

## VAN GÖLÜ SUYUNUN BAZI BAKTERİ SUŞLARI ÜZERİNE SINIRLAYICI ETKİSİ

Erdal ÖĞÜN, Ekrem ATALAN, Kerem ÖZDEMİR

Yüzüncü Yıl Üniv., Fen-Ed. Fak., Biyoloji Bölümü, Kampüs-Van

**ÖZ:** Bu araştırmada; Van Gölü Suyunun *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *E. coli* ATCC 11230, *Bacillus cereus* CCM99 ve göl suyundan izole edilen alkalotolerant mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile kalitatif olarak belirlendi. Ayrıca aynı suşlara ilave olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve gölden izole edilen alkalotolerant *Bacillus* sp. izolatlarının göl suyu ile hazırlanan Tryptic Soy Broth (TSB); (Merck 1.05459) besiyerlerine ekildi. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılan tüplerin absorbans değerleri Shimadzu UV-1201 model Spektrofotometre ile 600nm dalga boyunda belirlendi. Göl suyunun *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *E. coli* ATCC 11230, *Bacillus cereus* CCM99 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 üzerinde antimikrobiyal aktiviteye gösterdiği belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** Van Gölü, Antimikrobiyal Aktivite, Alkalotolerant Bakteriler

**ABSTRACT:** *In this study, antimicrobial activity of water of Van Lake were determined against Staphylococcus aureus ATTC 25923, E. coli ATCC 11230, Bacillus cereus CCM99 and alkalotolerant microorganisms isolated from water of the lake using disc diffusion technique. In addition to these strains, Enterococcus faecalis ATCC 29212 and alkalotolerant Bacillus sp. isolated from the lake were inoculated on Tryptic Soy Broth (TSB); (Merck 1.05459) prepared with water of the lake. Absorbans of tubes incubated at 37°C for 24 hour were determined at 600nm using Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201 model Spektrofotometre). It determined that the lake water has antimicrobial activity on Staphylococcus aureus ATTC 25923, E. coli ATCC 11230, Bacillus cereus CCM99 and Enterococcus faecalis ATCC 29212*

**Keywords:** Lake Van, Antimicrobial Activity, Alkalotolerant Bacteria

### 1. GİRİŞ

Van Gölü 607 km<sup>3</sup>'lük hacmi, 3.570 km<sup>2</sup>'lik alanı ile dünyanın sodalı göller arasında dördüncü büyük gölü olup, maksimum derinliği 450 m, deniz seviyesinden yüksekliği 1.648 m, pH'sı 9.7-9.8 arasında ve tuzluluk oranı 2.17mg/lt'dir (Kempe vd., 1991). Van Gölünden çeşitli araştırmacılar tarafından Alkalofilik *Bacillus* türlerinin izolasyonu yapılmış, bazı bölgelerinin koliform oranları belirlenmiş ve *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Bıyık ve Erdoğan, 2000; Berber ve Yenidünya, 2005; Ögün vd., 2005).

Alkalofilik bakteriler soda gölleri ve alkali topraklarda yayılış gösterirler (Ulukanlı ve Dığrak, 2002). Alkalotolerant bakteriler yüksek alkali pH'yı tolere edebilme kabiliyetine sahiptirler. Bu bakteriler enerji harcayarak Na<sup>+</sup> ve H<sup>+</sup> iyonlarını hücre membranlarından ters taşımak sureti ile yüksek alkali pH'ya adaptasyon gösterirler. Özellikle alkalofilik *Bacillus* suşları proteaz, alfa amilaz, selülaz, lipaz, pektinaz, ksilinaz ve kitinaz gibi endüstriyel enzimlere sahiptirler (Gessesse 1998; Horikoshi, 1999). Sodalı göllerde yayılış gösteren başta alkalofilik *Bacillus*'lar olmak üzere diğer alkalofilik türler organik maddenin parçalanmasında büyük rol oynarlar (Gonzalez ve ark., 2006).

Mikroorganizmaların yayılış ve çoğalmalarında sıcaklık ve pH önemli bir etkidir. Zira mikrobiyal hücreler içerisinde oluşan bütün metabolik olayları enzimler gerçekleştirir. Enzimlerin yapısını ve faaliyetlerini de sıcaklık ve pH etkiler (Madigan ve ark, 1997). Su sıcaklığı için herhangi bir standart belirlenmemiştir. Ancak ortalama sıcaklığı 25°C civarında olan kıta içi sular I. ve II. sınıf kıta içi sular olarak kabul edilmektedir (Anonim 1, 1991). Tıbbi öneme sahip bakterilerin büyük çoğunluğu pH 7 civarında optimum çoğalma gösterirler. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* türleri için maksimum üreme sınırı pH 9'dur (Anonim, 2008a).

Koliform bakteriler ve fekal streptokoklar suların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde kullanılan indikatör mikroorganizmalardır. Koliform grubu bakteriler gram negatif, sporsuz ve çomaksı bakteriler olup 37°C'de 48 saat içerisinde laktozdan gaz oluştururlar (Brenner, 1984; Madigan, 1997). Fekal koliformlar ise 44-46°C arasında Laktoz Broth Ortamında laktozu fermente ederek gaz oluştururlar. Bu çerçevede koliform olarak tarif edilenler *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* türleridir (Halkman, 1998). Fekal koliformlar insanların, sıcak kanlı hayvanların sindirim kanalında bulunurlar. Bu sebeple fekal koliformlar barsak orjinli olduklarından dolayı sulardaki fekal kontaminasyonun belirlenmesinde kullanılırlar. Sularda fekal koliformların bulunması, suyun dışkı ile kontamine olması anlamına gelir ve su kaynağında; tifo, hepatit-A, kolera, dizanteri ve shigellosis gibi hastalıklara neden olan patojen bakteri ve virüslerin bulunması beklenir (Brenner, 1984; Madigan, 1997). Epidemiyolojik çalışmalar sonucu fekal indikatörlerin konsantrasyonu ile diareal hastalıkların sıklığı arasında ciddi bir bağlantının varlığı kanıtlanmıştır (McBride ve ark., 1998; Prüss, 1998; Van Asperen ve ark., 1998). Bu araştırmada; Van Gölü suyunun bazı bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Referans Bakteriler ve Büyüme Ortamları

*Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 11230 ve *Bacillus cereus* CCM99 suşları Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından sağlandı. *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 Mannitol Salt Agar (Acumedia 7143), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mEnterococcus agarda (Merck 1.05262), *E. coli* ATCC 11230 EMB Agar'da (Merck 1.01347) ve *Bacillus cereus* CCM99 suşları Plate Count Agarda (Merck 1.05463) 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı.

### 2.2. Gölden Alkalofilik Suşların İzolasyonu

Üniversite sahilinden 250ml hacimli steril renkli cam şişelerle alınan su örneklerinden Alkalofil Agar'a (%1 Çözünür nişasta, %0.5 polypepton, %0.5 yeast ekstat, % 0.1K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.02 MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, %2 Agar, pH 10.5) 0.1ml su örneği seyreltme plaka yöntemi ile ekim yapıldı. Petri kapları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler alkalofil/alkalotolerant olarak değerlendirildi.

### 2.3. Göl Suyunun Antimikrobiyal Etkisi

Göl suyunun antimikrobiyal aktivitesi Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla göl suyundan 100ml'lik Erlen Mayer'lere 50ml konuldu ve 70°C'de çökelti oluşana kadar etüvde

tutuldu. Çökeltinin üzerine 5ml distile su eklendi. Oluşan solüsyondan 5mm çaplı selüloz disklerle mikropipet yardımı ile 10µl emdirildi. Diskler 37°C etüvde kurutuldu. Muller Hinton Agar besiyerlerinin yüzeylerine farklı test mikroorganizmaları eküvyon yardımı ile yayılarak ekildi. Petri kapları 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları incelendi (Bauer ve Kirby 1966).

#### 2.4. Alkali Ortamda Büyümenin Ölçülmesi

Van Gölü suyunun bazı bakteriler üzerinde sınırlayıcı etkisini ortaya koyabilmek için distile su ve göl suyu ile Tryptic Soy Broth kullanılarak sıvı besiyeri hazırlandı. Distile su ile hazırlanan Tryptic Soy Broth’un pH’sı 7.32’e ayarlanırken, göl suyu ile hazırlanan besiyerinin pH değeri 9.38’e ayarlandı. Göl suyu ile hazırlanan besiyerinde, herhangi bir çökeltme meydana gelmemesi için membran filtrasyon yöntemi ile sterilize edildi (Anonim, 1989).

Her iki besiyerinden 100ml’lik erlenlere; Van Gölü’nden izole edilen alkalofilik *Bacillus* sp. ile *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 11230 ve *Bacillus cereus* CCM99 referans suşlarının 24 saatlik kültürlerinden 100µl transfer edildi. Besiyerleri 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip 600nm dalga boyunda tüplerin absorbans değerleri ölçüldü. (Anonim, 2008b)

### 3. SONUÇLAR

#### 3.1. Göl Suyunun Antimikrobiyal Aktivitesi

Yoğunlaştırılmış göl suyu çökeltisi emdirilmiş diskler etrafında inkübasyondan sonra inhibisyon zonları oluştu. Oluşan inhibisyon zonları Çizelge 1’de görülmektedir.

Çizelge 1 Yoğunlaştırılmış göl suyu ile hazırlanan disklerin oluşturduğu inhibisyon zonları

Referans suşlar	İnhibisyon zonu 10µl	Disk içeriği
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	15mm	10µl
<i>E. coli</i> ATCC 11230	10mm	10µl
<i>Bacillus cereus</i> CCM99	15mm	10µl

Muller-Hinton Agar üzerinde inhibisyon zonları, disklerden agar yüzeyine yayılan disk içeriğinin bakterilerin üremesini durdurması nedeni ile oluşmaktadır.

#### 3.2. Alkali ortamda Test bakterilerinin Büyüme Değerleri

Shimadzu UV-1201 model Spektrofotometre ile 600nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde; Çizelge 2’de görüldüğü gibi göl suyundan izole edilen alkalofilik *Bacillus* sp. izolatu, *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 11230 ve *Bacillus cereus* CCM99 bakterileri için pH 7.32’de sırası ile 0.061, 0.013, 0.425, 0.141 ve 0.185 absorbans değerleri ölçülürken, pH 9.38’de yine sırası ile aynı bakteriler için 0.275, 0.015, 0.270, 0.009, 0.012 absorbans değerleri belirlendi. Bu değerler test mikroorganizmalarından pH 9.38’e kıyasla pH 7.32’de daha yüksek absorbans gösterenlerin göl suyunun antimikrobiyal aktivitesinden etkilendiğini ortaya çıkarmaktadır.

Van Gölü alkali pH’ya sahip sodalı bir göldür. Bu tür göllerde alkalofilik veya alkalotolerant mikroorganizma türlerin yayılış gösterdiği bilinmektedir (Rees vd., 2004; Virginia vd., 2005).

Doğal su kaynaklarında kirlilik fiziko-kimyasal ve biyolojik parametrelerle ölçülür. Herhangi bir su kaynağında mikroorganizma kirliliği biyolojik parametrelerin en önemlilerindedir. Su kaynaklarında patojen mikroorganizmaların bulunması istenmez (Avcı vd., 2006). Patojen mikroorganizmaların kaynağı arılmamış kentsel ve endüstriyel artıkların su kaynaklarına deşarjından kaynaklanmaktadır. Ancak bu su kaynaklarında hiç mikroorganizma bulunmamalıdır manasına gelmemelidir. Sucul ortamlarda organik maddenin parçalanması ve biyo-jeokimyasal devirlerin gerçekleşmesi için mikroorganizmaların faaliyeti gereklidir (Bastviken vd., 2001; Siuda ve Chrost, 2002).

Çizelge 2: Test mikroorganizmalarının 600nm dalga boyundaki absorbands değerleri

Test mikroorganizmaları	pH 7.32/600nm	pH 9.38/600nm	Absorbans Fakı
Alkalotolerant <i>Bacillus</i> sp.	0.061	0.275	-0.214
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	0.013	0.015	0.002
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.425	0.270	0.155
<i>E. coli</i> ATCC 11230	0.141	0.009	0.132
<i>Bacillus cereus</i> CCM99	0.185	0.012	0.173

Van Göl çevresinde bulunan yerleşim merkezlerinin çoğunun arıtma tesisi bulunmamaktadır. Bu nedenle göle sürekli organik madde ve patojen bakteriler taşınmaktadır. Göle giren organik madde gölde bulunan heterotrof bakteriler tarafından parçalanmaktadır. Sindirilemeyen organik madde balçık şeklinde çökmektedir. Bu nedenle göl suyuna, ancak tölere edilebilecek kadar organik madde verilmelidir. Gölün pH'sı 9.7 civarında olduğu için göle kentsel artıklarla taşınan organik madde içerisindeki bakterilerde saf dışı kalmaktadırlar. Böylece organik maddeyi sindirecek bakteri sayısı da yetersiz kalmaktadır.

Bizim yaptığımız çalışmada göl suyunun *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 11230 ve *Bacillus cereus* CCM99 suşu üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 suşu üzerinde göl suyunun antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile görüldüğü halde fotometrik yöntemde aynı sonuç gözlenemedi. Test mikroorganizmaları üzerinde gözlenen antimikrobiyal etkinin sebebinin, göl suyunun alkali özellikte olmasından kaynaklanmasıdır. Ancak gölün doğal florasında varolan alkalofilik *Bacillus*'ların göl suyundan hazırlanan besiyerlerinde optimum üreme gösterdiği tespit edildi..

Göl suyunun *Enterococcus faecalis* ve *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal kıyaslandığında fekal streptokokların Van Gölü için daha iyi bir indikatör mikroorganizma olduğu kanısına varılmıştır. Gölün pH değerinin alkali olması, patojen bakterilerin optimum düzeyde çoğalmasına engel olmaktadır. Bu su ile bulaşan hastalıkların yayılmasına engel olmaktadır. Şu aşamada Van Gölü'nün alkali pH'ya sahip olması en azından mikroorganizma kirliliğinin önlenmesi için büyük bir şanstır.

#### 4. KAYNAKLAR

- Alessandra, M. G., Rodolfo, P. and Márcia S. L., 2006. Heterotrophic Bacteria Abundances In Rodrigo De Freitas Lagoon (Rio De Janeiro, Brazil). *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:428-433.
- Anonim, 1989. *Su Kalitesi-Mikrobiyolojik Analizler için Kullanılan Membran Filtrelerin Değerlendirilmesi*, TS 6465, 1-9.
- Anonim, 1991. *Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Numune Alma ve Analiz Metodları Tebliği*, *Resmi Gazete*, 7 Ocak, No. 20748.
- Anonim, 2008a. <http://aesop.rutgers.edu/~dbm/lec5am.pdf>

- Anonim, 2008b. <http://www.orlab.net/mikrobiyoloji/110030300.pdf>
- Avcı, S., Bakıcı M.Z. ve Erandaç, M., 2006. Tokat İli'ndeki İçme Sularının Koliform Bakteriler ynünden Araştırılması. *C. Ü. TIP Fakültesi Dergisi*, 28 (4): 107-112.
- Bastviken, D., Ejlerstsson, J. and Tranvik, L. 2001. Similar bacterial growth on dissolved organic matter in anoxic and oxic lake, *water Aquat Microb Ecol* 24: 41-49.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., and Sheris, J. C. 1966, Antibiotic Testing Method By Standardizing Disc Method. *American Journal of Clinical Pathology*: 45:493-6.
- Berber, I and Yenidünya, E. 2005. Identification of Alkaliphilic Bacillus Species Isolated From Lake Van and Its Surroundings by computerized analysis of Extracellular Protein Profiles. *Turkish Journal of Biology*. 29(3):181-188.
- Bıyık, H.H. ve Erdoğan A., 2000. Van Gölü Erçek Gölü Sularında ve Van İlindeki Alkali Topraklarda Alkalofilik ve Alkalo-Tolerant Bacillus Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu, *Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu ,Y.Y.Ü.-98-FED-081*.
- Brenner, D. J. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol .1. Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods* (Editors: Krieg, N. R). Williams and Wilkins, Baltimore. 427-458.
- Gessesse, A., 1998. Purification And Properties Of Two Thermostable Alkaline Xylanases From An Alkaliphilic *Bacillus* Sp. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 9 ,3533-3535
- Halkman, A. K., 1998. *Gıda Mikrobiyolojisi'98*. Orkim Ltd. Şti. Yayını, Ankara. 68.
- Horikoshi, K., 1999 Alkaliphiles: Some Applications Of Their Products For Biotechnology *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, No. 4 :735-750
- Kempe S, Kazmlerczak J and Landmann G., 1991. Largest Known Microbialites Discovered In Lake Van, Turkey. *Macmillan Magazines* 349: 605-608.
- Madigan, M. T., J., Martinko, J. M. and Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms* Eighth Edition, Prentice Hall, International, Inc. 986.
- McBride G. B., Salmon C. E., Bandaranayake D. R., Turner S. J., Lewis G. D. and Till D. G., 1998. Health effects of marine bathing in New Zealand. *International Journal of Environmental Health Research*, 3:173-189.
- Öğün, E., Atalan, E. ve Özdemir, K., 2005. A Study Of Some Pollution Parameters İn Water Samples From Lake Van, Turkey. *Fresenis Environmental Bulletin*, 14 (No: 11): 1031-1035.
- Prüss, A.,1998. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *International Journal of Epidemiology*, 27:1-9.
- Rees, H., Grant, W., Jones, B. and Heaphy, S., 2004. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles*, 8:63-71.
- Siuda, W. and Chrost, R. J., 2002. Decomposition and Utilization of Particulate Organic Matter by Bacteria in Lakes of Different Trophic Status *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 11, No. 1: 53-65
- Ulukanlı, Z. ve Dığrak, M., 2002 Alkaliphilic Micro-organisms and Habitats. *Turk J Biol*, 26 181-191
- Van Asperen I. A., Medema, G. J., Borgdorff, M. W., Sprenger, M. J. W. and Havelaar A. H., 1998. Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. *International Journal of Epidemiology*, 27: 309-315.
- Vargas, V.A., Osvaldo, D.D., Rajni, H. and Mattiasson, B, 2005. *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 899-902.