

Süt Fabrikası Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalardan Elde Edilen Biyosürfektanların Bitki Patojeni *Fusarium* Türleri Üzerine Antifungal Etkilerinin Araştırılması

Fadime YILMAZ^{1*}, Aysun ERGENE¹, Emine YALÇIN²

¹Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü –Yahşihan / KIRIKKALE

²Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – Debboz / GİRESUN

Alınış tarihi:09.02.2009, Kabul tarihi:06.05.2009

Özet: Bu çalışmada süt fabrikası atık sularından izole edilen farklı mikroorganizmalardan biyosürfektanlar elde edilmiş ve bu maddelerin antifungal aktiviteleri test edilmiştir. Bu amaçla Ankara Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atık su örneklerinden beş farklı mikroorganizma izole edilmiştir. Sadece üç izolatan biyosürfektan ürettiği belirlenmiştir. Biyosürfektan üreten izolatlar, identifikasyon testleri sonucunda *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* ve *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmışlardır. *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia*'dan üretilen ve sırasıyla BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır. Elde edilen biyosürfektanların, bitki patojeni olan *Fusarium* cinsine ait *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 ve *Fusarium heterosporium* ATCC 15625 türleri üzerine antifungal etkileri tespit edilmiştir. Tüm biyosürfektanların denenen funguslara karşı farklı antifungal aktivite sergiledikleri saptanmıştır. BS-III'ün en yüksek ve düşük misel inhibisyon oranları sırasıyla, % 71 oranında *F. graminearum*'da ve % 39 oranında *F. heterosporium*'da belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Süt Fabrikası Atık Suları, Biyosürfektan, Antifungal Etki, *Fusarium*

Investigation of Antifungal Effects on Plant Pathogen *Fusarium* species of Biosurfactants which Produced by Isolated Microorganisms from Milk Factory Wastewaters

Abstract: In this study, biosurfactants were produced by isolated different microorganisms from milk factory wastewaters and antifungal activities of these molecules were tested. For this purpose, five different strains were isolated from Ataturk Forest Farm Milk and Milk Products Factory wastewaters. Only three isolates were determined to produce biosurfactants. As a result of identification tests, biosurfactants producing isolates were identified as *Yarrowia lipolytica*, *Micrococcus luteus* and *Burkholderia cepacia*. Biosurfactants produced isolates by *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* were coded as BS-I, BS-II and BS-III, respectively. The antifungal effects of biosurfactants were determined on plants pathogens, species of *Fusarium* genus, *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 and *Fusarium heterosporium* ATCC 15625. Finally, all biosurfactants showed different antifungal activities on tested fungus and it was determined that the maximum and minimum micel inhibition rates as 71% against *F. graminearum* and 39 % against *F. heterosporium* achieved by BS-III, respectively.

Keywords: Milk Factory Wastewaters, Biosurfactant, Antifungal Effect, *Fusarium*

Giriş

Biyosürfektanlar, karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların karışımını karbon kaynağı olarak kullanan aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Uysal ve Türkman, 2004). Biyosürfektanlar, kimyasal olarak hazırlanan sürfektanlara alternatiflerdir. Yapısal farklılıkları (glikolipidler, lipopeptidler, yağ asitleri gibi), biyolojik olarak parçalanabilmelerinden dolayı bu moleküller yaygın bir şekilde kozmetikte, ilaç, gıda sanayinde emülsifiyer, ıslatıcı-nemlendirici, koruyucu madde ve deterjan olarak kullanılmaktadırlar (Makkar ve Cameotra, 2002). Bu tür biyolojik temelli sürfektanların avantajları, biyolojik olarak doğaya uyumluluk ve sentetik sürfektanlara göre toksisitelerinin düşük olmasıdır (Kosaric, 1992). Antibakteriyal, antifungal, antiviral ajanlar olmalarının yanı sıra major immunomodulator moleküller, anti - adhesive ajanlar olarak aşı ve gen terapilerinde kullanılmaya potansiyeline sahiptirler.

Pseudomonas aeruginosa AT10'dan elde edilen ramnolipid; mükemmel antifungal özelliği ile *Aspergillus niger* (16 mg/mL), *Chaetium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans* (32 mg/mL) funguslarına ayrıca *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani* (18 mg/mL) bitki patojenlerine karşı inhibitör aktivite göstermiştir. Sophorolipidler ve ramnolipidlerin bitki ve tohum patojeni funguslara karşı etkili antifungal ajanlar olduğu ifade edilmiştir. 200 mg/L ramnolipid ve 500 mg/L sophorolipid *Phytophthora* sp. ve *Pythium* sp.'nin miselyum gelişimini % 80 oranında inhibe etmişlerdir (Muthusamy vd., 2008).

Bu çalışmada süt fabrikası atık sularından izole edilen farklı mikroorganizmalardan biyosürfektanlar elde edildi ve bu maddelerin bitki patojeni *Fusarium* cinsine ait dört türe karşı antifungal aktiviteleri test edilmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Ankara Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Mamulleri Fabrikası atığı ile kontamine olmuş istasyondan alınan su örneklerinden yayma kültür yöntemiyle Mueller Hinton Agar besiyerine ekim yapılmıştır (Karahana vd., 2002). Petri kutuları 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında saf kültürleri elde edilen izolatların koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri incelenerek, biyosülfektan üretebilme yetenekleri belirlenmiştir. Biyosülfektan üretebilen izolatların tanı testlerine geçilmiştir. İzolatların ön ayrımı için gerçekleştirilen (hareket, IMViC, hemoliz, katalaz, gram boyama gibi) analizlerden (Chandrasekaran ve Venkatesalu, 2004; Collobert vd., 1995; Doddamani ve Ninnekar, 2001; Kesenkaş ve Akbulut, 2006) sonra tür düzeyinde tanı BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System kitleri, A.P.I kiti ve VITEK 2 cihazı (Biomerieux) ile yapılmıştır. Tanı çalışmaları sonrasında biyosülfektan üreten izolatlar, *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* ve *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır. Stok bakteri kültürlerinin hazırlanması amacı ile mikroorganizmalar yatık Mueller Hinton Agar besiyerine ekilerek 48 saat süreyle üretilip, bu süre sonunda daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

Biyosülfektan Üretimi İçin Besiyerinin Hazırlanması

Mikroorganizma üretimi için temel besiyeri Mineral Salt Medium (MSM) besiyeri (g/L olarak; NaNO₃ 4.0; NaCl 1.0; KCl 1.0; CaCl₂.2H₂O 0.1; KH₂PO₄ 3.0, Na₂HPO₄.12H₂O 3.0; MgSO₄ 0.2; FeSO₄.7H₂O 0.001; FeCl₃.6H₂O 0.008; ZnSO₄.7H₂O 0.75; CoCl₂.6H₂O 0.08; CuSO₄.5H₂O 0.075; MnSO₄.H₂O 0.75; H₃BO₃ 0.15; Na₂MoO₄.2H₂O 0.05) kullanılmıştır. Besiyerinin pH değeri 6.8 olarak ayarlanmıştır (Zhang vd., 2005).

Mikroorganizmaların Üretilmesi

Daha önce hazırlanan stok kültürleri kullanılarak mikroorganizmalar steril MSM besiyerine aktarılmıştır. Bu amaçla tüm izolatlardan Mc Farland 2 (%1'lik H₂SO₄ çözeltisinden 9.8 ml + %1'lik BaCl₂ çözeltisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklıkta steril serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ilave edilerek homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Steril koşullarda bu süspansiyondan MSM besiyerlerine % 5 oranında bakteri ekimi yapılmıştır. İnkübasyon, 35°C'de 10 gün süre ile 150 rpm döngüsel çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (Heidolph Ins., Unimax 1010) gerçekleştirilmiştir.

Kültürlerde Biyosülfektan Varlığının Saptanması

Mikroorganizma kültürlerinde biyosülfektan üretiminin belirlenmesi için drop-collapse yöntemi kullanılmıştır (Bodour ve Miller-Maier, 1998). Bu yöntem için 96 kuyucuğa (microwell plate) sahip bir platform kullanılmıştır. Kuyucuklar ilk olarak 7 µl mineral yağ ile kaplanmıştır. Üretimi tamamlanan kültürler 10000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant ayrılarak, 0,45 µm gözenek çaplı steril filtreden (Millipore) geçirilmiştir. Kontrol sıvısı olarak steril su ve

ekim yapılmamış besiyeri kullanılmıştır. Su ve filtratlardan alınan 25 µl'lik örnekler 45°C'lik açı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma veya stabil kalmalarına göre biyosülfektan varlığı belirlenmiştir.

Kültürlerde Biyosülfektan Miktarının Ölçülmesi

Kültürlerde biyosülfektan miktarı fenol sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir (Saha ve Brewer, 1994). Bu amaçla 1.0 ml örnek, 1.0 ml fenol (% 5) ve 3.0 ml H₂SO₄ (% 98) vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Oluşan renkli (sarı-turuncu) bileşiğin absorbanansı spektrofotometrede (Iymen SP 2000 UV) 480 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart L-ramnoz çözeltileri (0.1-1.0g/L) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi, biyosülfektan madde miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Biyosülfektan Eldesi

Kültür ortamından biyosülfektanın ayrıştırılması için, kültürler 5000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Biyosülfektan presipitasyonu için santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatanta, pH'ı 2.0 olana dek 6 N H₂SO₄ ilave edilmiştir. Çökelti kloroform/metanol (1:1, v/v) karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Evaporatör ile çözücünün ortamdaki uzaklaştırılması sağlanarak, elde edilen ekstrakt toplanmıştır ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Biyosülfektanların antifungal aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Elde edilen biyosülfektanların, bitki patojeni funguslara karşı antifungal aktivitelerini belirlemek için Ankara Tarım İl Müdürlüğü'nden temin edilen *Fusarium avenaceum* ATCC 200466, *Fusarium graminearum* ATCC 15624, *Fusarium inflexum* ATCC 32211 ve *Fusarium heterosporium* ATCC 15625 kullanılmıştır. Antifungal çalışma kapsamında biyosülfektanların, Potato Dekstroz Agar ortamında geliştirilen bitki patojeni fungusların misel gelişimlerine karşı etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla kloroform içerisinde çözünen BS-I, BS-II ve BS-III örnekleri Potato Dekstroz Agar ortamına (%5) ilave edilmiştir. Kontrol grupları ise biyosülfektan eklenmemiş besiyerlerinde test edilmiştir. 7 günlük kültürlerden 5 mm genişliğinde kesilen diskler her petri kutusuna ayrı ayrı ters çevrilerek yerleştirilmiş ve 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda koloni çapı ölçülerek misel inhibisyonu yüzde olarak hesaplanmıştır (Özcan vd., 2003). Her uygulamanın üç tekrarı da aynı şekilde sürdürülmüş ve standart sapma değerleri belirlenmiştir.

Bulgular

İzolasyon sonrasında beş farklı koloni tipi ayırt edilmiştir. Kolonilerden alınan örneklerden, saf kültürler elde edilerek drop-collapse yöntemiyle biyosülfektan üretme yetenekleri belirlenmiştir. Biyosülfektan varlığının saptanması için MSM besiyerinde üretilen beş farklı mikroorganizma kültürlerine ait süpernatantlar, su ve ekim yapılmamış besiyeri örnekleri, mineral yağ ile

kaplanmış microwell plate içerisindeki kuyucuklara enjekte edilmiştir. Su, ekim yapılmamış besiyeri örnekleri ve iki ayrı mikroorganizma kültürlerine ait süpernatantların boncuk şeklini aldığı, diğer üç izolata ait kültür örneklerinde ise kuyucuklardaki damlaların yayıldığı gözlenmiştir. Damlaların yayılması biyosülfektan varlığını göstermektedir. Biyosülfektan üretiminin saptanması sonrasında *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen biyosülfektan maddeler sırası ile BS-I, BS-II ve BS-III olarak kodlanmıştır. Biyosülfektan üretebilen izolatların identifikasyonları sonrasında iki izolat bakteri olup *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* olarak tanımlanmışlardır. Üçüncü izolat ise 25 °C'de Sabouraud Dekstroz Agar besiyerinde beyaz, mat şekilde koloniler oluşturan ve üreaz reaksiyonu pozitif bir maya türü olan *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 1. Biyosülfektan üretebilen *B. cepacia* ve *M. luteus*'un biyokimyasal özellikleri (B: Beyaz, S: Sarı)

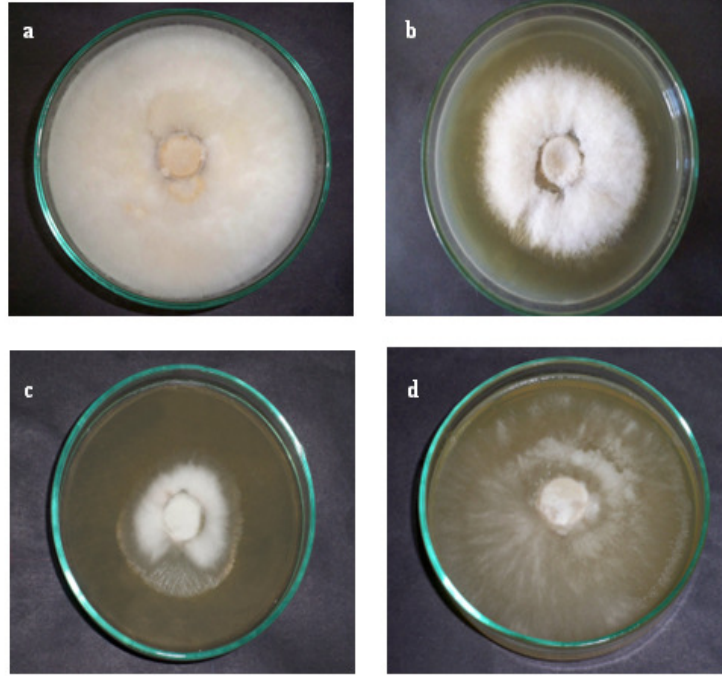
	<i>M. luteus</i>	<i>B. cepacia</i>
Hücre morfolojisi	Kok	Çubuk
Koloni tipi	S	S
Gram Reaksiyon	+	-
Oksidaz	+	+
42°C'de üreme	+	+/-
H ₂ S	-	-
Pigment	S	B
Laktoz	-	+/-
Indol	-	-

MSM besiyerinde *Y. lipolytica*, *M. luteus* ve *B. cepacia* tarafından üretilen biyosülfektan miktarları ise sırası ile 728, 827 ve 656 mg/L olarak bulunmuştur. En fazla biyosülfektanı, *M. luteus*'un ürettiği belirlenmiştir.

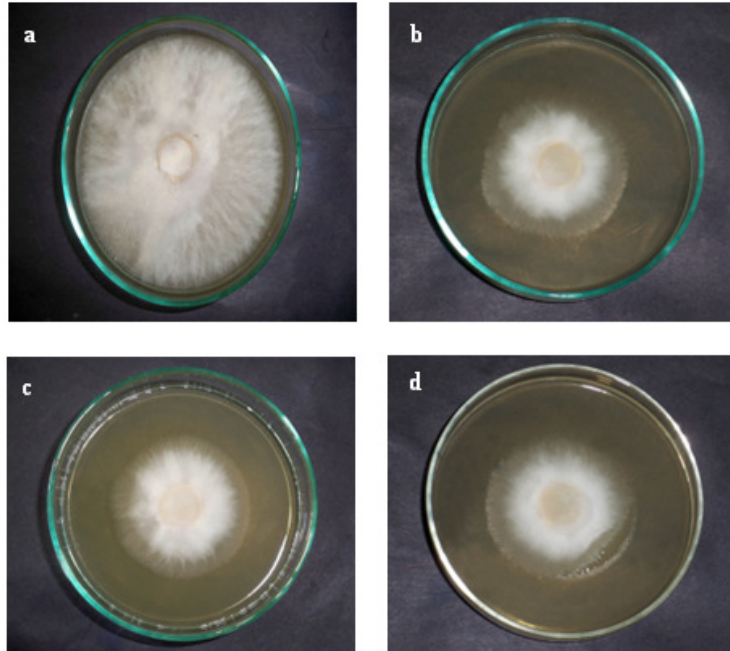
% 5 oranında uygulanan biyosülfektanlar varlığında *Fusarium cinsine* ait dört türün misel gelişim oranları hesaplanmıştır. Elde edilen biyosülfektanların bitki patojeni fungusların misel gelişimlerine etkileri Şekil 1, 2, 3 ve 4'de görülmektedir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I varlığında, en fazla misel gelişimi % 67 oranında *F. heterosporium*'da, en az misel gelişimi % 42 oranında *F. avenaceum*'da belirlenmiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II varlığında, en fazla misel gelişimi *F. inflexum*'da % 50 oranında, en az misel gelişimi ise *F. avenaceum*'da % 40 oranında hesaplanmıştır. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III varlığında ise en fazla misel gelişimi % 61 oranında *F. heterosporium*'da, en az misel gelişimi de *F. graminearum*'da % 29 olarak belirlenmiştir. Ancak BS-III'ün varlığında *F. heterosporium*'un % 61 oranında miseller gelişirken, misel yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Tüm test mikroorganizmalarına karşı yapılan antifungal aktivite deneyleri üç paralel çalışılmıştır ve Çizelge 2'de standart sapma değerleri verilmiştir.

Çizelge 2. BS-I, BS-II ve BS-III varlığında bitki patojeni fungusların ortalama % misel gelişim oranları

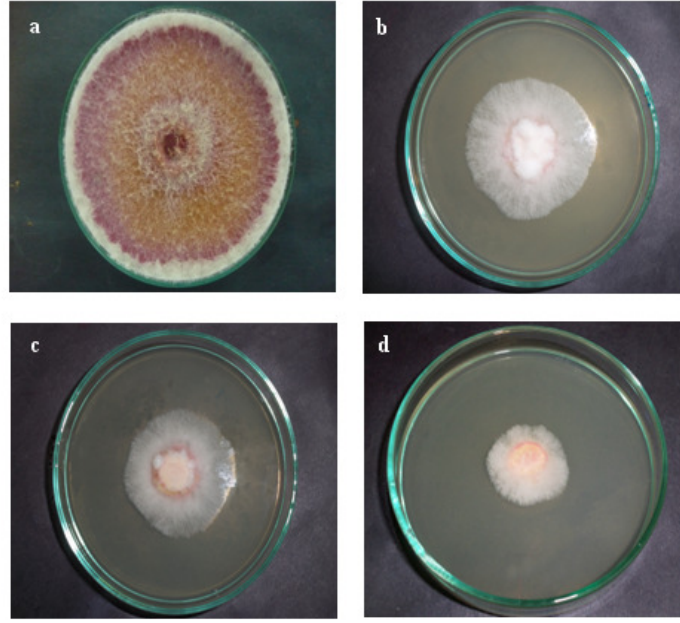
	<i>F. heterosporium</i>	<i>F. inflexum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
BS-I	67± 5.3	47± 3.2	42± 2.0	50± 2.6
BS-II	44± 3.0	50± 4.0	40± 2.6	42± 2.0
BS-III	61± 2.6	51± 1.7	46± 3.0	29± 2.0



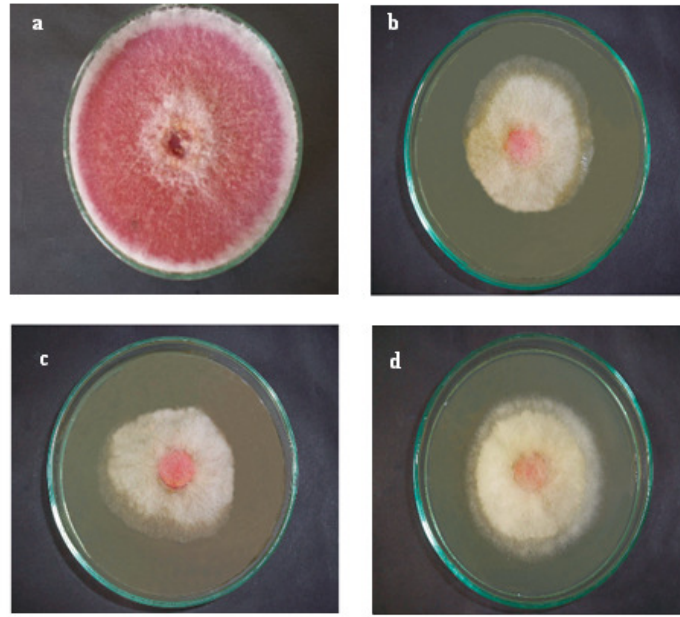
Şekil 1. İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium heterosporium*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 2. İzolatlara ait biyosüpfektanların *Fusarium inflexum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 3. İzolatların biyosüpfektanların *Fusarium graminearum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III



Şekil 4. İzolatların biyosüpfektanların *Fusarium avenaceum*'un misel gelişimi üzerine etkileri; a. kontrol, b. BS-I, c. BS-II, d. BS-III

Tartışma ve Sonuç

Süt fabrikası atık sularından mikroorganizma izolasyonunu, biyosüpfektan üretimini ve elde edilen biyosüpfektanların antifungal etkilerini belirlemeyi amaçlayan bu çalışmada, BS-I, BS-II ve BS-III'ün *Fusarium* cinsine ait dört bitki patojeni türe karşı antifungal etkileri belirlenmiştir. Ayrıca yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz biyosüpfektanlar, miktar bakımından literatürde yer alan çalışmalarla kıyasalanabilir durumdadır. Sonuç olarak sadece yurt dışından temin edilebilen biyosüpfektan maddelerin Türkiye'de üretilebilecek olması bu çalışmanın ticari uygulanabilirliğini de arttırmıştır. Kahyaoglu ve Konar'ın

(2006) yaptığı çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 suşu ile besiortamı olarak şeker fabrikası atık maddesi olan % 5'lik melas kullanılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında 0,78 g/L ramnolipid elde edildiği gözlenmiştir. Patel ve Desai'nin (1997), karbon kaynağı olarak melas ve mısır likörünü kullandıkları çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* GS3 kültürlerinde 0,25 g/L ramnolipid elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Fusarium cinsine ait türler, toprakta ve bitkide bulunan filamentöz funguslardır. Bu mikroorganizmaların doğal ortamı pirinç, fasulye ve diğer ekinlerdir. Genel

kontaminant ve bitki patojeni olarak bilinmekle beraber, *Fusarium* spp. insanlarda da çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Arıcı ve Koç, 2008). *Y. lipolytica* tarafından üretilen BS-I, *F. heterosporium*'un misel gelişimini % 33, *F. inflexum*'da % 53, *F. avenaceum*'da % 58 ve *F. graminearum*'da % 50 oranında inhibe etmiştir. *M. luteus* tarafından üretilen BS-II misel gelişimini *F. heterosporium*'da % 56, *F. inflexum*'da % 50, *F. avenaceum*'da % 60 ve *F. graminearum*'da % 58 oranında engellemiştir. *B. cepacia* tarafından üretilen BS-III'ün de misel gelişimini inhibe edici etkisi *F. heterosporium*'da % 39, *F. inflexum*'da % 49, *F. avenaceum*'da % 54 ve *F. graminearum*'da % 71 olarak ölçülmüştür.

Benincasa vd., (2004) tarafından, petrole kontamine olmuş topraktan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* LBI'nın ürettiği ramnolipid, bitki patojeni fungal türler *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocadium virens* ve *Chaetonium globosum* için 32 mg/L konsantrasyonlarında uygulanmış ve iyi bir antifungal aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Literatürde biosürfektanların antifungal etki mekanizmalarına dair bilgiler de bulunmaktadır. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen utirinin, maya hücrelerinin membran yapısını ve morfolojilerini etkileyerek antifungal aktivite sergilediği belirtilmiştir. Utirin hücre duvarını geçip, membran içindeki partikülleri toplayarak, oluşturduğu küçük kesecikler ile plazma membranını bozar ve hatta çekirdek zarı ve muhtemelen stoplazmik organellerle etkileşime geçer. Diğer bir biosürfektan olan surfaktinin membran geçirgenlik mekanizması, lipopeptidlerin hemolitik ve antibiyotik etkisi ile hücre membranında por oluşumuna neden olması ile açıklanmıştır. Bu durumda muhtemelen surfaktinin fosfolipidler ile etkileşim halinde olduğu bölgelerde membran bariyer özelliklerinin hasara uğradığı öne sürülmüştür (Kosaric, 1992). Biosürfektanların deterjanlar gibi hücre membran geçirgenliği üzerinde toksik etki gösterdiği kabul edilmektedir (Thanomsub vd., 2007). Biosürfektanlar, tarımsal alanlarda gübre ve pestisidlerin eşit dağılımında, hidrokarbon yapıdaki organik kimyasalların çözünmesinde ve topraktaki ağır metallerin hidrofilyzasyonda kullanılmakla birlikte pestisidlerin giderilmesinde (Banat vd., 2000) ve bitki patojenlerine karşı biyofungusid olarak da kullanılmaktadırlar. Mısır ve diğer bitki patojenlerinin kontrolünde ramnolipid, zoosporik bitki patojenlerine karşı (*Pythium*, *Phytophthora*, *Plasmopara*) litik aktivite sergileyerek membran bütünlüğünü bozmaktadır (Banat vd., 2000; Stanghellini ve Miller, 1997). Sonuç olarak elde ettiğimiz biosürfektanların antifungal etkileri dikkate alınacak olursa biyokontrol amaçlı kullanılabilirliğinin mümkün olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

Arıcı, Ş.E., Koç, N.K. 2008. *In vitro* Seleksiyon Tekniği ile Buğday (*Triticum aestivum* L.)'da *Fusarium* (*Fusarium* spp)'a Dayanıklı Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Bitki Regenerasyonu. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(1), 55–64.

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495–508.

Bodour, A., Miller-Maier, R.M. 1998. Application of a Modified Drop-Collapse Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 273-280.

Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V. 2004. Antibacterial and Antifungal Activity of *Syzygium jambolanum* Seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 105-108.

Collobert, C., Fortier, G., Perrin, R., Letot, G., Andrioud, D. 1995. Bacteria and Fungi Isolated from Equine Tracheobronchial Aspirates. *Prat. Vet. Equin.*, 27, 91-96.

Doddamani, H.P., Ninnekar, H.Z. 2001. Biodegradation of Carbaryl by a *Micrococcus* species. *Curr Microbiol.*, 43, 69-73.

Govan, J.R., Hughes, J.E., Vandamme, P. 1996. *Burkholderia cepacia* Medical, Taxonomic and Ecological Issues. *J. Med. Microbiol.*, 45, 395-407.

Kahyaoglu, M., Konar, V. 2006. Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan Ramnolipid Biosürfektanı Elde Edilmesi. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. J. of Fırat Univ*, 18, 493-498.

Kesenkaş, H., Akbulut, N. 2006. Mayaların Peynir Üretiminde Destek Starter Kültür Olarak Kullanımı. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43, 165-174.

Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in Industry. *Pure Applied Chemistry*, 64, 1731–1737.

Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2002. An Update on Use of Unconventional Substrates for Biosurfactants Production and Their New Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 428–434.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: Properties, Commercial Production and Application. *Current Science Assoc/Indian Academy of Sciences*, 94,736-747.

Özcan, M., Ceylan, D.A., Ünver, A., Yetişir, R. 2003. Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Sağlanan Polen ve Propolis Ekstraktlarının Antifungal Etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 1-8.

Patel, R.M., Desai, A.J. 1997. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from Molasses. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 91-94 .

- Saha, S.K., Brewer, C.F. 1994. Determination of The Concentrations of Oligosaccharides, Complex Type Carbohydrates and Glycoproteins Using The Phenol-Sulfuric Acid Method. *Carbohydrate Research*, 254, 157-167.
- Stanghellini, M.E., Miller, R.M. 1997. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in The Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. *Plant Dis.*, 81, 4-12.
- Uysal, A., Türkman, A. 2004. Klorofenollü Bileşiklerin Ayrışabilirliğinin Biyosümfektan Kullanımı ile Hızlandırılması. *SKKD*, 14, 23-30.
- Thanomsub, B., Pumeechockchai, W., Limtrakul, A., Arunrattiyakorn, P., Petchleelaha, W., Nitoda, T., Kanzaki, H. 2007. Chemical Structures and Biological Activities of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 Isolated from Milk Factory Waste. *Bioresource Technology*, 98, 1149–1153.
- Zhang, G.L., Wu, Y.T., Qian, X.P. 2005. Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa* in The Presence of Rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University (Science)*, 6B(8), 725-730.