştır. Taze MM9 sıvı besiyerine 1/100 oranında aktarılan her bir ön kültür, 225 rpm’de *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 37 °C’de, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 ise 30 °C’de 24 s inkübe edilmiştir.

Sideroforlar hücre dışına salgılanan moleküllerdir, bu nedenle santrifüj işlemi sonucunda hücreler uzaklaştırılıp süpernatant elde edilmiştir. Bakteri kültürleri inkübasyon sonunda 20 °C’de 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Her bir bakteri kültürü için 0,5 ml süpernatant alınarak 0,5 ml CAS solüsyonu ile karıştırılmış, bunu takiben CAS solüsyonu ile siderofor arasındaki bağı kuvvetlendirmesi ve renk değişimini belirginleştirmesi için 10 µM shuttle solüsyonu ilave edilmiştir. Siderofor üretimi olan bakteri türlerinde mavi renkte olan CAS solüsyonu siderofor ile etkileşimi sonucunda turuncu renge dönerek CAS sıvı deneyi için pozitif sonuç vermektedir [Payne, 1994]. Renk değişiminin gerçekleşmesi için en az 5 dk bekletilip elde edilen sonuçlar fotoğraflanmıştır. Ayrıca siderofor üretimi bakteri türleri arasında derecelendirilmiştir

4.2.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi

Bakteri türlerinin siderofor üretim yüzdesini belirlemek amacıyla hazırlan ön kültürler 1/100 oranında demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 24 s 225 rpm’de *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 için 37 °C’de, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 için 30 °C’de inkübe edilmiştir. Bakteri kültürleri 24 saatin sonunda alınıp 20 °C’de 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan her biri için 0,5 ml alınarak 0,5 ml CAS solüsyonu ilave edilmiş ve bunu takiben için 10 µM shuttle solüsyonu ilave edilmiştir. Ayrıca referans olarak kullanılmak üzere inoküle edilmemiş 0,5 ml MM9 broth kullanılmıştır. Referans (inoküle edilmemiş 0,5 ml MM9 besiyeri + 0,5 ml CAS solüsyonu + 10 µM shuttle solüsyonu), değerlerindeki ve örneklerdeki renk kaybı A630 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenmiştir. Sepektrofotometrik ölçümler sonucu elde ettiğimiz değerler aşağıda verilen siderofor yüzde formülü kullanılarak hesaplanmıştır [Payne, 1994].

$$\bullet \% \text{ Siderofor Birimi (SU)} = \frac{[(A_r - A_s)] * 100}{A_r}$$

- Ar 630: Referans değeri
- As 630: Örnek değeri

4.2.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi

Bacillus cereus DSM 4312 bakterisinin maksimum siderofor üretim zamanını belirlemek amacıyla hazırlanan ön kültürler 1/100 oranında demir içermeyen MM9 besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37 °C’de 225 rpm’de 96 s inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örnekler 20 °C’de 10.000 rpm’de 5dk santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen bakteri süpernatantlarından her biri ile Chorome Azurol S sıvı deneyi yapılmıştır ve absorbansları 630 nm’de ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin siderofor üretim yüzdeleri ($[(A_r - A_s)/A_r]100 = \% \text{ SU}$) formülü ile hesaplanmıştır. Siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen

zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600'de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi

Bacillus cereus DSM 4312 bakterisinde üretilen siderofor türünün belirlenmesi amacı ile Arnow ve Csaky testleri uygulanmıştır.

4.2.6.1. Arnow Testi

Arnow testi katekol tipi sideroforların tipinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [Arnow,1937]. Üretilen siderofor tipinin belirlenmesi için ön kültüre alınmış *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi demir içermeyen MM9 broth besiyerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. 37 °C'de 225 rpm'de inkübe edilen bakteri kültürleri 48 saatin sonunda 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 1ml alınıp üzerine 1ml 0,5 N HCl ve 1ml nitrit-molibdat ayırıcı ilave edilmiştir. Eğer *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi katekol tipi siderofor üretiyorsa bu basamakta karışım sarı renge dönmesi gerekmektedir. En son olarak karışımın üstüne 1 ml NaOH çözeltisi eklenmiştir. Bu basamakta ise katekol tipi siderofor üreten bakterilerde karışımın kırmızı renge dönmesi gerekmektedir [Payne, 1994]. Siderofor oluşumuna bağlı olarak gözlenen renk değişimi spektrofotometre cihazında 510 nm'de ölçülmüştür.

4.2.6.2. Csaky Testi

Csaky testi hidroksamat tipi sideroforların belirlenmesinde kullanılmaktadır [Csaky, 1948]. Bu amaçla ön kültüre alınmış *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi demir içermeyen MM9 broth besiyerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37 °C'de 225 rpm'de 48 s inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürleri 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen 1 ml süpernatantın üzerine 1ml H₂SO₄ (6N) eklenmiştir ve karışım 30 dk 130 °C'de bekletildikten sonra 3ml sodyum asetat ilave edilmiştir. Daha sonra sırası ile 1 ml sülfanilik asit solüsyonu ve 0,5 ml iyodin solüsyonu eklendikten sonra 5 dk beklenip

1 ml sodyum tiyosülfat solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra solüsyonun üzerine α -naftilamin solüsyonu eklendikten sonra Son olarak karışımın üzerine 10 ml distile su ilave edilip 30 dk bekletilmiştir. Karışımından 1 ml örnek alınıp spektrofotometre cihazında 526 nm’de ölçülmüştür.

4.2.4. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu

Bacillus cereus DSM 4312 bakterisi tarafından maksimum siderofor üretimi için çevre koşullarının optimizasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla sıcaklık, pH, karbon kaynakları, inokülasyon miktarının siderofor üretimine etkisi belirlenmiştir. Tüm deneylerde demir içermeyen MM9 sıvı besiyeri kullanılmıştır.

4.2.4.1. Farklı Demir Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Farklı demir konsantrasyonlarının *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin siderofor üretimine etkisini araştırmak üzere hazırlanan ön kültürler 1/100 oranında 0, 1, 2.5, 5, 10, 30, 60 ve 90 μ M olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda FeCl_3 içeren MM9 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri, 37 °C’de 225 rpm’de inkübe edilmiştir. 48. s sonunda alınan örnekler 20 °C’de 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir ve bakteri kültürlerinden elde edilen her bir süpernatant ile Chorome Azurol S sıvı deneyi yapılarak bakterilerin siderofor üretim yüzdesi belirlenmiştir. Farklı demir oranlarında siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600’de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.4.2. Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi

Sıcaklık, siderofor üretiminde etkili olan önemli faktörlerden biridir. Sıcaklığın siderofor üretimine etkisini belirleyebilmek amacı ile *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin hazırlanan ön kültürleri 1/100 oranında demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bakterileri kültürleri 23, 30, 37 ve 45 °C’de 225 rpm’de 48 s inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürleri alınıp 10.000 rpm’de

5dk santrifüj edilmiştir Bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan her biri için Chorome Azurol S sıvı deneyi yapılmış ve siderofor miktarı 630 absorbans değerinde ölçülerek bakterilerin siderofor üretim yüzdesi belirlenmiştir. Farklı demir oranlarında siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600'de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.4.3. Ph'ın Siderofor Üretimine Etkisi

pH'ın siderofor üretimine etkisini inceleyebilmek amacı ile pH 4, 5, 6.5, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olmak üzere 9 farklı pH değerine sahip MM9 sıvı besiyeri hazırlanmıştır. *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi demir içermeyen MM9 sıvı besiyerinde 225 rpm'de 37 °C'de 16 s ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra hücreler 1/100 oranında farklı pH lardaki demir içermeyen taze MM9 broth besi yerlerine inoküle edilmiştir. 48 s inkübasyonun ardından hücreler 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. MM9 besiyerine salgılanan siderofor miktarını belirlemek amacıyla elde edilen süpernatantlardan her birine Chorome Azurol S sıvı deneyi yapılmış ve siderofor birim yüzdesi spektrofotometre cihazında A630 nm'de ölçümler sonucu elde edilen değerler kullanılarak belirlenmiştir. Farklı pH oranlarında siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600'de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.4.4. Farklı Karbon Kaynaklarının Siderofor Üretimine Etkisi

Bakterilerin siderofor üretimine etkisi bulunan önemli bir faktörde bakteri hücrelerinin kullandığı karbon kaynaklarıdır. Farklı karbon kaynakların siderofor üretimine etkisini inceleyebilmek amacı ile 1 M'luk glikoz, fruktoz, mannitol, galaktoz, laktoz, sükroz içeren 6 farklı MM9 broth besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Ön kültüre edilmiş *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi farklı karbon kaynağı içeren ortamlardan hazırlanmış demir içermeyen MM9 sıvı besiyerlerine 1/100 oranında taze MM9 besi yerine inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37° C'de 225 rpm'de 48 s inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant elde

edilmiştir. Chorome Azurol S sıvı deneyi sonucu örneklerde oluşan renk değişimi spektrofotometre cihazında A630 nm’de ölçülerek belirlenmiş ve elde edilen veriler kullanılarak bakterilerin siderofor üretim yüzdesi hesaplanmıştır. Farklı karbon kaynaklarında siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600’de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.4.5. Farklı Glikoz Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Bakterilerin kullandığı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisinin araştırılması sonucunda en yüksek siderofor üretimi glikoz varlığında tespit edilmiştir. Bu deneyi takiben glikozun farklı konsantrasyonunun siderofor üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı glikoz konsantrasyonlarının siderofor üretimindeki üzerindeki etkisini incelemek amacı ile ön kültüre alınmış *Bacillus cereus* bakterisi farklı konsantrasyonunda (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 M) glikoz içeren MM9 broth besiyerlerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37° C’de 225 rpm’de 48 s inkübe edildikten sonra 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlarda salınan siderofor miktarı 630 nm absorbans değerinde ölçülerek siderofor üretim yüzdesi belirlenmiştir. Farklı glikoz konsantrasyonları ile siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600’de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.4.6. İnokülasyon Miktarının Siderofor Üretimine Etkisi

Bakterilerde inoküle edilen bakteri miktarının siderofor üretimi üzerinde etkisi bulunmaktadır. İnokülasyon miktarının siderofor üretimindeki üzerindeki etkisini incelemek amacı ile ön kültüre alınan *Bacillus cereus* bakterisi 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4/100 ml oranlarında demir içermeyen MM9 besiyerlerine inoküle edilmişlerdir. Bunu takiben bakteri kültürleri 37 °C’de 225 rpm’de 48 s inkübe edildikten sonra 10.000 rpm’de 5dk santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan her biri ile Chorome Azurol S sıvı deneyi yapılmış ve siderofor miktarı 630 nm absorbans değerinde ölçülerek

bakterilerin siderofor üretim yüzdeleri belirlenmiştir. Farklı inokülasyon miktarlarındaki siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD600’de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

4.2.5. Hücresel Demir Alınımının Saptanması

Hücresel demir alınımının saptanması amacıyla hazırlanan *Bacillus cereus* ön kültürü, farklı konsantrasyonlarda FeCl₃ içeren (0, 1, 2, 5 ve 5 µM) MM9 sıvı besiyerlerine (pH 6,5) 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37 °C’de 225 rpm’de 72 s inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteri kültürlerinden 24 s aralıklarla alınan örnekler (10 ml), 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar optik emisyon spektrometresinde demir için öngörülen emisyon hattı değeri olan 238.204 nm’de okutulmuştur. Elde edilen değerler ile bakteri kültürlerinin mevcut ortamdaki demir miktarının absorblama yüzdesi hesaplanmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Optik emisyon spektrometresindeki çalışmalar GYTE Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı İnorganik Enstrümental Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı demir konsantrasyonlardaki hücre yoğunluğu ve siderofor üretimi daha önce belirtildiği şekilde ölçülmüştür.



Şekil 4.1: Optik emisyon spektrometresi.

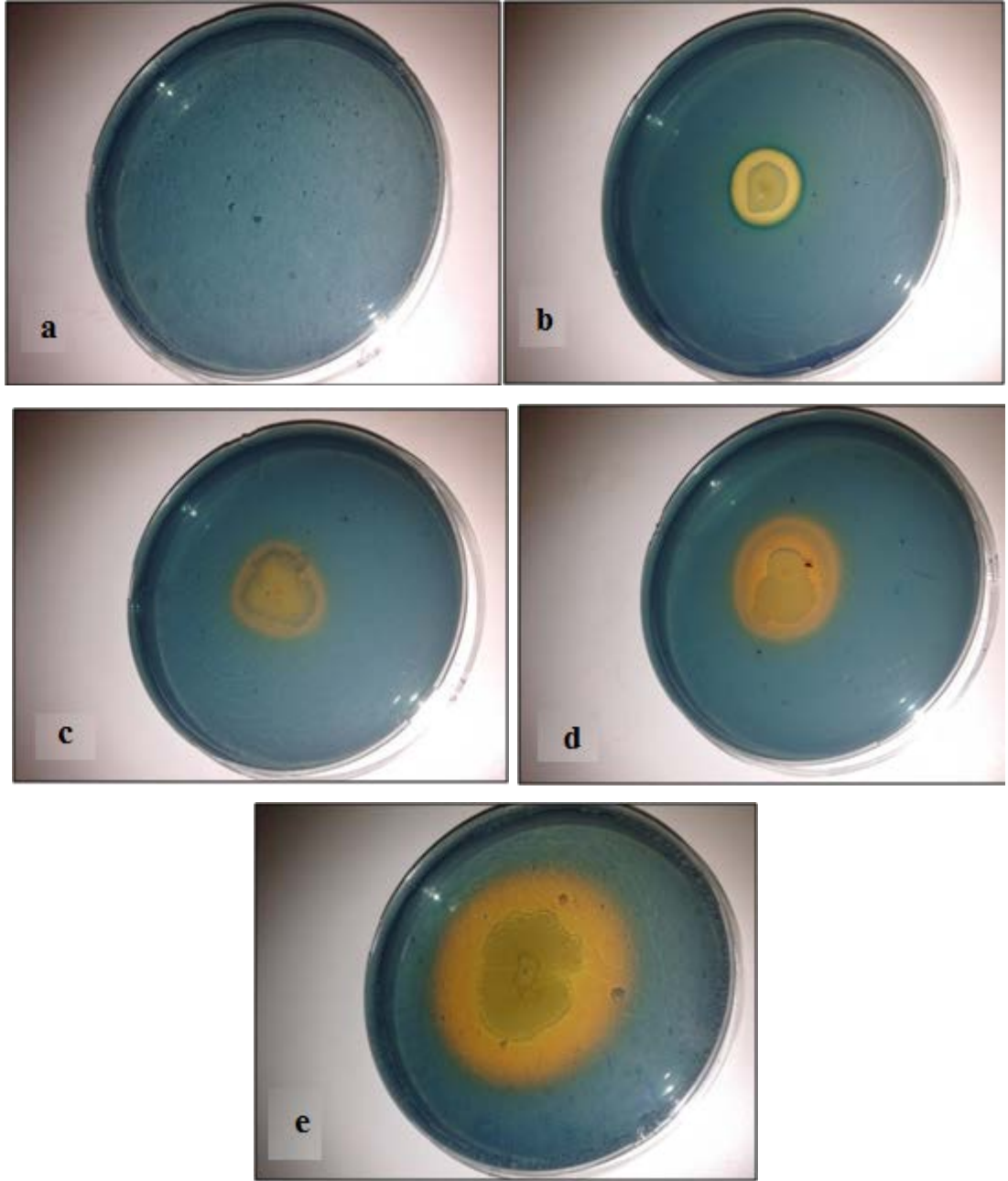
5. BULGULAR

5.1. Siderofor Üretimi

5.1.1. Chrome Azurol S Agar Deneyi

Sideroforlar düşük demir stresi altında salgılanan demir-spesifik bileşiklerdir. Öncelikle çalışmamızda siderofor üretimini belirlemek için *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 suşları CAS agar plakelere kürdanla delme ekim tekniği ile transfer edilmiştir. 168. saat sonunda siderofor üretimine bağlı olarak bakteri kolonilerinin etrafında oluşan turuncu renkli zonlar Şekil 5.1’de gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm *Bacillus* türlerinde siderofor üretimi gözlenmiştir. Siderofor üretimini kendi aralarında derecelendirdiğimizde en yüksek siderofor üretimi *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinde (8 mm), en az siderofor üretimi ise *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 (4 mm) bakterisinde gözlenmiştir (Tablo 3.1).

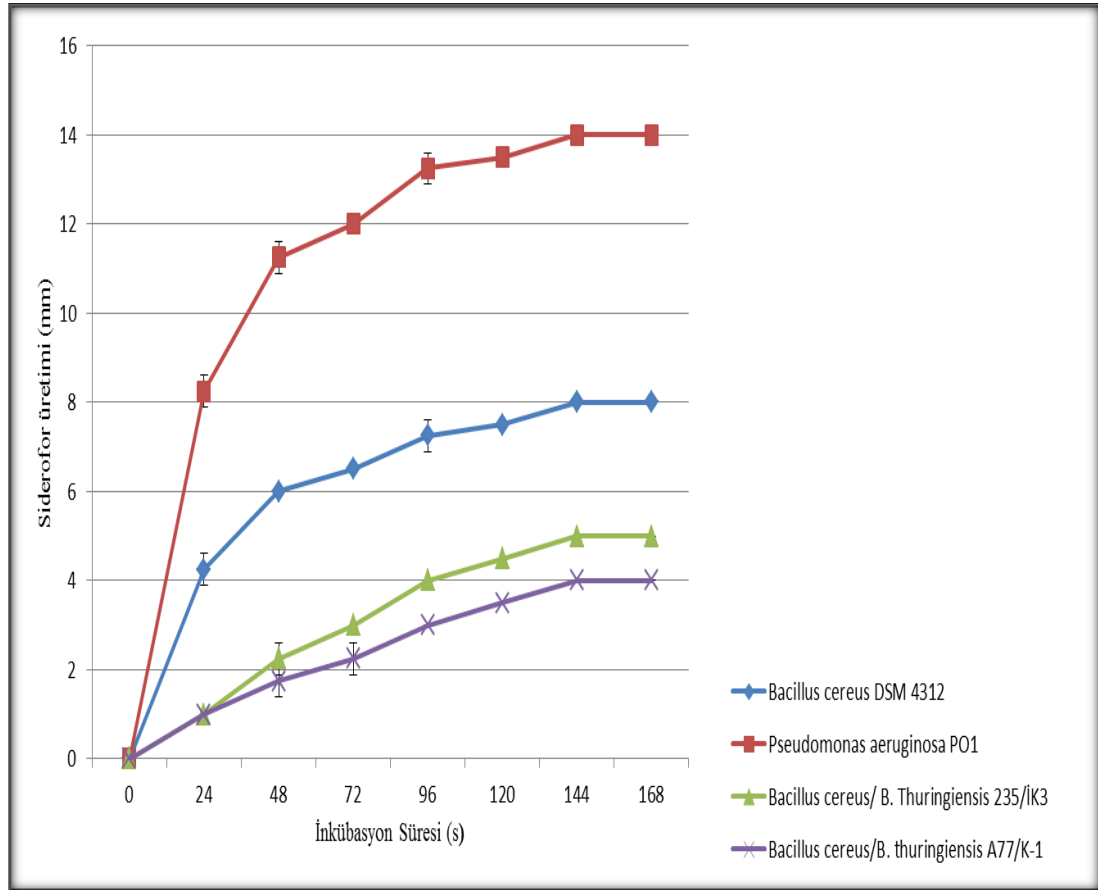
Aynı zamanda CAS agar plakelerinde büyüyen bakteri kolonilerinin siderofor üretimine bağlı olarak oluşturduğu turuncu zonların yarıçapları 24 saat aralıklarla ölçülmüştür. Siderofor üretiminin zaman bağlı grafiği Şekil 5.2’ de gösterilmiştir. Bu verilere göre *Bacillus cereus* DSM 4312, *Pseudomonas aeruginosa* PO1 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 bakterilerinin siderofor üretimi 48. saate kadar hızla artmış, 48-144 saatleri arasında ise üretim hızı yavaşlamıştır. Siderofor üretimi tüm bakteri türlerinde 144. saatten sonra sabitlenmiştir.



Şekil 5.1: Chrome azurol s agar deneyi sonuçları a) Kontrol b) *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 c) *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 d) *Bacillus cereus* DSM 4312 e) *Pseudomonas aeruginosa* PO1.

Tablo 5.1: Siderofor üretiminin CAS agarda derecelendirilmesi.

Bakteri Türleri	CAS Agar
<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	++
<i>Bacillus cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> 235/İK3	+
<i>Bacillus cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> A77/K-1	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PO1	+++
(-) 0 mm, (+) 0-5 mm, (++) 6-10 mm, (+++) 10-15mm	



Şekil 5.2: CAS agar üzerinde zamana bağlı siderofor üretimi.

5.1.2. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi

Bakteri kültürlerinin sıvı besiyerine salgıladıkları sideroforların tespiti için Chrome Azurol S sıvı deneyi yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve pozitif kontrol amaçlı kullandığımız *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterilerinde CAS solüsyonunun mavi olan rengi turuncuya dönüşmüştür ve Chrome Azurol S sıvı deneyi pozitif sonuç vermiştir. *Bacillus cereus*/*B.thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* A77/K-1 bakterilerinde ise renk değişimi gözlenmemiştir. Bakterilerin Chrome Azurol S sıvı deneyi sonucunda siderofor üretiminin derecelendirilmesi Tablo 5.1.’te gösterilmiştir.



Şekil 5.3: Chrome azurol s sıvı deneyi sonuçları a) Kontrol b) *Pseudomonas aeruginosa* PO1 c) *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* 235/İK3 d) *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* A77/K-1 e) *Bacillus cereus* DSM 4312.

Tablo 5.2 CAS sıvı deneyinde siderofor üretiminin derecelendirilmesi.

Bakteri Türleri	CAS
<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	+
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> 235/İK3	-
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> A77/K-1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PO1	+++
(-) Mavi, (+) Kırmızı-Mavi, (++) Kırmızı, (+++) Turuncu - Sarı	

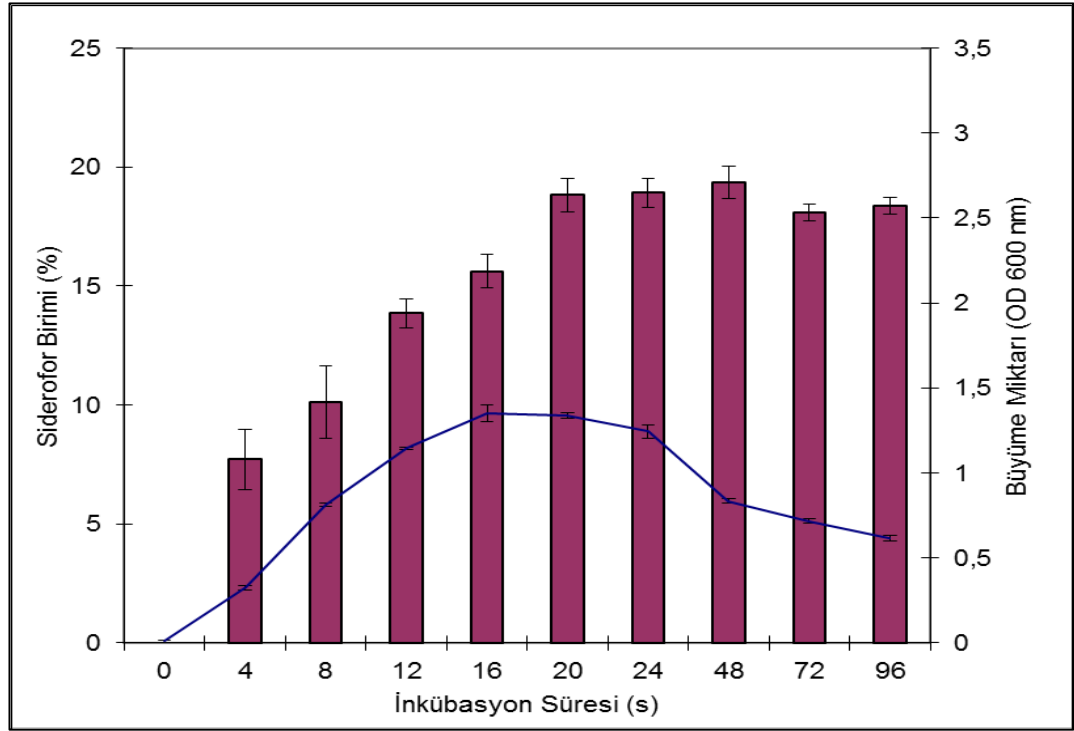
5.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi

Siderofor üretim miktarını belirlemek amacıyla CAS sıvı deneyi gerçekleştirilmiştir. Mavi olan CAS solüsyonunun turuncu renge değişimi boyadan demirin sideroforlar tarafından uzaklaştırılması sonucu gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak CAS rengindeki değişim oranı A630 nm dalga boyunda ölçülmüş ve siderofor birim yüzdesi hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre siderofor üretimi yüzdesi pozitif kontrol olarak kullandığımız *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterisinde % 87, *Bacillus cereus* DSM 4312 suşunda ise % 22.3 olarak belirlenmiştir. Denizden izole edilmiş olan *Bacillus cereus/B. thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus/B. thuringiensis* A77/K-1 bakterilerinde ise Chrome Azurol S sıvı deneyi sonucunda renk değişimi gözlenmemiş aynı zamanda 630 nm dalga boyundaki ölçümlerde sonuç elde edilmemiştir.

5.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 suşu demir içermeyen MM9 besi ortamında 96 s inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu, hücre kültürü kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Süpernatant ise siderofor konsantrasyonunu belirlemek amacıyla CAS sıvı deneyinde kullanılmış ve 630 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Büyüme eğrisinin siderofor üretimi ile ilişkisini izlemek, siderofor üretiminin başlangıcını ve en yüksek üretim zamanının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre siderofor üretimi, 16. saate kadar hücre büyümesine paralel olarak artış göstermiştir

(Şekil 5.4). 16-24 saatleri arasında hücre büyümesinin durgun evreye girmesine karşılık siderofor üretimi artış göstermiştir. 24-48 saatleri arasında ise hücre büyümesinde azalma olurken siderofor üretiminde artış gözlenmiştir. En yüksek siderofor üretimi ise hücrelerin ölüm evresine bulunduğu 48. saatte % 19,4 olarak tespit edilmiştir.

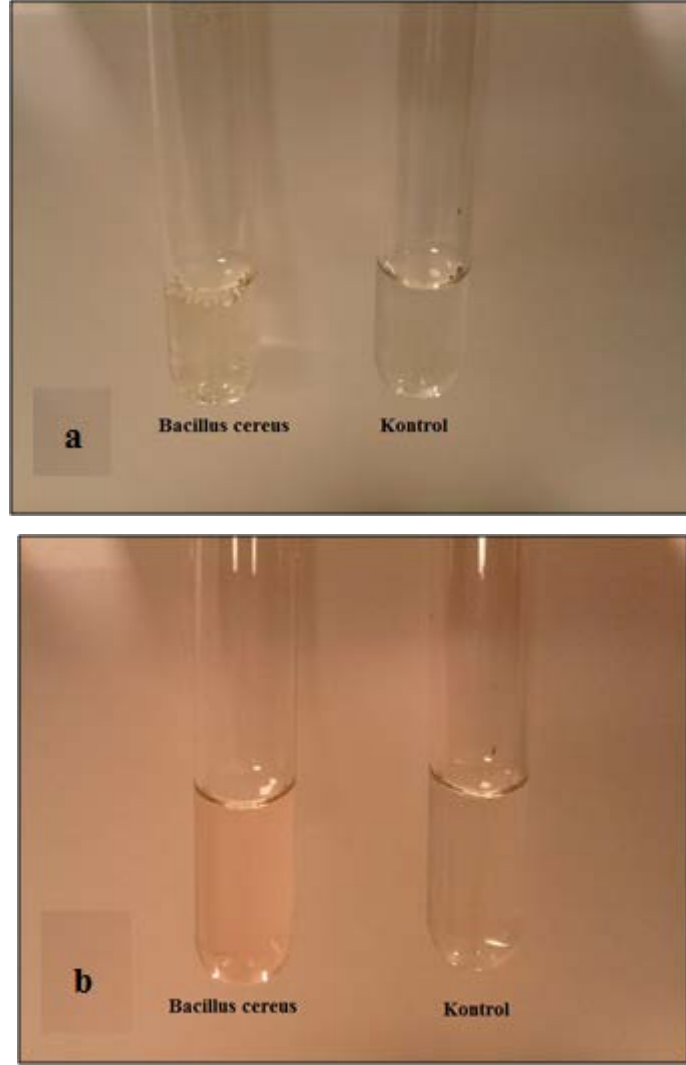


Şekil 5.4: Zamana bağlı siderofor üretimi.

5.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi

Bacillus cereus DSM 4312 bakteri suşunun hangi tip siderofor ürettiğini belirlemek amacıyla katekolat tipi sideroforlar için pozitif sonuç veren Arnow metodu ve hidroksamat tipi sideroforlar için pozitif sonuç veren Csaky metodu uygulanmıştır. Arnow metoduna göre siderofor içeren solüsyon, nitrit-molibdat ayırıcının ilave edilmesi ile sarı renge dönüşmektedir (Şekil 5.5a). Oluşan sarı renk ise fazla miktarda sodyum hidroksit varlığında turuncu-kırmızı renge dönüşmektedir. Şekil 5.5b 'de görüldüğü gibi siderofor içermeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Bacillus cereus* DSM 4312 suşunun ürettiği sideroforun katekolat

tipi olduğunu tespit edilmiştir. Arnow metoduna göre *Bacillus cereus* siderofor örneği 510 nm’de 0.038 olarak ölçülmüştür.



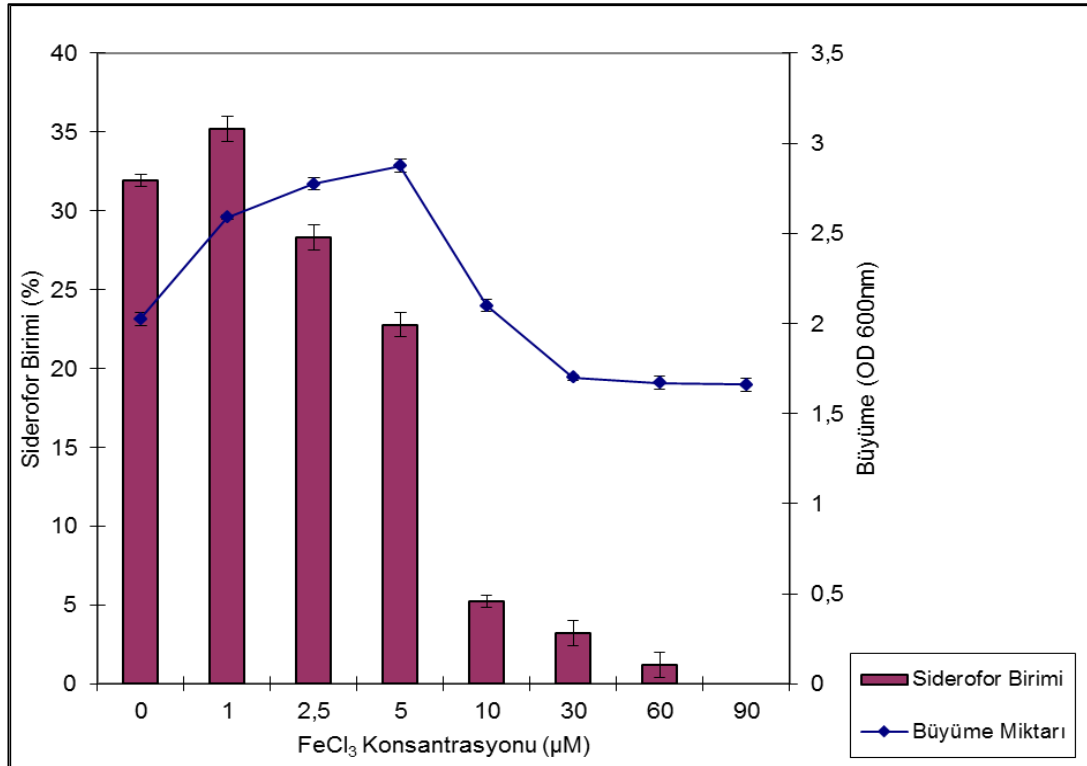
Şekil 5.5: Arnow Testi sonuçları a) Birinci aşama b) İkinci aşama

Siderofor tipinin belirlenmesi için kullandığımız ikinci test Csaky metodudur. Hidroksamat tipi sideroforların belirlenmesinde kullanılan bu method *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin ürettiği siderofor örneği ile negatif sonuç vermiştir.

5.4. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu

5.4.1. Farklı Demir Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

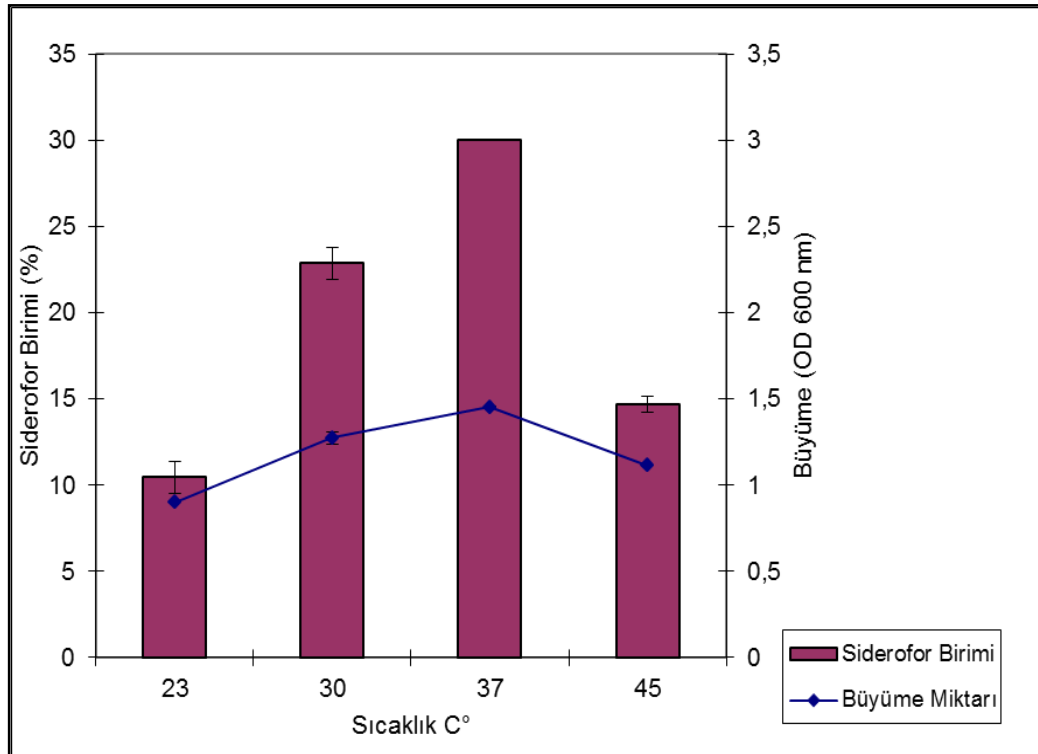
Demir konsantrasyonunun büyüme ve siderofor üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 suşu farklı oranlarda FeCl_3 içeren MM9 besi ortamında 37 °C'da 48 s büyütülmüş ve siderofor üretimi daha önce belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Farklı demir konsantrasyonlarına bağlı olarak siderofor üretimi ve hücre büyüme grafiği Şekil 5.6'da gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre maksimum siderofor üretimi (% 35,2) için optimum demir konsantrasyonu 1 μM FeCl_3 olarak belirlenmiştir. Ancak 1 μM 'ın üzerindeki demir konsantrasyonlarında hücre büyümesinde artış olmasına rağmen siderofor üretiminde azalma gözlenmiştir.



Şekil 5.6: Demir konsantrasyonlarının siderofor üretimine etkisi.

5.4.2. Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi

Sıcaklığın siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 suşu farklı sıcaklıklarda, demir içermeyen MM9 besi ortamında 48 s inkübe edilmiştir. Genel olarak *Bacillus* türleri için büyüme sıcaklığının 30-37 °C’de olduğu bilinmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre siderofor üretimi genel olarak sıcaklığa bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 5.7). 30 °C’de siderofor üretimi (23 %) 23 °C göre % 12 oranında artış gösterirken, maksimum siderofor üretimi (% 30) optimum büyüme sıcaklığı olan 37 °C’de görülmüştür. 37 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda ise siderofor üretimi % 15 oranında azalmıştır.

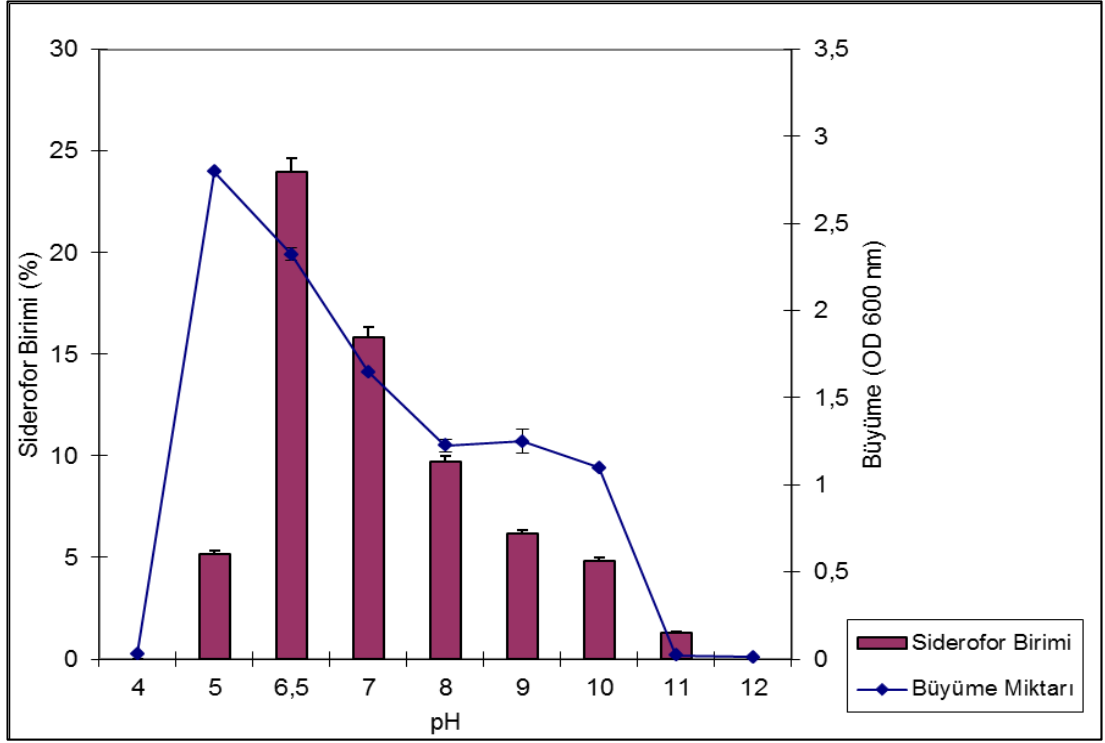


Şekil 5.7: Sıcaklığın siderofor üretimine etkisi.

5.4.3. pH’nın Siderofor Üretimine Etkisi

Yeryüzeyinde pH’nın nötralden alkaliye doğru olan aralıklarında demir çözülmüş olarak bulunmaktadır. Demirin bakteri besi ortamında da çözünürlüğü pH tarafından etkilenmektedir. Bu anlamda pH’nın büyüme ve siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 kültürleri pH 4-12

aralıklarında MM9 besi ortamlarında 48 s büyütülmüştür. Bu çalışmamızda, en yüksek hücre büyümesi siderefor üretimin az olduğu (% 5,2) pH 5,0 de gözlenirken maksimum siderofor üretimi ise % 24 olarak büyümeni azaldığı pH 6,5 de gözlenmiştir (Şekil 5.8). Hücre büyümesi ve siderofor üretimi nötral ve alkali pH değerlerinde ise hızlı bir şekilde azalmıştır.

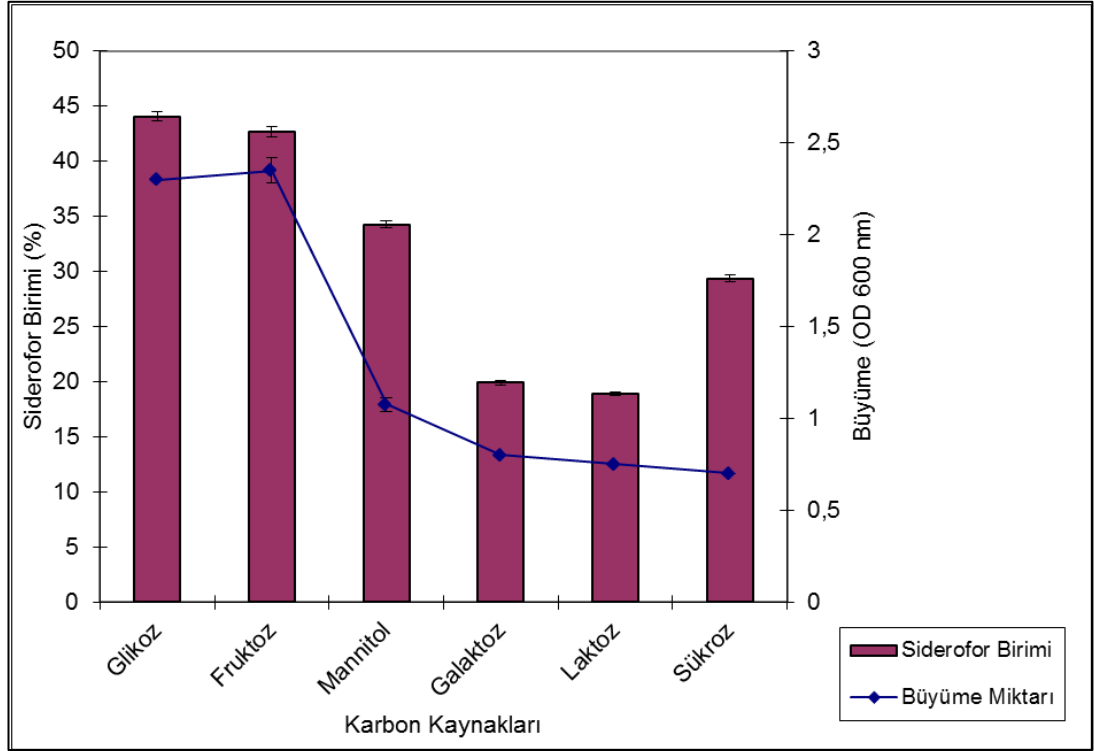


Şekil 5.8: pH'nın siderofor üretimine etkisi.

5.4.4. Karbon Kaynaklarının Siderofor Üretimine Etkisi

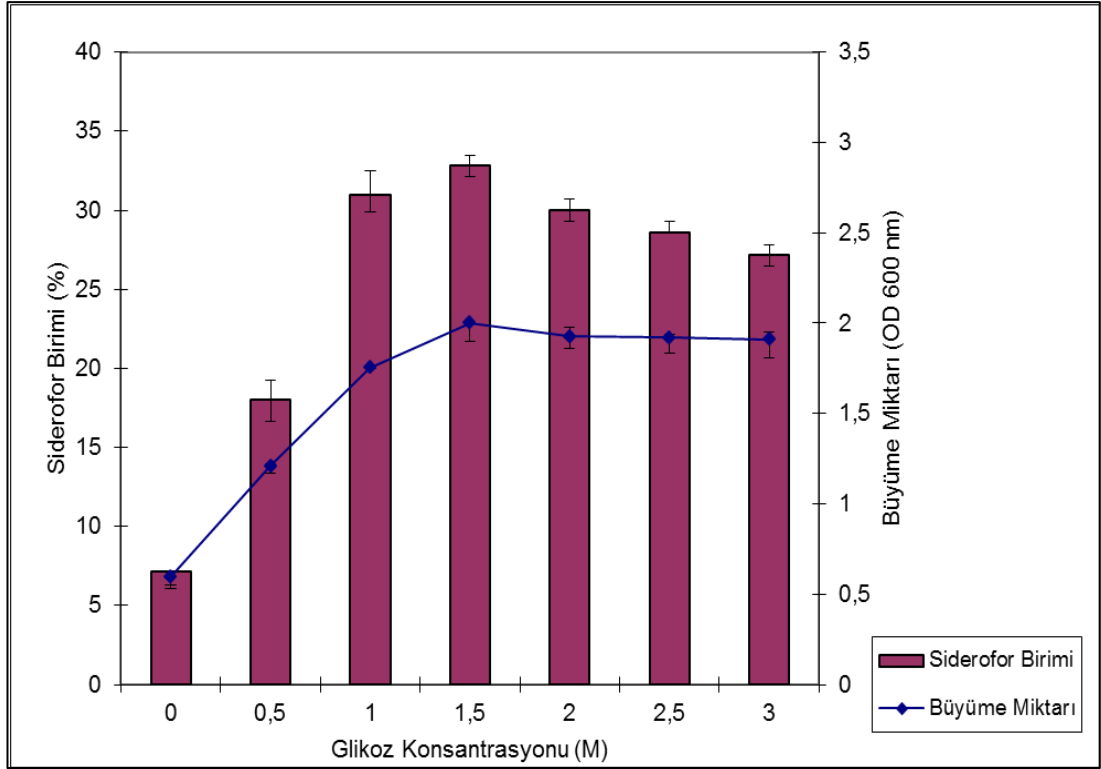
Kolaylıkla asimile edilebilen şekerler bakterinin daha hızlı büyümesini sağlamakta ve dolayısıyla siderofor gibi ikinci metabolitlerin üretimi artmaktadır. Bu amaçla, son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiş monosakkaritler (glukoz, fruktoz, galaktoz, mannitol) ve disakkaritler (laktoz, sükroz) içeren, demir içermeyen 6 farklı MM9 besiyeri hazırlanmıştır. Her bir besiyeri (pH6.5) 37 °C'de 48 s inkübe edilmiş ve siderofor ölçümü daha önce açıklandığı şekilde yapılmıştır. Monosakkaritlerden glukoz ve fruktoz hem büyümeyi (sırasıyla 2,3 ve 2,35) hem de siderofor üretimini (sırasıyla % 44 ve % 43) desteklemiştir. Ayrıca mannitol ve sükrozun ayrı ayrı bulunduğu besi ortamlarında büyüme

baskılanırken (sırasıyla 1,07 ve 0,7) siderofor üretimlerinde (sırasıyla % 34 ve % 29,4) artış gözlenmiştir (Şekil 5.9).



Şekil 5.9: Karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi.

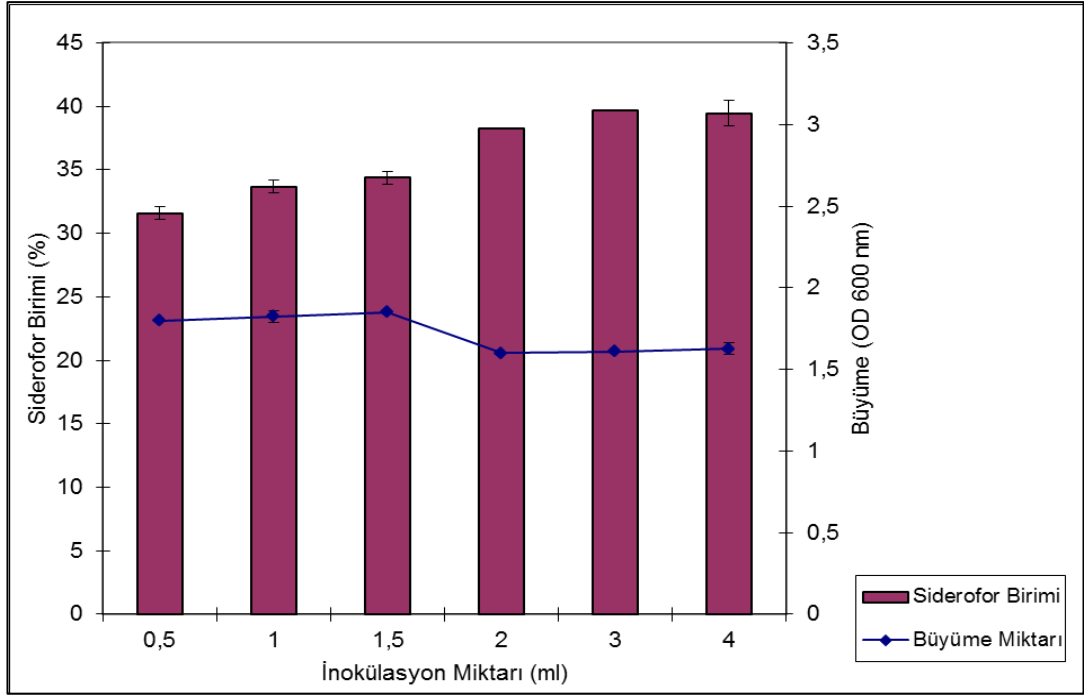
Hücre büyümesini desteklemekle beraber en yüksek siderofor üretimini sağlayan karbon kaynağı glikoz olarak tespit edilmiştir. Glikozun farklı konsantrasyonlarda büyüme ve siderofor üretimine etkisine baktığımızda, Şekil 5.10'da görüldüğü gibi maksimum büyüme (2.0) ve maksimum siderofor üretimi (% 33) 1.5 M glikoz konsantrasyonu varlığında tespit edilmiştir.



Şekil 5.10: Glikoz konsantrasyonunun siderofor üretimine etkisi.

5.4.5. İnokülasyon Miktarının Siderofor Üretimine Etkisi

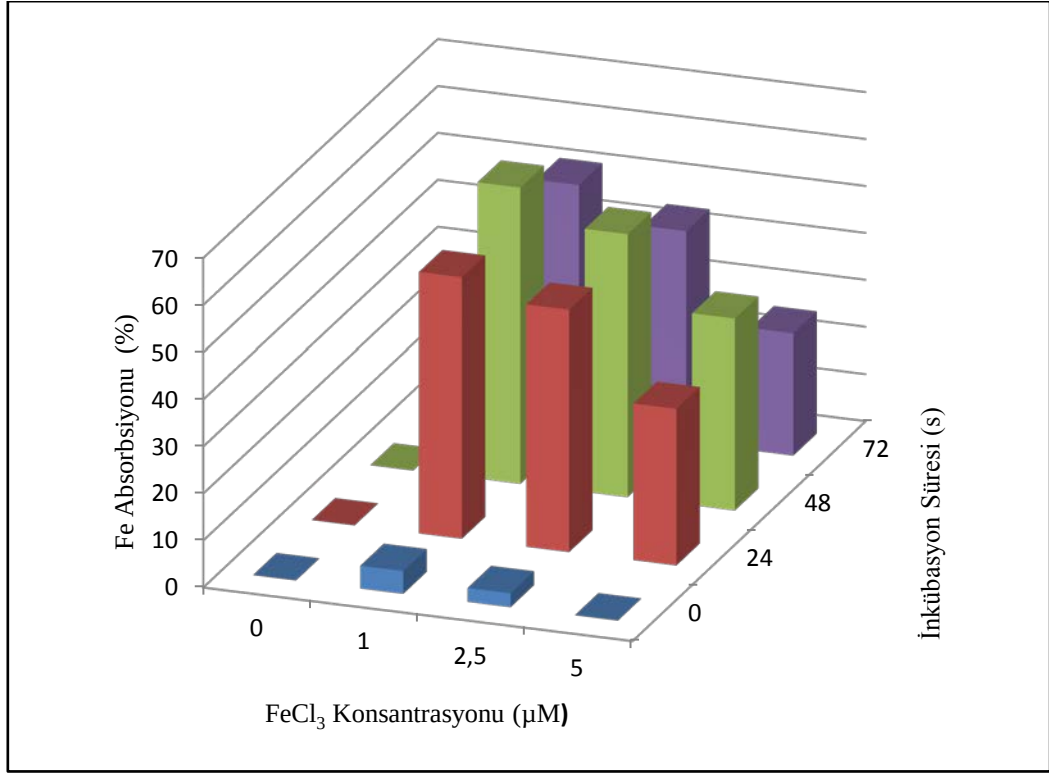
İnoküle edilen hücre miktarı, hücre büyümesini hücre yoğunluğunun hızlı bir şekilde artış gösterdiği logaritmik faza geçiş süresini etkileyerek gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu amaçla, inokülasyon büyüklüğünün siderofor üretimine etkisini belirlemek için demir içermeyen 100 ml MM9 besi ortamları farklı inokülasyon miktarları (% 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4) ile ayrı ayrı inoküle edilmiş ve 37 °C’de 48 s inkübe edilmiştir. Büyüme oranları ve siderofor ölçümü daha önce açıklandığı şekilde yapılmıştır. % 0,5-1,5 ml inokülasyon oranlarında hücre yoğunluğu aynı kalmakla beraber (yaklaşık 1,85) artan inokülasyon oranına paralel olarak kısmi siderofor artışı gözlemlenmiştir. % 2-4 ml inokülasyon oranlarında ise artan inokülasyon miktarına karşılık hücre yoğunluğunda % 0,25 oranında azalma ancak siderofor üretiminde yaklaşık % 5 oranında artış gözlemlenmiştir (Şekil 5.11).



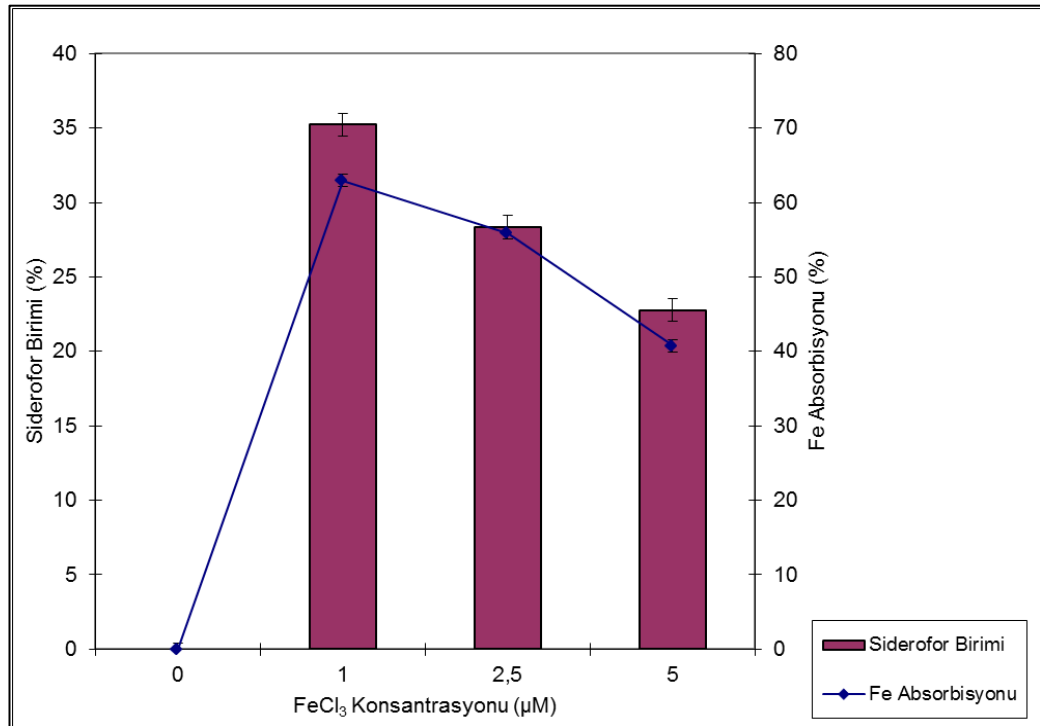
Şekil 5.11: İnokülasyon miktarının siderofor üretimine etkisi.

5.5. Hücresel Demir Alınımının Saptanması

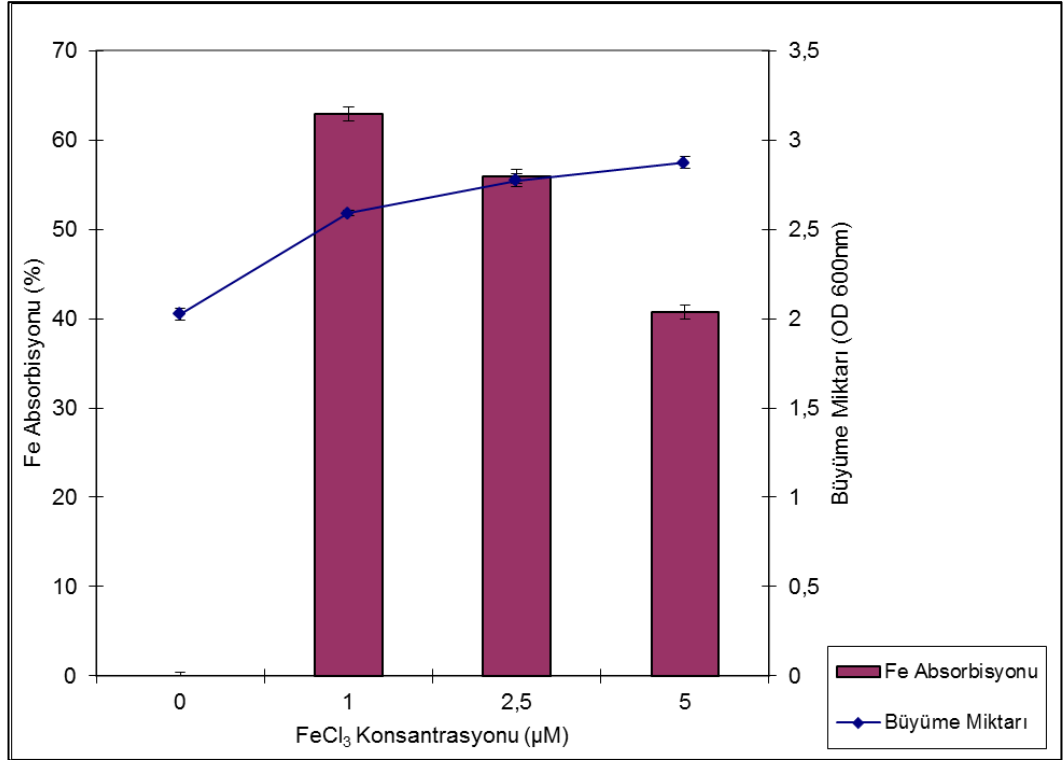
Bacillus cereus DSM 4312 suşunun farklı demir konsantrasyonlarında besi ortamına salgılanan siderofor üretimini belirlemekle beraber siderofor ile birlikte hücre içine alınan demirin miktarının saptanması için ICP-OES cihazı kullanılmıştır. ICP-OES cihazındaki ölçüm sonuçlarına göre; bakteri kültürlerin en yüksek demir alınımı 48.saate gözlenirken en az metal alınımı 72.saate saptanmıştır (Şekil 5.12). En yüksek demir alınımının 48. saatte gerçekleşmesi, maksimum siderofor üretimini belirlemek için yaptığımız araştırmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olduğu saptanmıştır. Bakteri kültürlerinin 48. saatte, farklı demir konsantrasyonlarındaki demir alınımı sonuçlarına göre en yüksek demir kazanımı 1 μM (% 63) konsantrasyondaki bakteri kültürlerinde gözlenirken en düşük demir kazanımı ise 5 μM (% 40.7) konsantrasyonda gözlenmiştir.



Şekil 5.12: Demir konsantrasyonlarına ve zamana bağlı demir alınımı.



Şekil 5.13: Demir absorbsiyonunun siderofor üretimi ile karşılaştırılması.



Şekil 5.14: Farklı demir konsantrasyonlarında büyümeye bağlı demir absorpsiyonu.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterileri tarafından üretilen sideroforun tespiti ve *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin siderofor üretimini etkileyen çevresel şartların optimizasyonunu kapsamaktadır.

Tez çalışmamızda *Bacillus* türleri tarafından üretilen sideroforların tespiti için Chrome azurol sulfonate (CAS) deneyi yapılmıştır. Deneylerimizde yüksek oranda siderofor ürettiğini bildiğimiz *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterisi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Siderofor tayini öncelikle CAS agar platelerinde gerçekleştirilmiştir ve tüm *Bacillus* türlerinde siderofor varlığını gösteren turuncu renkteki zonlar gözlemlenmiştir. Ancak CAS agar deneyi öncelikle sideroforların tespiti için bir tarama testi olduğundan bakterilerin CAS agar plateleri üzerinde oluşturdukları kolonilerin büyükleri arasındaki fark ihmal edilmiştir. CAS agar platelerinde gözlenen turuncu siderofor halkalarını derecelendirmek amacıyla 24 s aralıklarla 7 gün zon yarıçapları ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre *Pseudomonas aeruginosa* PO1 (14 mm) bakterisi ile karşılaştırdığımızda en yüksek siderofor üretimi *Bacillus cereus* DSM 4312 (8 mm) bakterisinde gözlenmiştir. *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 bakterilerinde ise oluşan zonlar sırasıyla 4 ve 5 mm olarak ölçülmüştür. CAS agar plate üzerinde zamana bağlı siderofor üretimine baktığımızda tüm *Bacillus* türlerinde siderofor üretimi 48. saate kadar hızla artmış, 48-144 saatleri arasında ise üretim hızı yavaşlamıştır. Aynı bakteriler için uyguladığımız Chrome Azurol Sulfonate (CAS) sıvı deneyinde ise sadece *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi pozitif sonuç vermiştir. Bu durumun sebebinin çok daha ayrıntılı optimizasyon deneyleri yapılması gerektiğinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Potansiyel siderofor üreten izolatların demirsiz MM9 sıvı besi ortamına salgıladıkları siderofor miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle salgılanan sideroforun CAS solüsyonundaki (1 Mm Fe solüsyonu + Piperazine buffer + HDTMA) demire yüksek afinite ile bağlanması sonucu meydana gelen renk kaybını ölçmeye dayanan CAS sıvı deneyi yapılmış ve elde edilen veriler $[(Ar - As)/Ar] \times 100$ formülü kullanılarak siderofor birim yüzdesi hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre

pozitif kontrol olarak kullandığımız *Pseudomonas fluorescens* bakterisinde % 87 oranında siderofor üretimi gözlenirken *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinde % 22.3 olarak tespit edilmiştir. *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3 ve *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1 bakterilerinde ise yaptığımız ölçümler sonucu değerlendirilecek veri elde edilememiştir. Bu nedenle tez çalışmamıza literatür taramalarına göre daha önce siderofor üretim optimizasyonu yapılmamış olan *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi ile devam edilmiştir.

Bacillus cereus DSM 4312 tarafından üretilen sideroforun kimyasal olarak karakterize edebilmek için katekol ve hidrosomat tipi sideroforların tespitinde kullanılan sırasıyla Arnow ve Csaky metodları kullanılmıştır. *Bacillus cereus* bakterisi ile daha önce Park ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bu bakterinin katekol tipi siderofor ürettiği bilinmektedir [Park et al., 2005]. Çalışmamızda *Bacillus cereus* DSM 4312 suşu ile yaptığımız Arnow testi sonuçlarına göre bu bakterinin katekol tipi siderofor ürettiğini desteklenmiştir. Csaky deneyi sonucunda ise kültür süpernatantında hidrosamat tipi siderofor tespit edilmemiştir.

Bacillus cereus bakterisinin maksimum siderofor üretim zamanını belirlemek amacıyla demir içermeyen MM9 besi ortamında büyütülerek zamana bağlı büyüme grafiği elde edilmiş ve belirli aralıklarla alınan süpernatant örnekleri kullanılarak siderofor üretim yüzdeleri hesaplanmıştır. Sideroforların büyük çoğunlukla ekspanensial fazda üretildikleri ve durgun fazda sabit olarak devam ettikleri, ilerleyen zamanla beraber bakterinin besini tüketmesi ve hücrelerin parçalanmaya başlaması sonucu siderofor konsantrasyonu düştüğü bilinmektedir [Kalinowski et al., 2000]. Yaptığımız çalışmada benzer olarak siderofor üretimi ekspanensial fazda artış göstermiştir. Hücreler 16-24. saatleri arasında durgun faza girerken siderofor üretiminde artış devam etmiştir. En yüksek siderofor üretimi ise hücrelerin ölüm evresinde bulunduğu 48. saatte % 19,4 olarak tespit edilmiştir.

Maksimum siderofor üretimi elde edebilmek için siderofor üretimini etkileyecek şartların optimizasyonu gerekmektedir. Bu amaçla demir konsantrasyonu, sıcaklık, pH, karbon kaynakları ve uygun inokülasyon miktarların siderofor üretimine etkileri araştırılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir.

Demir elementi tüm canlıların büyümesi için gerekli olan bir iz elementtir. Yüksek demir şartlarında siderofor ekspresyonunu baskıladığı fakat organizmaların büyümesi için ortamda düşük miktarda demirin gerekli olduğu bilinmektedir [Neiland et al., 1987]. Demirin büyüme ve siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek

amacıyla farklı demir konsantrasyonlarındaki MM9 besiyerlerinde büyütülen *B. cereus* bakterisinin eş zamanlı büyüme ve siderofor ölçümleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre maksimum hücre büyümesi 5 μ M demir konsantrasyonunda gerçekleştirilen en yüksek siderofor üretimi büyümenin de desteklendiği 1 μ M demir konsantrasyonunda olduğu tespit edilmiştir. 5 μ M'ın üzerindeki demir konsantrasyonlarında ise büyüme azalmakla birlikte siderofor üretimi de giderek azalmıştır. Benzer şekilde Tailor ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda *Pseudomonas fluorescens* bakterisi yüksek siderofor üretimini (% 96) 1 μ M demir konsantrasyonunda saptanmıştır. Demir konsantrasyonları artması ile birlikte siderofor üretiminde azalma belirlenmiştir. En az siderofor üretim yüzdesi 20 μ M demir içeren ortamda büyüyen bakteri kültürlerinde saptanmıştır [Tailor and Joshi, 2012]. 2012 yılında Murugappan ve arkadaşları tarafından *Pseudomonas putida* ile yapılan bir çalışmada en yüksek siderofor üretimi (% 20) 2 μ M konsantrasyonda en az siderofor üretimi ise (% 4) 16 μ M demir konsantrasyonunda gözlenmiştir [Murugappan et al., 2012]. Cabaj ve arkadaşları *Bacillus silvestris* ve *Micrococcus luteus* ile yaptığı çalışmada en yüksek siderofor miktarı 0.04 μ M demir konsantrasyonundaki en az siderofor miktarı ise 50 μ M demir konsantrasyonunda saptanmıştır [Cabaj and Kosakowska 2007].

Siderofor üretimini etkileyen çevresel etmenlerin en önemlilerinden biri sıcaklıktır. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığı aynı zamanda optimum siderofor üretiminin gözlemlendiği sıcaklıktır. Bakterilerin büyüme ortamının sıcaklığı optimum sıcaklıktan uzaklaştıkça siderofor üretiminde genel olarak bir düşüş gözlenmektedir [Tailor and Joshi, 2012]. Sıcaklığın büyüme ve siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi demir içermeyen MM9 besi ortamında farklı sıcaklıklarda 48 s büyütüldükten sonra eş zamanlı olarak büyüme ve siderofor ölçümleri yapılmıştır. En yüksek siderofor üretiminin (% 30) olduğu sıcaklık derecesi 37 °C olarak belirlenmiştir.

Demirin çözünürlüğünde pH'ın önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ve bu bağlamda ortamdaki demirin mevcudiyeti organizmanın gelişimini etkilemektedir. Nötral pH'da demir çözünmemiş durumdadır bu sebeple bakterilerin büyümesi için uygun değildir [Sayyed et al., 2011]. Ancak bu şartlarda oluşan demir stresi siderofor üretimini arttırmaktadır. Artan ve azalan pH'lar ise demirin çözünümünü arttırdığı için besi ortamındaki demir içeriğini arttırmaktadır. pH'nın büyüme ve siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312 demir

içermeyen MM9 besi ortamında 37 °C’da farklı pH’larda 48 s büyütüldükten sonra eş zamanlı olarak büyüme ve siderofor ölçümleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre pH 4’de hem büyüme hem de siderofor üretimi gözlenmezken pH 5’de maksimum büyüme gözlemlenmiştir. Maksimum siderofor üretimi (% 24) ise pH 6.5 olarak tespit edilmiştir. Beklenildiği gibi artan pH değerlerine paralel olarak demir çözünürlüğünün artmasıyla siderofor üretiminde ve büyümede azalma gözlemlenmiştir. En düşük siderofor üretimi (% 1.3) ise pH 11 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde pH 5’de demir çözünürlüğünün artması bakterinin demir kazanımını arttırmış dolayısıyla büyümeyi de arttırmıştır. Nagar ve arkadaşlarının *Pseudomonas aeruginosa* ile yaptığı çalışmada maksimum siderofor üretiminin pH 7 olduğu belirlenmiştir [Nagar et al., 2011]. Benzer olarak Tailor ve arkadaşlarının *Pseudomonas fluorescens* ile yaptığı çalışmada en yüksek siderofor üretimi pH 7, en az siderofor üretimi ise pH 5 olarak belirlenmiştir [Tailor and Joshi, 2012].

Karbon kaynağının yapısı siderofor üretimini düzenleyen demir ihtiyacı belirlemektedir. Kolay asimile edilebilen şekerler hızlı büyümeye sebep olmakta ve dolayısıyla siderofor üretimi artmaktadır [Tailor and Joshi, 2012]. Karbon kaynaklarının büyüme ve siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus* DSM 4312, farklı karbon kaynağı içeren demirsiz MM9 besi ortamında 37 °C’da 48 s büyütüldükten sonra eş zamanlı olarak büyüme ve siderofor ölçümleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre glikoz ve fruktoz gibi monosakkaritleri içeren besi ortamlarında siderofor üretimi (sırasıyla % 44 ve % 43) büyümeye paralel olarak artış göstermiştir. Diğer bir monosakkarit olan mannitol varlığında ise hücre büyümesi baskılanmakla beraber siderofor üretimi (% 34) artmıştır. En düşük siderofor üretimi ise bir dissakkarit olan laktoz (% 19) varlığında saptanmıştır. Benzer olarak, Sridevi ve arkadaşlarının *Sesbania procumbens* bakterisi ile yaptıkları çalışmada, en yüksek siderofor üretimi mannitol (% 19) varlığında gözlenirken en düşük siderofor üretimi ise sükroz (% 10) varlığında saptanmıştır [Sridevi et al., 2008]. *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan bir çalışmada ise en yüksek siderofor üretim yüzdesi glikoz varlığında tespit edilmiştir. En düşük siderofor üretimi ise mannitol içeren bakteri kültürlerinde belirlenmiştir [Tailor and Joshi, 2012].

Bacillus cereus DSM 4312 bakterisinin en yüksek siderofor üretimi gösterdiği C kaynağı olarak tespit ettiğimiz glikozun hangi konsantrasyonlarda maksimum siderofor ürettiğini belirlemek amacıyla farklı glikoz konsantrasyonlarında siderofor

ölçümleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre maksimum siderofor üretimi 1.5 M (% 33) glikoz varlığında en düşük siderofor üretimi ise glikoz içermeyen besiortamında (% 7.2) gözlenmiştir.

İnoküle edilen hücre miktarı, hücre büyümesini hücre yoğunluğunun hızlı bir şekilde artış gösterdiği logaritmik faza geçiş süresini etkileyerek gerçekleştirdiği bilinmektedir. Buna bağlı olarak siderofor gibi sekonder metabolitlerin üretimini etkilemektedir. Bu amaçla demir içermeyen MM9 besiortamları farklı miktarlarda önkültür ile inoküle edilmiştir. Bu sonuçlara göre, % 2-4 oranındaki inokülasyon miktarlarında hücre büyümesi ve siderofor üretiminde büyük bir değişiklik gözlenmemekle beraber % 0.5-1.5 oranındaki inokülasyon mikralarına göre hücre büyümesindeki azalmaya rağmen siderofor üretiminde kısmi artış görülmüştür.

Bakteri hücrelerinde siderofor üretimine paralel olarak demirin siderofor ile kompleks oluşturması sonucu hücre besiyerindeki demirin azalması beklenmektedir. Hücre besiyerindeki demirin siderofor tarafından uzaklaştırıldığını desteklemek amacıyla optical emission spectroscopy (ICP-OES) kullanılarak farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda ortamdaki demir miktarlarının ölçümü yapılmıştır. *Bacillus cereus* DSM 4312 bakteri kültürlerinin; farklı demir konsantrasyonlarında siderofor üretimine bağlı demir miktarlarındaki değişimin belirlenmesi amacı ile ICP-OES cihazı kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarına göre, en yüksek Fe absorpsiyonu siderofor üretimin de maksimum olduğu 48. saate gözlenmiştir. Farklı demir konsantrasyonlarında 48. saate en yüksek demir alınımına baktığımızda en yüksek demir absorpsiyonu yine maksimum siderofor üretiminin gözlendiği 1 µM Fe konsantrasyonunda (% 63) gözlenmiştir. Aynı zamanda artan demir konsantrasyonuna paralel olarak Fe absorpsiyonu azalmıştır. Fe absorpsiyonunun hücre büyümesiyle ilişkisine baktığımızda ise Fe konsantrasyonu arttıkça hücre büyümesine rağmen Fe absorpsiyonu ve siderofor üretimi azalmıştır. Sonuç olarak artan demir konsantrasyonuna bağlı olarak hücre demire olan ihtiyacı azalacağından dolayı siderofor üretimine gerek duymamaktadır.

Tez çalışması kapsamında sonuç olarak; *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* 235/İK3, *Bacillus cereus*/B. *thuringiensis* A77/K-1, *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterilerinde Chrome Azurol S testi pozitif olarak sonuç vermiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 Chrome Azurol S Liquid testi pozitif sonuç vermiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinin siderofor üretimi için optimum koşullar; 37°C’de, pH 6.5’ta, 1.5 M

glikoz varlığında, 3/100 oranında inoküle edildiğinde 1 μ M demir konsantrasyonunda 48. saat olarak belirlenmiştir. *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisi Arnow testine pozitif, Csaky testine ise negatif sonuç vermiştir ve dolayısı ile katekol tipi siderofor ürettiği desteklenmiştir. Hücresel demir alınımı sonuçlarına göre; en yüksek demir kazanımı 48. saatte 1 μ M demir konsantrasyonunda saptanmıştır.

KAYNAKLAR

Ackerley D. F., Caradoc-Davies T. T., Lamont, I. L., (2003), "Substrat especificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Bacteriology*, 185, 2848-55.

Arnou L. E., (1937), "Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures" *The Journal of Biological Chemistry*, 118(10), 531-537.

Barekzi, N., Joshi S., Irwin S., Ontl T., Schweizer, H. P., (2004), "Genetic characterization of *pcpS*, encoding the multifunctional phosphopantetheinyl transferase of *Pseudomonas aeruginosa*", *Microbiology*, 150, 795-803.

Bergeron L., Burne R.A., (2001), "Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism", *Infection and Immunity*, 69, 5395–5402.

Bezbaruah B., Saikia N., (1998), "Influence of Metals on Siderophore Production by *Azotobacter chroococcum* RRLJ 203" *Indian Journal of Experimental Biology*, 36, 680-687.

Boukhalfa H., Crumbliss A.L., (2002), "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport", *BioMetals*, 15(22), 325-339.

Bruland K.W., Donat J.R., Hutchins D.A., (1991), "Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters", *limnology and oceanography*, 36(5), 1555-77.

Butler A., Theisen R. M., (2011), "Iron(III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores", *Coordination Chemistry Reviews*, 254(3-4), 288–296.

Cabaj A., Kosakowska A., (2007), "Iron-dependent growth of and siderophore Production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea", *Microbiological Research*, 164(3), 570-577.

Capon R.J., Stewart M., Ratnayake R., Lacey E., Gill J.H., (2007), "Citromycetins and bilains A–C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp", *Journal of Natural Products*, 70, 1746-1752.

Carrillo-Castaneda G., Munoz J.J., Peralta-Valderrama J.R., (2005), "A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron", *Microchemical Journal*, 81, 35-40.

Cendrowski S., MacArthur W., Hanna P., (2004), "Bacillus anthracis requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence", *Molecular Microbiology*, 51, 407–417.

Challis G. L, (2005), "A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases", *ChemBioChem*, 6, 601-11.

Chaudhari B.L., Rane M.R., Chincholkar S.B., (2007), "Microbial Siderophores in Human and Plant Health-Care" *Soil Biology & Biochemistry*, 12, 205-242.

Chincholkar S.B., Rane M.R., Chaudhari B.L., (2005), "Siderophores their biotechnological applications", *Biotechnological applications*, 11(45), 177-198.

Clarke T. E., Ku S. Y., Dougan D. R., Vogel H. J. Tari L.W., (2000), "The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome", *Nature Structural & Molecular Biology*, 7, 287-291.

Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M. A., Brick, P., (1997), "Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin" *S. Embo J*, 16, 4174-4183.

Cornelis P., Andrews S.C., (2010), "Iron uptake and homeostasis in microorganisms", *National Academies Press*, 978, 65-73.

Cornelis P., Matthijs S., (2007), "Pseudomonas Siderophores ve their Biological Significance", *Soil Biology & Biochemistry*, 12, 193-203.

Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moënné-Loccoz Y., (2009), "Pseudomonas fluorescens and closely-related fluorescent Pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens", *Letters in Applied Microbiology*, 48, 505-512.

Crosa J.H., Walsh C.T., (2002), "Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(33), 223-49.

Csaky T. Z., (1948), "On the estimation of hydroxylamine in biological materials" *Acta Chemica Scandinavica*, 2, 450-454.

Dave B.P., Dube H.C., (2000), "Detection and chemical characterization of siderophores of rhizobacterial fluorescent pseudomonads", *Indian Phytopathol*, 53, 97-98.

Del Olmo A., Caramelo C., SanJose, C., (2003) "Fluorescent complex of pyoverdine with aluminum", *The Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 384-387.

Dhungana S., Anderson D. S., Mietzner T. A., Crumbliss A. L., (2005), " Kinetics of iron release from ferric binding protein (FbpA):mechanistic implications in bacterial periplasm-to-cytosol Fe³⁺ transport", *Biochemistry*, 44, 9606-9618.

Dhungana S., Taboy C. H., Zak O., Larvie M., Crumbliss A. L., Aisen, P., (2004), "Redox properties of human transferrin bound to its receptor", *Biochemistry*, 43, 205-209.

Drake E. J., Cao J., Qu J., Shah M. B., Straubinger R. M., Gulick A. M., (2007), "The 1.8 Å crystal structure of PA2412, an MbtH-like protein from the pyoverdine cluster of *Pseudomonas aeruginosa*", *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 20425-20434.

Duncan R., Harvie S.V., James R. S., David J. E., (2005), "Bacillus cereus Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence", *Microbiology*, 151, 569-577.

Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Muller D., Illmer P., Haas H. (2006), "The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination ve sexual development in *Aspergillus nidulans*", *Eukaryot Cell*. 5, 1596-1603.

Eppink M. H., Bunthol C., Schreuder H. A., Van Berkel W. J., (1999), "Phe161 and Arg166 variants of p-hydroxybenzoate hydroxylase Implications for NADPH recognition and structural stability", *FEBS Lett* 443, 251-255.

Eppink M. H., Schreuder H. A., Van Berkel W. J., (1995), "Structure and function of mutant Arg44Lys of p-hydroxybenzoate hydroxylase implications for NADPH binding", *European Journal of Biochemistry*, 231, 157-165.

Eppink M. H., Schreuder H. A., Van Berkel W. J., (1997), "Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding", *Protein Science*, 6, 2454-2458.

Eppink M. H., Schreuder H. A., Van Berkel, W. J., (1998), "Lys42 and Ser42 variants of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens* reveal that Arg42 is essential for NADPH binding", *European Journal of Biochemistry*, 253, 194-201.

Ferguson A.D., Koedding J., Walker G., Bos C., Coulton J.W., Diederichs K., Braun V., Welte W., (2001), "Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA", *Structure (Camb.)*, 9(45), 707-716.

Fischbach M. A., Walsh C. T., (2006), "Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms" *Chemical Reviews*, 106, 3468-3496.

Francis J., Madinaveitia J., Macturk H. M., Snow G. A., (1949), *Nature*, 163, 365-366.

Geoffroy V. A., Fetherston J. D., Perry, R. D. (2000), "Yersinia pestis YbtU and YbtT are involved in synthesis of the siderophore yersiniabaktin but have different effects on regulation", *Infection and Immunity*, 68, 4452-4461.

Hammer N.D., Skaar E.P., (2011), "Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition", *The Annual Review of Microbiology*, 65, 129-147.

Heinrichs D. E., Rahn A., Dale S. E., Sebulsky M. T., (2004), "Iron Transport in Bacteria: Molecular Genetics, Biochemistry, Bacterial Pathogenesis and Ecology. Washington, DC: American Society for Microbiology 25, 325-330.

Higgins D., Thompson J., Gibson T., (1994), "improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

Higgs P.I., Letain T.E., Merriam K.K., Burke N.S., Park H., Kang, C., Postle K. (2002), "TonB interacts with non-receptor proteins at the outer membrane of *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 184, 1640-1648.

Holinsworth B., Martin J., (2009), "Siderophore production by marine-derived fungi", *BioMetals*, 22(12), 625-632.

Hotta K., Kim C-Y., Fox D.T., Koppisch A.T., (2010), "Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains", *Microbiology*, 156, 1918-1925.

Jimenez P.N., Koch G., Papaioannou E., Wahjudi M., (2010), "Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions", *Microbiology*, 156, 49-59.

Johnson P.A., Bebington G.B., Landa A.S.M., Anthony S., Mckay V.A., (2003), "Deodorant products" United States Patent, 6, 490-495.

Kalaylı E., Beyatlı Y., (2003), "Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA 'ları", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12), 24-35.

Kalkan S., Halkman K., (2006), "Bacillus cereus ve içme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(1), 1-11.

Keating T. A., Marshall C. G., Walsh C. T., Keating A. E., (2002). "The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains", *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 522-526.

Koppisch A. T., Hotta K., Fox D. T., Ruggiero C. E., Kim, C. Y., Sanchez T., Iyer S., Browder C. C., Unkefer P. J., other authors (2008), "Biosynthesis of the 3,4-dihydroxybenzoate moieties of petrobaktin by *Bacillus anthracis*", *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 5759-5765.

Koster W., (2001), "ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12", *Research in Microbiology*, 152(25), 291-301.

Kraemer S.M., (2004), "Iron oxide dissolution and solubility in presence of siderophores", *Aquatic Sciences*, 66, 3-18.

Krewulak K. D., Vogel H. J., (2008), "Structural biology of bacterial iron uptake", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781-1804.

Larsen R.A., Thomas M.G., Postle K., (1999), "Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB", *Molecular Microbiology*, 31, 1809-1824.

Lesuisse E., Blaiseau P.L., Dancis A., Camadro J.M., (2001), "Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology*, 147, 289-298.

Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C., (2002), "The E-coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism" *Science Citation Index*, 296, 1091-1098.

Madigan M., Martinko J., (2005), "Brock Biology of Microorganisms", 13th edition, Kindle Edition.

Mark G.L., Morrissey J.P., Higgins P., O'Gara, F., (2006), "Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications", *FEMS Microbiology Ecology*, 56(11), 167-177.

Martinez J.S., Franklin J.N.C., Mann E.L., Martin J.D., Haygood M.G., Butler A. (2003), "Structure and membrane affinity of a suit of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3554-3759.

Martinez J.S., Zhang G.P., Holt P.D., Jung H.T., Carrano C.J., Haygood M.G., Butler A., (2000), "Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria", *Science*, 287, 1245-1247.

May J. J., Kessler N., Marahiel M. A., Stubbs M. T., (2002), "Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12120-12125.

May J. J., Wendrich T. M., Marahiel M. A. (2001) "The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibaktin", *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 7209-7217.

Miethke M., Klotz O., Linne U., May J. J., Beckering C. L., Marahiel M. A., (2006), "Ferri-bacillibaktin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*" *Molecular Microbiology*, 61, 1413-27.

Miethke M., Marahiel M. A., (2007), "Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(55), 413-451.

Miller M. J., (2008), “Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery)”, Doctor of Philosophy thesis, University of Notre Dame.

Modi P., Kaur A., Kaur M., V.K. Kapoor, (2012), “Siderophores: A Novel Approach for Iron Removal “, International journal of universal pharmacy and bio sciences, 2, 628-636.

Mohandass C., (2004) “Bacterial Siderophores and their Biotechnological applications”, Marine Microbiology: Facets & Opportunities; Ramaiah, 21, 169-174.

Montesinos E., Bonaterra A., Badosa E, Francâç J., Alemany J., Llorente I., Moragrega C., (2002a), “Plantmicrobe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control”, International Microbiology, 5(15), 169–175.

Murugappan R.M., Karthikeyan M., Aravinth A., Alamelu M.R., (2012), “Siderophore-Mediated Iron Uptake Promotes Yeast–Bacterial Symbiosis”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 168, 2170-2183.

Nagar S., Road M., (2011), Evaluation of siderophore produced by different clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*”, International Journal of Microbiology Research, 3, 131-135.

Nagarajkumar M., Bhaskaran R., Velazhahan R., (2004), “Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen” Microbiological Research, 159, 73-81.

Neilands J. B., (1981), “Microbial iron compounds”, Annual Review of Biochemistry, 50, 715-731.

Neilands J. B., (1995), “Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds”, The Journal of Biological Chemistry, 270, 26723-26726.

Nikaido H. (2003), “Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited”, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(12), 593-656.

Ollinger J., Song K. B., Antelmann H., Hecker M., Helmann J. D., (2006), “Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*”, Journal of Bacteriology, 188, 3664–3673.

Ozan S., Maden S., (2010) “Funguslarda Siderofor oluşumu” Selçuk Tarım ve Gıda Bilim Dergisi, 24, 118-124.

Park R-Y., Choi M-H., Sun H-Y., Shin S-H., (2005), “Production of Catechol-Siderophore and Utilization of Transferrin-Bound Iron in *Bacillus cereus*”, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 28(5), 1132-1135.

Payne S. M., (1994), “Detection, isolation and characterization of siderophores Methods”, Methods in Enzymology, 235, 329-342.

Philpott C.C., Protchenko O., (2008), "Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*", *Eukaryotic Cell*, 7, 20-27.

Quadri L. E., (2000), "Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases", *Molecular Microbiology*, 37, 1-12.

Ratledge C., Dover L.G., (2000), "Iron metabolism in pathogenic bacteria", *The Annual Review of Microbiology*, 54(3), 881-941.

Ratul S., Nabaneeta S., Robert S.D., Lorelle L.B., (2012), "Microbial Siderophores" *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-15

Raymond K.M., ve Denz E., (2004), "Biochemical and Physical Properties of Siderophores", *Iron Transport in Bacteria*, 10, 3-17.

Reimann C., Patel H. M., Serino L., Barone M., Walsh C. T., Haas D., (2001), "Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Bacteriology*, 183, 813-20.

Rowland B. M., Taber H. W., (1996), "Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: regulation and involvement in the biosyntheses of menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoate", *Journal of Bacteriology*, 178(3), 854.

Sahu G., Sindhu S., (2011), "Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp", *Research Journal of Microbiology*, 6, 735-749.

Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D. H., (1998), "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins" *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806.

Schreuder H. A., Van der Laan J. M., Hol W. G., Drenth J., (1988), "Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with its reaction product 3,4-dihydroxybenzoate", *The Journal of Molecular Biology*, 199(40), 637-48.

Schwyn B., Neilands J. B., (1987), "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores", *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.

Siebert M., Severin K. Heide L. (1994), "Formation of 4- hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase", *Microbiology*, 140(40), 897-904.

Silke R., Muhsin Ö., Bernd A., Christophe B., Heinz E., Daniela J., Gudrun H., Fabian H., Georg P., Roland G., Herbert N., (2006), "Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria Isolated from wild great apes from côte d'Ivoire and Cameroon", *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5333.

Skaar E.P., (2010), "The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts" *PLOS Pathogens*, 6, 12-15.

Sridevi M., Kumar K.G., Mallaiah K.V., “Production of catechol-type of siderophores by *Rhizobium* sp. Isolated from stem nodules of *sesbania procumbens* (Roxb) W and A”, *Research Journal of Microbiology*, 3, 282-287.

Stehr M., Diekmann H., Smau L., Seth O., Ghisla S., Singh M., Macheroux P., (1998), “A hydrophobic sequence motif common to Nhydroxylating enzymes”, *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 56-57.

Sunita S., Lakshminarayana, K., Gupta P.P., Suneja S. (1994) “Role of *Azotobacter chroococcum* Siderophores in Control of Bacterial Rot and Sclerotinia rot of Mustard”, *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 24, 202-205.

Syed S.A., Vidhale N.N., (2011), “Evaluation of siderophore produced by different clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*”, *International Journal of Microbiology Research*, 3(2), 131-135.

Tailor A.J., Joshi B.H., (2012), “Characterization and optimization of siderophore production from *pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere”, *Journal of Environmental Research And Development*, 6, 25-30.

Tam R., Saier Jr M.H., (1993), “Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria”, *Microbiological Reviews*, 57, 320-346.

Thariath A., Socha D., Valvano M. A., Viswanatha T., (1993), “Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the *IucD* protein (lysine:N6-hydroxylase) encoded by the *pColV-K30* aerobaktin gene cluster”, *Journal of Bacteriology*, 175, 589-96.

Thomashow L.S., Weller D.M., (1995), “Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1, 187-235.

Vessey J.K., (2003), “Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers”, *Plant and Soil*, 255, 571-586.

Walsh U.F., Morrissey J.P., O’Gara F., (2001), “*Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation”, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 289-295.

Web 1, (2005), <http://www.bio-pro.de/magazin/umfeld/archiv2005/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/02983/index.html>, (Erişim Tarihi: 20/01/2014)

Weller D.M., (2007), “*Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years”, *Phytopathology*, 97, 250-256.

Whipps J.M., (2001), “Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere”, *The Journal of Experimental Botany*, 52(10), 487-511.

Winkelmann G., (2002), "Microbial siderophore mediated transport", *Biochemical Society Transactions*, 30, 691-696.

Wu J. G. W., Luther, III, (1996) "Spatial and temporal distribution of iron in the surface water of the northwestern Atlantic Ocean", *Geochimica Cosmochimica Acta*, 60(3), 2729-2741.

You M.X., Zhang H.P., Hu C.Q., (2008), "Isolation and Characterization of Three Siderophores from Marine Bacteria", *Chinese Journal of Chemistry*, 26(3), 1332-1334.

ÖZGEÇMİŞ

Enis GÜNEY, 10 Ekim 1987’de Bursa’da doğdu. 2005 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladıktan sonra Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Yüksek lisans eğitime halen devam etmektedir.