

67024

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AYDER KAPLICASINDAN TERMOFİLİK BAKTERİ
İZOLASYONU ve TEŞHİSİ

Biyolog Sabriye DÜLGER

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.01.1997
Tezin Savunma Tarihi : 03.02.1997

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Asım KADIOĞLU

Ocak -1997

TRABZON

ÖNSÖZ

"Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi" adlı bu çalışma, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, Doç. Dr. Asım KADIOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a ve bu çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi sayın Ahmet Faik AYZAZ'a ve diğer bölüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Ayrıca, bu projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Araştırma Fonu'na (Proje No: 95.111.004.2) teşekkür ederim.

Trabzon, Ocak, 1997

Sabriye DÜLGER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Önsöz.....	II
İçindekiler.....	III
Özet.....	VI
Summary.....	VII
Şekil Listesi.....	VIII
Tablo Listesi.....	IX
Kısaltmalar.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler.....	3
1.2.1. Bakteri Hücresinin Yapısı.....	3
1.2.2. Bakterilerin Hücre Duvarı Varlığına ve Yapısına Göre Sınıflandırılmaları.....	5
1.2.3. Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Aralığına Göre Gruplandırılmaları.....	7
1.3. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgiler.....	8
1.4. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri.....	9
1.4.1. Termofilik Bakterilerin Çeşitliliği.....	9
1.4.2. Termofilik Mikroorganizmaların Habitatları.....	13
1.4.3. Termofilliğin Moleküler Temelleri.....	14
1.4.4. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	14
1.5. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kriterler.....	16
1.5.1. Bakterilerin Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri.....	16
1.5.2. Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	17
1.5.2.1. Bakterilerin Fiziksel İhtiyaçları.....	17
1.5.2.2. Bakterilerin Biyokimyasal Aktiviteleri.....	18
1.5.3. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Genetiksel Özellikler.....	22
1.5.3.1. DNA Baz Kompozisyonu.....	22
1.5.3.2. DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu.....	23
1.5.3.3. DNA-RNA Hibridizasyonu.....	23
1.5.3.4. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması.....	23
1.5.3.5. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması.....	24
1.5.4. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kemotaksonomik Özellikler.....	24
1.5.4.1. Lipid Kompozisyonu.....	24
1.5.4.2. Total Protein Profili.....	25
1.5.4.3. Sitokrom Özelliği.....	26

1.5.4.5. İmmünolojik Özellikler.....	26
1.5.4.6. Enzim Karakterizasyonu.....	27
1.5.4.7. Fermentasyon Ürünlerinin Profili	27
2. MATERYAL ve METOD	28
2.1. Materyal.....	28
2.1.1. Besiyeri ve Kimyasallar.....	28
2.2. Metod	28
2.2.1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı.....	28
2.2.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanışı	28
2.2.1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı.....	30
2.2.2. Örneklerin Alınması ve Kaplıca Suyunun Kantitatif Analizinin Yapılması	32
2.2.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması.....	32
2.2.4. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	32
2.2.4.1. Basit Boyama	32
2.2.4.2. Gram Boyama	32
2.2.4.3. Spor Boyama.....	33
2.2.4.4. Kapsül Boyama.....	33
2.2.4.5. Flagella Boyama	33
2.2.4.6. Hareket testleri	34
2.2.5. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	34
2.2.5.1. İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	34
2.2.5.2. İzolatların Büyüdüğü pH Aralıklarının Belirlenmesi.....	35
2.2.5.3. İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	35
2.2.5.4. İzolatların Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi.....	35
2.2.5.5. İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	36
2.2.5.6. Nişasta Hidrolizi Testi	36
2.2.5.7. Jelatin Hidrolizi Testi	36
2.2.5.8. Karbohidrat Fermentasyonu Testleri.....	37
2.2.5.9. Hidrojen sülfür (H ₂ S) Üretim Testi.....	37
2.2.5.10. Voges-Proskauer Testi.....	37
2.2.5.11. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi.....	37
2.2.5.12. Nitratı İndirgeme Testi.....	38
2.2.5.13. Katalaz Testi.....	38
2.2.5.14. Oksidaz Testi	38
2.2.6. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	39
2.2.6.1. Plazmid DNA'larının İzolasyonu	39
2.2.6.2. Genomik DNA'nın İzolasyonu.....	40
2.2.6.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemiyle 16S rRNA Analizi.....	40

2.2.6.4. 16S rDNA'nun Restriksiyon Fragmenti Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP).....	41
2.2.7. İzolatların Total Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması.....	41
2.2.7.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu.....	41
2.2.7.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini	42
2.2.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
3. BULGULAR.....	43
3.1. Kaplıca Suyunun Kantitatif Analizi.....	43
3.2. İzolatların Morfolojik Özellikleri.....	43
3.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	49
3.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri	52
3.5. İzolatların Total Protein Profili	58
4. TARTIŞMA.....	60
5. SONUÇLAR.....	65
6. ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	72

ÖZET

Bu araştırmada, Ayder (Rize) kaplıcasından alınan su ve çamurlu su örneklerinden termofilik bakteri izolasyonları gerçekleştirilerek bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı. Aynı zamanda, kaplıca suyundaki bakteri sayısı araştırıldı.

Kaplıcanın ilk çıktığı yerden alınan su örneklerindeki bakteri sayısı membran filtresi metoduna göre tespit edildi. Ayrıca, alınan su ve çamurlu su örneklerinden zenginleştirme kültürü yapılmak ve filtreden geçirilmek suretiyle elde edilen numunelerin ekimleri neticesinde oluşan koloniler binoküler mikroskop altında incelendi. İncelemeler sonucunda, beş farklı izolat diğer testlere tabi tutulmak üzere seçildi. Seçilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve bazı genetiksel ve kemotaksonomik özellikleri incelendi.

Yapılan araştırma sonucunda, kaplıca suyundaki termofilik bakteri sayısının 13 bakteri/ml olduğu ortaya çıkarıldı. Elde edilen izolatların hepsi Gram değişken, aerobik, hareketli ve spor oluşturabilen bakteriler olduğundan *Bacillus* cinsi içine dahil edildiler. İzolatlar bazı özellikleri bakımından literatürlerde mevcut olan türlerden farklılıklar teşkil ettiklerinden bunların şu ana kadar tanımlanmış bakteri türlerinden olmadıkları tesbit edildi. Ancak tam tür tayinlerinin gerçekleştirilebilmesi için, elde edilen izolatların 16S rRNA genlerinin dizin analizlerinin yapılması ve DNA'larındaki %G+C ieriğinin belirlenmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ayder Kaplıcası, Termofilik Bakteri, *Bacillus sp.*

SUMMARY

THE THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATION AND DETERMINATION FROM AYDER HOT SPRING

In this study, from mud and water of Ayder (Rize) hot spring, thermophilic bacteria isolation were carried out, and then, species of isolates were tried to be determined. Meanwhile, the number of thermophilic bacteria in the samples from hot spring was determined.

The number of bacteria in the main hot spring samples of the thermal was defined by the membran filtration method. In addition, the samples obtained by filtration and the enrichment cultures from the hot spring's water and mud were grown on nutrient agar medium and the colonies were examined under binocular microscope. Five different isolates were subjected to the further tests. Morphological, physiological, biochemical, some genetical and chemotaxonomical features of the isolates were examined.

As conclusion, the number of Bacteria in the hot spring was found as 13 bacteria/ml. Since all isolates are Gram variable, aerobic, motile and spore forming bacteria, they are placed into genus *Bacillus*. Isolates have distinct features from the present species in the references. For the exact determination of the species, the results should be supported by the 16S rRNA gene sequence and %G+C content.

Key words: Ayder Hot Spring, Thermophilic Bacterium, *Bacillus sp.*

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Ayder Kaplıcasından Elde edilen 5 izolatın Gram boyamaları. ..45
- Şekil 2. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Spor Boyamaları. ..46
- Şekil 3. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Kapsül Boyamaları.....47
- Şekil 4. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Flagella Boyamaları.....48
- Şekil 5. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatlardan Saflaştırılan Genomik ve Plazmid DNA'larının %0,7'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.53
- Şekil 6. Ayder Kaplıcasından Saflaştırılan İzolatlardan Plazmid İzolasyonu Yöntemi ile Elde Edilen Lineer DNA Parçalarının Genom DNA'sı Parçası Olduğunun %0,7'lik Agaroz Jelde Gösterilmesi.54
- Şekil 7. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatlardan Saflaştırılan Plazmid ve Genom DNA'sı Parçalarının *Pst*I ve *Kpn*I Enzimi ile Kesilmesinin % 0.8'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.54
- Şekil 8. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 3 ve 5 Numaralı İzolatlardan Saflaştırılan Plazmid DNA'larının *Pst*I ve *Sau*3A ile Kesilmiş Hallerinin %0,7'lik Agaroz Jelde Görünüşü.55
- Şekil 9. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolat ve Kontrol Olarak Test Edilen *B. flavothermus*, *B. stearothermophilus* ve *E. coli* Türlerinden Saflaştırılan Genom DNA'sından PCR Yöntemiyle Çoğaltılan 16S rDNA Geninin %1.3'lük Agaroz Jeldeki Görüntüsü.56
- Şekil 10. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolattan ve *B. flavothermus* ile *B. stearothermophilus* Türlerinden PCR Aracılığı ile Elde Edilen 16S rDNA Geninin *Hinf*I Enzimi ile RFLP'sinin %2,5'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.....57
- Şekil 11. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatlardan ve *B. flavothermus*'tan Saflaştırılan Çözünebilir Total Hücre Proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi.59

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Organizmaların Maksimum Büyüme Sıcaklıkları	8
Tablo 2. Ayder Kaplıcası Suyunun Özellikleri.....	9
Tablo 3. Son Yıllarda Ortaya Çıkarılan Termofilik Bakteri Türleri.....	12
Tablo 4. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatların Morfolojik ve Büyüme Özellikleri	44
Tablo 5. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	50



KISALTMALAR

<i>B. flavothermus</i>	: <i>Bacillus flavothermus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	: <i>Bacillus stearothermophilus</i>
BSA	: Bovin Serum Albumin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğerlerinin büyümediği veya minimum büyüme gösterdikleri şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduklarından, çevre faktörleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyel oluştururlar.

Dünya nüfusu artışına ve sanayi ve endüstri gelişimine bağlı olarak, çevre giderek kirlenmekte ve dünyadaki doğal şartlar ekstrem şartlara doğru kaymaktadır. Dolayısıyla, insanlık, son yıllarda ekstrem durumlardaki hayat şartlarının araştırılması yolunda yoğun çalışmalara girmektedir.

Bakteriler, havada, toprakta, suda bulunabilen çomak, filament, küre veya disk şeklinde olan mikroorganizmalardır. Bunlar yaşayabildikleri ve üreyebildikleri sıcaklık aralığına göre üç gruba ayrılarak incelenirler: Yaşama sıcaklığı 0-20°C arasında değişen bakteriler sakrofilik bakteriler, 20-45°C arasında değişenler mezofilik bakteriler ve genelde 45°C'nin üzerinde yaşayabilen bakteriler ise termofilik bakteriler olarak adlandırılmaktadırlar (1).

Dört büyük bakteri grubundan birisi olan yüksek sıcaklık ve tuz şartlarında yaşayabilen Archaeobacterium'lar genellikle sülfatı indirgeyebilen termofilik bakterilerdir. Ancak tabiatta var olan termofilik bakteriler sadece bu gruba sınırlı değildir. Aynı zamanda tabiatta diğer gruplar içinde de birçok sayıda kesin olarak tür tayinleri yapılmış termofilik bakteri türleri mevcuttur. Bunlar, birbirlerinden farklı olan birçok değişik cins içinde yer almaktadırlar (2).

Günümüzde ekstrem şartlarda yaşayan özellikle termofilik organizmalar genetik mühendisliği ve biyoteknoloji açısından önemlidirler (3). Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması (4), fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik düzenlemelerin yapılabilmesi (5), termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmaları (6) bu organizmaların biyoteknoloji ve genetik mühendisliği açısından önemini oluşturmaktadır. Ayrıca, biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmaların katalizlediğinden çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri

üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır. Bu yüzden, bunlardan elde edilen ürünler de daha uzun ömürlüdürler (6). Termofilik organizmalardan elde edilen enzimler yardımı ile moleküler biyoloji ve biyoteknolojide ihtiyaç duyulan birçok reaksiyon, kolay bir şekilde yapılır hale gelmiştir. Brock (7) tarafından Yellow Stone'da (ABD) keşfedilen, termofilik bir organizma olan *Thermus aquaticus*, moleküler biyolojide yeni bir çağın açılmasına neden olmuştur. Bu organizmadan elde edilen *Taq* DNA polimeraz enzimi yardımıyla moleküler biyolojide çok önemli olan polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) yüksek sıcaklıklarda kolayca yapılır hale gelmiştir. Bu işlemin sonucunda ilgi duyulan DNA fragmentleri kolayca çoğaltılabilmektedir.

Türkiye kaplıcalarında bulunan termofilik mikroorganizmaların izolasyonu ve tür tayinlerinin yapılması hakkındaki çalışmalar henüz çok yeni olup yeterli değildir.

Bu çalışmada, yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, Doğu Karadeniz Bölgesi'nin tek sıcak su kaynağı olan Ayder Kaplıcasının termofilik bakteri florasının belirlenmesine çalışıldı. Bu amaçla kaplıcadan alınan su ve çamurlu su örneklerinden termofilik mikroorganizmaların izolasyonları yapılarak bunların teşhis edilmeleri ve ilerdeki çalışmalarda endüstriyel potansiyellerinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Kaplıca suyu üzerinde yapılan bu çalışma ile kaplıcanın termofilik bakteri florasının ortaya çıkarılması da mümkün olmuştur. Araştırmada, aynı zamanda, sudaki termofilik bakteri sayısı tesbit edilerek bakteri popülasyonunun hangi boyutlarda olduğu tespit edilmiştir.

1.2. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler

1.2.1. Bakteri Hücresinin Yapısı

Prokaryotik canlı hücrelerinin ince yapıları, elektron ve ışık mikroskobu çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Tipik bir prokaryot hücresi, hücre duvarı, hücre zarı, ribozom ve nükleer bölgeden ibarettir (8).

Hücre zarının dışında bulunan hücre duvarı, hücreye destek sağlayan ve onu koruyan bir yapıdır. Prokaryotik canlılar hücre duvarlarının durumuna ve diğer bazı özelliklerine göre dört büyük gruba ayrılarak incelenirler (2). Bunlar; Gram-negatif Eubakteriler, hücre duvarına sahip olan Gram-pozitif Eubakteriler, hücre duvarına sahip olmayan Eubakteriler, Archaeobacterium'lardır.

Hücre zarı, hücreyi dışarıdan gelebilecek olan herhangi bir etkiye karşı koruyucu vazife gören bir yapıdır. Ribozomlar, protein ve ribonükleik asit molekülünden oluşan küçük partiküllerdir. Hücredeki ribozomlar, sadece elektron mikroskobu ile görülebilirler. Bir prokaryotik hücrenin ihtiva ettiği ribozom sayısı 10.000 civarındadır. Bilindiği gibi ribozomlar, translasyonun (protein sentezi) meydana geldiği bölümlerden birisidir ve hücrel protein sentezi ribozomlar üzerinde gerçekleşmektedir.

Prokaryotik ve ökaryotik hücreler arasındaki en önemli fark, nükleer materyalin ökaryotik hücrelerde bir zar yardımı ile sitoplazmadan ayrılıp, nükleus adı verilen organellerde toplanmasıdır. Aksine, prokaryotik hücrelerde nükleer materyal bir zarla sitoplazmadan ayrılmayıp, sitoplazma içinde dağınık olarak bulunmaktadır. Yani prokaryotik hücreler gerçek bir nükleusa sahip değildir. Prokaryotik hücrelerde nükleusun fonksiyonlarını sadece tek ve uzun bir deoksiribonükleik asit (DNA) zinciri yerine getirmektedir. Nükleik asit molekülü, bu hücrelerde az veya çok serbest olarak bulunmaktadır. Bundan dolayıdır ki, bu hücrelerde bir nükleustan ziyade nükleer bölgeden bahsedilmektedir. Ancak bu hücrelerdeki nükleik asit molekülüne de ökaryotik hücrelerdekine benzer olarak kromozom adı verilmektedir. Ayrıca prokaryotik hücreler bu kromozom DNA'sına ilave olarak plazmid olarak adlandırılan, küçük, halka şeklinde DNA'lara sahiptirler.

Hepsi olmamakla birlikte, pekçok prokaryotik mikroorganizma hareket edebilme özelliğine sahiptir. Prokaryotik hücrelerin hareketliliği, genellikle flagella adı verilen organeller yardımıyla olmaktadır. Herbir flagella saç şeklindeki tek bir protein tüpünden ibarettir. Flagellaların

rotasyonu su içerisinde burğu şeklindedir. Bunlar, ışık mikroskobu ile sadece özel boyamalar neticesinde görülebilen, çok küçük yapılardır. Ancak flagellalar elektron mikroskobu ile kolaylıkla görülebilirler (8).

Bakterilerin çapları 0,1-5 µm arasında değişmektedir. Farklı tiplerdeki bakteri hücre şekilleri bilinmektedir. Küresel veya yumurta şeklinde olan bakteriler kok, silindirik şekilli olanlar basil, kıvrılan ve sık sık spiral şekilli yapılar oluşturan bakteriler ise spiral olarak adlandırılmaktadır (8).

Birçok grup bakteride hücreler biraraya gelerek gruplar veya kümeler oluştururlar ve bu grupların düzenlenmesi organizmaların sınıflandırılmasında kullanılan özelliklerden birini teşkil etmektedirler. Örneğin koklar ve basiller biraraya gelerek uzun zincirler oluşturabilirler (8).

Bir grup bakteri, karşılaştığı uygun olmayan şartlarda hayatını devam ettirebilmek için endospor olarak adlandırılan, dayanıklı, dinlenme formu olan yapılar oluşturmaktadır. Endosporlar, bakteri hücresi içerisinde meydana gelen, ısıya karşı oldukça dirençli olan ve kaynama ile bile kolaylıkla ölmeyen dayanıklı yapılardır. Spor oluşturabilen bakteriler mevcut olduğunda, besinlerin ve diğer kolaylıkla bozulabilen ürünlerin ısıyla sterilizasyonu zordur. Aktif olarak büyüyen bakteriler spor oluşturmazlar, ancak büyüme açlık veya diğer bazı durumlardan dolayı spor oluşumu başlatılabilir. Bakteri sporları, normal hücrelere göre ısıya olduğu kadar kurumaya, radyasyona ve ilaçlara karşı da dirençlidirler. Sporlar inaktif halde, uykuda yıllarca canlı kalabilirler. Bununla birlikte sporlar, birkaç dakika içinde normal bir hücreye geri dönüşebilirler. Sporların normal bir hücreye geri dönüşümü, germinasyon (yeniden üreme) olarak adlandırılmaktadır. Germinasyon olayı yardımıyla spordan yeni bir vejetatif hücre meydana gelmektedir. Sporum germinasyonu başlar başlamaz, ısıya ve diğer zararlı ajanlara karşı olan dirençlilik özelliği kaybolur (8).

Çoğu prokaryotik hücreler yüzeylerinde sümüksü veya sakız gibi yapışkan maddeler meydana getirirler. Bu yapışkan maddeler, ekstrasellular polisakkaritten oluşmaktadır. Meydana gelen bu yapılara "kapsül" veya "yapışkan tabaka" denilmesine rağmen, daha genel bir terim olarak bunlara "glikokaliks" adı verilmektedir. Genel olarak glikokaliks, hücrenin dışında bulunan, polisakkarit ihtiva eden bir yapı olarak bilinmektedir. Glikokaliks, organizmanın türüne göre değişmesine rağmen, genellikle glikoproteinleri ve çok fazla sayıdaki farklı polisakkaritleri içermektedir. Glikokaliksin içerdiği polisakkaritler, polialkoller ve amino şekerlerden müteşekkildirler.

Organizmanın kimyasal tabiatına göre, glikokaliks tabakası kalın, ince, sert veya esnek olabilir (8).

Glikokaliks tabakası, bakterilerde birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Bakterinin dışındaki bu polisakkarit tabaka, patojenik mikroorganizmaların konaklarına tutunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bilindiği gibi kapsüle sahip olmayan mikroorganizmaların patojenite meydana getirmek için konak hücreye girip hastalık oluşturmaları zordur. Kapsüle sahip olmayan böyle bir organizma, hücredeki immün mekanizma tarafından kolayca tanınmakta ve ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca polisakkarit tabakası bir miktar suyu da bağlayabildiğinden, glikokaliks tabakasının kurumaya direnç sağlanmasında önemli olduğu bilinmektedir (8).

1.2.2. Bakterilerin Hücre Duvarı Varlığına ve Yapısına Göre Sınıflandırılması

a) Gram-Negatif Eubakteriler

Gram-negatif tipe örnek teşkil eden bakteriler dış membran, iç membran ve ince bir peptidoglukan tabakasına sahiptirler (peptidoglukan tabakaları muramik asid ihtiva eder, ancak muramik asid çoğu organizmada mevcut olmakla beraber birkaç organizmada duvarın bu kısmı kaybolmuştur) (8). Bu bakteriler genellikle Gram-negatif olarak boyanırlar. Hücre şekilleri küresel, oval, düz veya eğilmiş basil, heliks veya filament şeklinde olabilir. Bazılarının üzerinde bir örtü veya kapsül bulunur. Üremeleri genellikle devamlı olarak bölünme ile veya bazı gruplarda tomurcuklanma ile olur. Yüzme ve kayma şeklinde hareketler gözlenebildiği gibi, hareketsiz olanlar da vardır. Bu bölümde yer alan bakteriler fototrofik veya fototrofikte olmayabilirler (litotrofik ve hetetrofik). Aynı zamanda bakteriler aerobik, anaerobik, fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik türler olabilirler. Türlerden bazıları zorunlu hücre içi parazitleridir.

b) Hücre Duvarına Sahip Olan Gram-Pozitif Eubakteriler

Bu gruba giren organizmalar, Gram-pozitif tipli hücre duvarına sahip olan prokaryotik canlılardır. Gram reaksiyonları genellikle pozitif, bazen de negatif olabilir. Hücreler yuvarlak, çubuk şeklinde veya filamentler halinde olabilirler. Çomak ve filamentlerin dallanma göstermediği durumlar olduğu gibi, tersine gerçek dallanma gösterenler de mevcuttur. Üremeleri genellikle ikiye bölünme şeklinde olur. Bazıları dinlenme formu

olarak spor oluştururlar. Fotosentetik olmayıp, genel olarak kemosentetik heteretrofturlar. Aerobik, anaerobik, fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik türleri içermektedirler. Bu bölümün üyeleri sporla üreyen ve üremeyen türleri içermektedir.

c) Hücre Duvarına Sahip Olmayan Eubakteriler

Bu gruba giren bakteriler, hücre duvarları olmayan ve peptidoglukanın ön maddelerini sentezleyemeyen prokaryotik canlılardır. Yüzeyleri hücre zarı adı verilen tek bir zarla çevrilidir. Hücre şekilleri çok değişken olup, çok büyük ve çok küçük boyutlarda olabilirler. Dallanmış yapıda olan çıkıntılı filament şeklindeki formları yaygındır. Üremeleri tomurcuklanma, parçalanma veya ikiye bölünme ile olur. Genellikle hareketsizdirler, ancak bazı türler kayma şeklinde hareket ederler. Endospor oluşturmazlar. Hücreler, Gram-negatif olarak boyanırlar. Ribozomal RNA'nın G+C oranı %43-48'dir. DNA'larının G+C oranı oldukça düşük olup %23-46'dır. Bu gruba dahil olan Mycoplazmaların genom büyüklükleri diğer prokaryotlardan çok daha küçük olup $0,5-1,0 \times 10^9$ daltondur. Mycoplazmalar saprofitik, parazitik veya patojenik olabilirler. Bunların meydana getirdiği patojenler hayvan, bitki ve doku kültürlerinde büyük problemlere sebep olurlar.

d) Archaeobacteria

Anaerobik şartlarda çok tuzlu, hidrotermal veya jeotermal olarak ısıtılmış çevrelerde yaşarlar. Bazı türleri, hayvanların sindirim sisteminde simbiyotik hayat sürer. Bunlar kemolitotropik, organotropik veya fakültatif organotropik olarak büyüyen fakültatif anaerob, anaerob veya aerobik canlılardır. Archaeobacterium'lar mezofilik veya termofilik olabilirler. Bunların içindeki bazı türler 100°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabilirler.

Hücre zarı çok değişik tiplerde olabildiğinden, Gram boyama negatif veya pozitif olabilirler. Gram-pozitif olan türler pseudomurein, metanokondroidin ve heteropolisakkarit hücre duvarlarına sahiptirler. Gram-negatif hücrelerin yüzeylerinde (gliko-) protein tabakalar bulunmaktadır. Hücreler yuvarlak, spiral, düz veya çomak şeklinde olabilir. Tek ve çok hücreli filamentler veya bileşik filamentler halinde bulunabilirler. Hücrelerin çapları $0,1-15 \mu\text{m}$ olabilir ve filamentlerin boyu 200 mm 'ye kadar çıkabilir. Üremeleri ikiye bölünme, tomurcuklanma, parçalara ayrılma veya bilinmeyen mekanizmalarla olabilir.

Archaeobacterium'ların ihtiva ettikleri büyük gruplar şunlardır: Metanojenik archaeobacterium'lar, archaeobacterium'lar sülfat indirgeyiciler, tamamen halofilik archaeobacterium'lar, hücre duvarı olmayan archaeobacterium'lar ve tamamen termofilik olan S° metabolizmasına sahip olan archaeobacterium'lardır.

1.2.3. Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Aralığına Göre Gruplandırılmaları

Tabiatta mevcut olan bütün bakteriler yaşadıkları sıcaklık aralığına göre üç gruba ayrılarak incelenmektedirler (1). Bu gruplar şöyle sıralanmaktadır:

a) Sakrofiller: -5 ile 20°C arasında yaşayan bakteriler sakrofiller grubuna girmektedir. Bunların en önemli ayırt edici özellikleri 0 ile 5°C arasında büyüebilmeleridir.

b) Mezofiller: $20-45^{\circ}\text{C}$ arasında yaşayan bakteriler bu gruba girmektedirler. Ayırt edici en önemli özellikleri insan vücut sıcaklığında (37°C) büyüebilme özellikleridir. Diğer bir özellikleri 45°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilmeleridir. Mevcut olan tüm mezofilik bakteriler iki grup altında incelenmektedirler.

1) Örnek olarak bitki saprofitlerinin verildiği optimum yaşama sıcaklıkları, $20-30^{\circ}\text{C}$ arasında değişen bakteriler bu gruba girmektedirler.

2) Sıcak kanlı hayvanların vücudunda yaşayan ve optimum üreme sıcaklıkları $35-40^{\circ}\text{C}$ arasındaki bakterilerdir.

c) Termofiller: Termofilik organizmalar hakkında birkaç tanım bulunmaktadır. Bir tanıma göre $45-50^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde yaşayabilen bakteriler olarak adlandırılırken (5), diğer bir tanıma göre ise yüksek sıcaklıklarda yaşama yeteneğinde olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (3). Ancak yapılan bu tanıma göre, yaşayabildikleri sıcaklık derecesi organizmanın içinde bulunduğu gruba göre değişmektedir. Termofilik bakteriler iki gruba ayrılarak incelenmektedir.

1) Fakültatif Termofilik Bakteriler: Optimum yaşama sıcaklığı $45-60^{\circ}\text{C}$ arasında olan, ancak 37°C 'de de üreyebilen termofilik bakterilerdir.

2) Tamamen Termofilik Bakteriler: Optimum yaşama sıcaklığı 60°C 'nin üzerinde ve minimum yaşama sıcaklığı 50°C civarında olan termofilik bakteriler bu gruba girmektedirler.

Yukarıda da tanımlandığı gibi termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşama özelliğinde olan canlılardır (3). Yaşayabildiği sıcaklık

derecesi organizmanın içinde bulunduğu gruba göre değişmektedir. Aşağıda verilen tabloya bakıldığında sadece sınırlı sayıdaki organizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşadığı görülmektedir (9). Ancak, Tablo 1'deki her bir grup açısından en yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmaların, o gruplar için termofilik oldukları söylenilebilir. Yani omurgalılarda 37°C'de yaşayan türler, mantarlarda ise 60°C civarında yaşayan türler termofilik olarak adlandırılmaktadır. Cyanobakterilerde ise bu sınırın 70°C olduğu kaydedilmiştir (9).

Termofilik bakteri tanımlamalarını karıştıran diğer bir durum da, endospor oluşturmaları dolayısıyla çok değişik sıcaklık aralıklarında yaşadıkları sıcaklıktan çok daha değişik sıcaklıklara tolerans gösterebilen bakterilerin varlığıdır. Ancak sınıflandırmada önemli olan popülasyonun aktif olarak yaşadığı sıcaklık aralığıdır.

Tablo 1. Organizmaların Maksimum Büyüme Sıcaklıkları

Grup	Maksimum. Sıcaklık (°C)
Hayvanlar	
Balık ve diğer karasal omurgalılar	38
Böcekler	45-50
Ostracodlar	49-50
Bitkiler	
Damarlı bitkiler	45
Karayosunları	50
Okaryotik Mikroorganizmalar	
Protozoalar	56
Algler	55-60
Mantarlar	60-62
Prokaryotik Mikroorganizmalar	
Cyanobakteriler (Mavi-yeşil algler)	70-73
Fotosentetik bakteriler	70-73
Kemolitotrofik bakteriler	>100
Heterotrofik bakteriler	>100

1.3. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgiler

Araştırmaya konu olan Ayder Kaplıcası, Ayder Yaylası sınırları içindedir. Ayder Yaylası Rize ilinin Çamlıhemşin ilçesinin güney batısında, ilçe merkezine 18 km uzaklıkta yer almaktadır. Ayder Kaplıcası, Doğu

Karadeniz Bölgesinin tek kaplıca kaynağıdır. İkiyüzaltmış metre derinlikten çıkarılan 57°C'lik suyun eriyik mineral değeri düşüktür. Ancak radyoaktif bileşime sahiptir. Kükürt içermesi tedavi etkisini arttırmaktadır. Kaplıca, mide-ülser yaraları, cilt hastalıkları, deri yaraları, kesikler, allerjiler vb. hastalıklar için faydalıdır. Ayrıca sinir sisteminin uyarılması ve romatizmal hastalıklarda da fayda sağlamaktadır (13).

T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Çevre Sağlığı Müdürlüğü tarafından verilen maden suyu analiz raporuna göre Kaplıca suyunun özellikleri şöyledir (14):

Tablo 2: Ayder Kaplıcası Suyunun Özellikleri

Morfolojik Özellikler		Kasyonlar (mg/lit)		Anyonlar (mg/lit)	
Renk ve Tortu	Renksiz, Tortu var	Na ⁺	49,263	SO ₄ ⁻	56,400
Tat ve Koku	Gazlı, Kokusuz	Ca ⁺⁺	4,008	Cl ⁻	7,200
pH	9,64	Mg ⁺⁺	2,433	HCO ₃ ⁻	73,200
Nitrit	Yok	Fe ³⁺ -Al ³⁺	1,226	NO ₃ ⁻	0,710
Amonyak	Yok			H ₂ SO ₄	20,800
Toplam Sertlik (ETDA ile)	2,0				
Karbondioksit (CO ₂)	0,273 mg/lit				

1.4. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

1.4.1. Termofilik Bakterilerin Çeşitliliği

Yukarıda da açıklandığı gibi organizmalar yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere gruplandırılmaktadırlar. Termofilik organizmalar 55°C'den daha yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen organizmalardır (9). Birkaç protozoa türü 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilmesine rağmen, çok hücreli hayvanların 55°C'den yüksek sıcaklıklarda yaşayamadığı bilinmektedir. Bundan dolayı, 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda sadece mikroorganizmaların bazı türlerinin yaşayabildiği görülmektedir. Ökaryotik organizmalar için maksimum büyüme sıcaklığı 60°C civarındadır (9). Ökaryotik organizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşayamamalarının nedeninin nükleer membran sistemlerinin ısıya dayanıklı bir şekilde inşaa edilmemiş olmasının olduğu düşünülmektedir. Fox ve arkadaşları (3) ile Woese ve Wolfe (11) yaptıkları detaylı 16S ribozomal RNA analizleri ile

dünya üzerinde var olan bütün termofilik türlerin filogenetik analizlerini ortaya koydular. Yapılan bu analizler neticesinde üç büyük farklı grup ortaya çıkarıldı. Bunlar; archaeobacterium'lar, eubakteriler ve ökaryotlardır. Bu çalışmada termofilik bakteriler 55°C ve üzerindeki sıcaklıklarda büyüeyebilen organizmalar olarak tanımlandı ve bunların hem archaeobacterium'lar hem de eubakteriler içerisinde yer aldıkları vurgulandı.

Ancak bütün prokaryotik organizmaların da 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayamadığı bilinmektedir. Yayınlanan cinslerden birkaçı ve hatta bu cinsler içindeki bazı türlerin yüksek sıcaklıklarda büyüeyebildiği görülmektedir. Tamamen termofilik veya büyük oranda termofilik olan S° metabolizmasına sahip bakteri grubu, tamamen termofilik olan cinsleri içerirken, diğer bazı cinslere ait türlerin de termofilik özellik gösterdikleri bilinmektedir. Bunlar; *Thermolephilum*, *Thermomicrobium*, *Thermus*, *Desulfatamaculum*, *Chromatium*, *Chloroflexus*, *Heliothrix*, *Pleurocapsa*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Thermothrix*, *Sulfobacillus*, *Isosphaera*, *Thermonema*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Desulfatamaculum*, *Thermoanaerobacter*, *Streptoalloteichus*, *Thermonospora*, *Thermoactinocys*, *Methanobacterium*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Thermoplazma*, *Pseudocardina*, *Actinomadura*, *Acetogenium*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Fervidobacterium*, *Thermobacteroides*, *Thermosiphon*, *Thermotoga*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfurella*, *Sulfidobacillus*, *Acetogenium*, *Rutrobacter*, *Sphaerobacter*, *Microbispora*, *Methanohalobium* cinslerine ait türlerdir (2). Böylece belli prokaryot türleri yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmektedirler. Fotosentetik prokaryotların yaşayabildiği en yüksek sıcaklık aralığı 70-73°C'dir. Dünyanın birçok bölgesinde 70°C'lik sıcaklıklarda fotosentetik organizmalar bulunmamaktadır (9).

Fotosentetik organizmalar 73°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayamamalarına karşın, inorganik enerji kaynağı olarak elemental sülfid, elemental kükürt ve ferrik haldeki demiri kullanan ototrofik organizmalar bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilirler. Buna ilaveten, kemolitotrofik ve heterotrofik bakteriler kaynar veya ona yakın sıcaklıktaki sularda kolaylıkla yaşayabilirler. Kaynar sularda yaşayan bakteri sayısı hayret verici bir şekilde yüksektir. Bunlar; kükürt bakterileri, hidrojeni oksitleyen bakteriler, elemental kükürtü kullanan bakteriler, tamamen anaerobik olan heterotroflar ve aerobik heterotroflardır. Adı geçen bu bakterilerden bazıları hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda

yaşayabilirler. Aynı zamanda bu bakteriler sadece termofilik bakteriler olmayıp asidofilik özellik de göstermektedirler.

Tarsey ve Brock (10) ve Brock (9) tarafından termofilik mikroorganizmalar hakkında, bunların özelliklerinin bir özetini yansıtan derlemeler yapılmıştır. Bu çalışmalar incelendiğinde birçok sayıda termofilik bakteri türünün olduğu görülmektedir. Yayınlanan bu termofilik türlerden en yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmaların hepsinin de archaeobakterler grubuna ait oldukları görülmektedir.

Tablo 2'de de görüldüğü gibi son yıllarda birçok sayıda ve ilgi çekici termofilik bakteri türü tanımlanmıştır.



Tablo 3: Son Yıllarda Ortaya Çıkarılan Termofilik Bakteri Türleri

<p>Archaeobacteria Aerobik, asidofil, ototrof <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (tip suşu) <i>Sulfolobus brierleyi</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i> Bu türler 70-90°C arasında büyürler (optimum, 75-85°C); Aerobik, asidofil, ototrof, pH1-4; enerji kaynağı olarak S° ve organik bileşikleri kullanırlar; elektron tutucusu olarak O₂ veya Fe³⁺'yi kullanırlar.</p>
<p>Thermoproteales <i>Thermoproteus tenax</i> <i>Desulfurococcus mobilis</i> <i>Desulfurococcus mucosus</i> <i>Thermophilum pendens</i> <i>Thermococcus celer</i> 70-85°C'de büyürler (optimum, 85°C); anaerobik; acidofilik ve nötrofilik olabilirler; enerji kaynağı olarak organik bileşikleri kullanırlar; elektron tutucu olarak S°'yi kullanırlar.</p>
<p>Methanothermaceae <i>Methanothermus fervidus</i> 70-95°C arasında ürer (optimum, 85°C); anaerobiktir; H₂ ve CO₂'yi kullanır.</p>
<p>Methanococcales <i>Methanococcus jannaschii</i> 60-90°C arasında ürer (optimum, 85°C); anaerobiktir; H₂ ve CO₂'yi kullanır.</p>
<p>Pyrodictum <i>Pyrodictum brockii</i> <i>Pyrodictum occultum</i> 85-110°C arasında ürerler (optimum, 105°C); anaerobiktirler; H₂ ve S°'i kullanırlar; ototrofturlar.</p>
<p>Diğer termofiller- Hepsi anaerobtur. <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>- Optimum olarak 65°C'de ürer ve etanol üretir. <i>Clostridium thermosulfurogenes</i>- Optimum olarak 60°C'de ürer; pektini fermente eder; S₂O₃'den S° meydana getirir. <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>- Optimum olarak 65°C'de ürer ve etanol üretir. <i>Thermoanaerobium brockii</i>- Optimum olarak 65°C'de ürer ve etanol üretir. <i>Thermobacteroides acetoethylicus</i>- Optimum olarak 65°C'de ürer. <i>Thermodesulfobacterium commune</i>- Optimum olarak 70°C'de ürer.</p>

1.4.2. Termofilik Mikroorganizmaların Habitatları

Dünya üzerindeki tabii jeotermal habitatlar yapısal olarak aktif zonlarla ilişkilidirler. Bu alanlar yerin iç bölgelerinde magmatik maddeleri ihtiva eden sedimentlere sahiptirler. Bunlar dünya yüzeyi ile ilişkilidirler ve dünya için ısı kaynağı olarak iş görürler. Deniz suları veya yeraltı suları yeryüzüne ısınarak çıkarlar ancak litotrofik basınç yüzünden kaynamazlar. Yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtiği alanlardaki bazı mineralleri çözerek mineral maddelerce zengin duruma gelirler. Bu suların çoğu hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce çok zengin oldukları bilinmektedir. Bu sulardaki klor ve bikarbonat iyonları genellikle baskın olan anyonlardır. Termal suların tam kompozisyonları, suyun yeryüzüne çıkması sırasında içinden geçtiği kayalara ve suyun sıcaklığına göre değişmektedir.

Jeotermal kaynakların tabii yerleşiminden dolayı, termal habitatlar genellikle dar alanlarda toplanmışlardır ve bu alanlar termal havzalar olarak adlandırılmaktadır. Yer altındaki termal kaynağın su miktarı düşük olduğu durumda, yer yüzüne sıcak sudan ziyade bir püskürme (buhar) olarak çıkar. Böyle püskürme ile oluşan termal kaynaklar volkan olarak adlandırılmaktadır. Dünyanın çeşitli bölgelerine yayılmış durumda birçok volkan bilinmektedir.

Jeotermal habitatların diğer bir tipi derin deniz diplerindeki jeotermal alanlardır. Bunların orijinleri de nötral olarak kaynayan kaplıca sularınıninkine benzerdir. Ancak, bu alanlarda yeraltı suyunun kaynağı, tatlı sudan ziyade deniz suyudur. Bu yüzden deniz dibi habitatları çeşitli minerallerce çok zengindir (3).

Termofilik bakterilere yukarıda sayılan bütün bu jeotermal alanlarda rastlanılmaktadır. Bu alanlara örnek olarak nötral pH'lı kaplıcalar, kükürtçe zengin asidik kaplıcalar ve derin deniz dipleri verilebilir. Kükürtçe zengin alanlarda en çok rastlanan bakteriler archaeobacterium'lardan olan *Sulfolobus*'lar olmasına rağmen bu alanlarda diğer archaeobacterium'lara da rastlanmaktadır. Nötral pH'lı kaplıca kaynaklarında, *Pyrodictium*'a (12) benzer organizmalar baskın olarak bulunmaktadır. Buna karşın, termofilik metanojen bakteriler, örneğin *Methanococcus jannaschii* (3) gibi türler derin deniz dibi alanlarından izole edilmiştir.

1.4.3. Termofilliğin Moleküler Temelleri

Termofilik organizmaların makromoleküler yapılarının kalıtsal olarak, ısıya dayanıklı şekilde meydana geldiği bilinmektedir. Makromoleküler ısıya dayanıklılığın temellerinin makromoleküllerdeki küçük değişikliklerle meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Hidrofobik etkileşimlerdeki, hidrojen, kükürt-kükürt ve iyonik bağlardaki küçük değişimler ısıya karşı dirençliliğin meydana gelmesi için yeterlidir. Yapılan bir çalışmada (15), bir gendeki tek bir nükleotidin değişmesinin, meydana geldiği proteindeki tek bir aminoasitin değişmesine neden olduğu ve böylece bakterinin ısıya karşı olan dirençliliğinin 10°C kadar artmasına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Burada sözü edilen enzim, kanamisin nükleotidiltransferaz'dır. Termofilik bir bakterinin transfer RNA'sının, bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (16). Yapılan bu çalışmada, *Thermus thermophilus*'un tRNA'sındaki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuştur.

1.4.4. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından bazı büyük faydalar sağlamaktadır (3). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar şunlardır: Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi, termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmaları. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardan çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (3).

Endüstride enzimlerin kullanıldığı metodlar, işlemlerin yüksek sıcaklıklarda meydana getirilirmesi durumunda bazı farklı avantajlar sağlar. Isının artırılmasıyla, difüzyon hızında ve gaz olmayan çoğu bileşiklerin çözünürlüklerinde bir artış meydana gelir. Ayrıca ısının yükselmesi, suyun yüzey gerilimini ve viskozitesini (sürtünmesini) azaltır. Böylece enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar üzerine bazı pozitif etkiler

meydana getirilmiş olur. Çok miktarda madde kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar, genellikle difüzyon etkisi yüzünden olumsuz olarak etkilenmektedir. Termofil organizmalardan elde edilecek bir enzim ile böyle büyük reaksiyonlar yapılacak olursa, bu enzimler difüzyonu artırdıklarından, reaksiyonların daha hızlı olması mümkündür. Buna ilave olarak, işlem sırasında meydana gelebilecek olan mikrobiyal kontaminasyon, eğer reaksiyon yüksek sıcaklıkta yapılırsa daha az miktarda meydana gelecektir, çünkü biyolojik döngüde çürümeye neden olan bakterilerin çoğu mezofilitirler (3).

Yüksek sıcaklıklarda meydana getirilen mikrobiyal fermentasyonlar, bazı potansiyel avantajlara sahiptirler. Metabolik aktiviteler sonucunda ısı meydana gelmesi ve bu yüzden fermentörlerin soğutulma gereksinimi, geniş ölçekli işlemlerde ciddi problemlere neden olur. Termofilik fermentörler geniş ölçekli bir soğutmaya gerek duymadığından, olayda bir enerji tasarrufu söz konusudur. Endüstriyel işlemlerin çoğunun potansiyel kazancı etanolün üretilmesidir. Termofilik etanol üretimi sürecinde üç avantaj bulunmaktadır: 1) Yüksek ısı, etanolün daha verimli bir biçimde distilasyonuna neden olur. 2) Soğutma ihtiyacı ya azaltılır ya da tamamen ortadan kaldırılır. 3) Bazı termofilik bakteriler, polisakkaritlerin direkt olarak etanole fermentasyonunu meydana getirirken, mayalar (bunlar ticari olarak alkol üreten organizmalardır) polisakkarit polimerlerinin hidrolizini yapamazlar. Weimer (4) *Clostridyum thermocellum*'la etanol fermentasyonunu, Beguin ve Millet (5) bu organizmanın endüstride kullanımını incelemiştir.

Termofilik bakterilerin atık maddelerin yok edilmesinde, potansiyel olarak kullanılması, Zinder (17) tarafından çalışılmıştır. Termofilik organizmalar kullanılarak, anaerobik olarak atık yok edilmesi işlemi şu avantajları sağlamaktadır: 1) Reaksiyon hızı artar ve reaksiyon süresi azalır. 2) Atıkta bulunabilecek olan patojenik mikroorganizmalar yok edilir. 3) Sürtünme az olacağından, atıkların karışması için daha az enerji kullanılır. 4) Elde edilen çöpler sudan daha kolay arıtılır. Yine aynı araştırmacı, termofilik yıkım işleminin bazı belli başlı dezavantajlarını da açıklamıştır. Bu dezavantajlar; ısıtma için yüksek enerjinin gerekliliği ve işlemin kararlı olarak uzun zaman sürdürülmesinin zorluğudur. Bilindiği gibi atık yok edilmesinde bu olay çok önemlidir. İşlemin son bir dezavantajı ise termofilik yıkım işleminden çıkan sıvının kalitesinin kötü olmasıdır, ancak bunun sebebi hala açıklanamamıştır.

1.5. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kriterler

1.5.1. Bakterilerin Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri

Bakterilerin tür tayinlerinde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özellik, hücre şeklidir. Hücre şeklinin ortaya çıkarılması için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenerek hücre şekli ortaya çıkarılır (18).

Bakteriyolojide kullanılan en önemli ayırt edici boyamalardan birisi, Dr. Christian Gram tarafından ortaya çıkarılan ve adını bu bilim adamından alan, Gram boyamadır. Bu boyamanın sonucuna göre, bakteriler iki gruba ayrılmaktadır. Gram boyamasına göre bakteri hücreleri Gram-pozitif ve Gram-negatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Ayrıca Gram boyama yönünden değişken özellik gösteren ve hücre duvarına sahip olmamaları dolayısı ile Gram reaksiyonu vermeyen mikroorganizmaların varlığı da bilinmektedir. Bu özellik, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılan çok önemli ve gerekli olan bir özelliktir (1). Gram-pozitif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglukan tabakası kalınken, Gram-negatif olarak boyanan bakterilerin peptidoglukan tabakası ise daha incedir.

Anaerobik bakteri cinsleri olan *Clostridium* ve *Desulfotomaculum* ve aerobik cins olan *Bacillus*'a ait olan türler, aktif olan vejetatif hücre formlarının yanında, çevre şartlarına çok dayanıklı, metabolik olarak inaktif olan ve spor olarak adlandırılan hücre şekline sahiptir. Çevresel şartlar bakterinin yaşaması için uygun olmayan hale geldiğinde, hücre sporogenesis olayına maruz kalır ve endospor adı verilen yeni bir hücre içi yapı meydana gelir. Oluşan bu hücrenin etrafı su geçirmeyen bir tabakayla çevrilidir. Eğer ortam şartları uygun olmayan durumda uzun süre kalırsa endospor içinde bulunduğu hücreyi yıkarak dışarı çıkar ve ortaya bağımsız bir spor çıkar. Dışındaki kabuğun kimyasal yapısından dolayı sporlar, ısıya, donmaya, radyasyona, susuzluğa ve kimyasal maddelere karşı dirençlidirler. Ortam şartları normale döndüğünde, spor metabolik olarak aktif hale geri döner ve germinasyon sırasında dayanıklılık özelliği de yavaş yavaş kaybolur (1).

1.5.2. Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

1.5.2.1. Bakterilerin Fiziksel İhtiyaçları

Bakterilerin sınıflandırılmasında, yaşadıkları ortamın pH'ı, tuzluluğu, sıcaklığı ve oksijen miktarı gibi kriterler kullanılan özelliklerden bazılarıdır.

Sıcaklık, hücresel enzimler üzerinde etkili olarak, kimyasal reaksiyonların hızını etkilemektedir. Genellikle, bütün hücre tiplerinde enzimatik aktivitelerin meydana geldiği optimum sıcaklık 20-40°C civarındadır. Düşük sıcaklıklar, enzim aktivitesini yavaşlatır ya da inhibe eder, bu münasebetle hücre metabolizması yavaşlar veya durur. Buna bağlı olarak, hücre büyümesi yavaşlar ya da inhibe olur. Yüksek sıcaklıklar pıhtılaşmaya sebep olduğundan, ısıya dayanıksız olan enzimler, dönüşümsüz olarak denatüre olurlar. Buna karşın enzimlerin ısıya karşı duyarlılık dereceleri farklı farklıdır ve çoğunlukla gerekli olan enzimlerin 70°C'nin üzerinde bozdukları bilinmektedir (18). Ancak, termofilik bakteriler ısıya dayanıklı enzimler üretmeleri sebebiyle önemlidirler ve bilinen bazı *Bacillus* ve *Clostridium* türleri hem yüksek hem de düşük sıcaklıklarda yaşayabildiklerinden önemlidirler (19).

Hücresel enzim aktivitesini etkileyen diğer bir fiziksel etki de pH'dır. Hücrelerin genellikle yaşayabildikleri optimum pH, nötral pH olan 7'dir. Ortamdaki hidrojen iyonlarının konsantrasyonunun artması, pH'nın 7'nin altına yani asidik yöne çekilmesine, hidrojen iyonlarının konsantrasyonlarının azalması, ise pH'nın bazik yöne, yani pH'nın 7'nin üzerine çıkmasına neden olur. pH'da meydana gelen artış ve düşüşlerin her ikisi de, hücredeki kimyasal reaksiyonların hızlarının düşmesine neden olur. Bunun sebebi, bu durumda hücresel enzimlerin bozulmasıdır. Bu yüzden, büyüme hızı ve hayat etkilenmiş olur (1).

Çoğu hücrelerin hayatlarını devam ettirebilmeleri için, gerekli olan gaz atmosferik oksijendir. Bilindiği gibi oksijen solunumun biyooksidatif süreci için gereklidir. Atmosferik oksijen, adenozin trifosfatın (ATP) oluşumunda ve enerjinin hücresel aktiviteler için kullanılacak şekle dönüştürülmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerofiller, tamamen anaeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olarak gruplandırılmaktadırlar. Oksijenin varlığında solunum için gerekli olan

enzimlerden yoksun olan anaerobik bakteriler anaerobik şartlarda solunum olayını meydana getirmektedir (1).

1.5.2.2. Bakterilerin Biyokimyasal Aktiviteleri

Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içinde hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteleri meydana getirmektedir. Bu olaylar, genel olarak iki şekilde incelenmektedir (1).

a) Ekstraselüler Enzimler: Bu enzimler, hücre dışındaki substratlar üzerine etkili olmaktadır. Büyük moleküler ağırlığa sahip olan maddeler hücre zarından geçemezler, bundan dolayı, bu maddeler (polisakkaridler, lipidler, proteinler) daha küçük moleküler ağırlığa sahip olan maddelere dönüşmelidirler. Ancak, bu durumda hücre zarından geçebilirler. Bu büyük moleküler ağırlığa sahip olan maddeleri parçalayan enzimler, hidrolitik enzimler olarak adlandırılmaktadırlar. Böylece büyük moleküler ağırlıklı maddeler daha küçük maddelere dönüştürülmüş olurlar. Hücre dışında görev yapan enzimler nişastanın, lipidlerin, kazeinin ve jelatinin hidrolizinden sorumlu olan enzimlerdir. Bu enzimler tarafından hidrolize edilen büyük moleküller, hücre içine alınabilirler (1).

Nişasta, yüksek moleküler ağırlığa sahip olan, glukoz moleküllerinin glikozidik bağlarla bağlanmasıyla meydana gelen dallanmış yapıda bir polimerdir. Bu makromolekülün parçalanması için, ekstraselüler bir enzim olan amilaz gerekmektedir. Enzim, bu molekülü daha kısa yapıda olan ve dekstrin olarak adlandırılan polisakkaritlere dönüştürür. Meydana gelen bu moleküllerde daha sonra maltoz moleküllerine çevrilir. Maltaz enzimi ile katalizlenen bu disakkaritlerin en son hidrolizleri sonucunda düşük moleküler ağırlıklı, suda çözünebilen glukoz molekülleri meydana gelir. Böylece, moleküller hücre içine transfer edilebilecek duruma gelmiş olur. Glukoz monomerleri, glikoliz metabolizmasında enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Mikroorganizmaların nişastayı hidroliz edip etmedikleri nişasta hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (1).

Kazein sütte bulunan proteinlerin başlıcasıdır. Hücre tarafından asimile edilmeden önce, bu makromolekülün peptonlara, polipeptidlere, dipeptidlere ve en sonunda da hücrenin yapısına girebilecek olan amino asitlere çevrilmesi gerekmektedir. Proteazlar tarafından katalizlenen bu olay peptonizasyon veya proteoliz olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimin olaydaki fonksiyonu, moleküle su moleküllerini katarak peptid bağlarını

yıkmasıdır. Reaksiyonlar sonucunda oluşan küçük moleküler ağırlıklı amino asitler, hücredeki fonksiyonel ve yapısal protein sentezinde kullanılmak üzere, hücre zarı vasıtası ile hücre içine alınmaktadır. Organizmaların kazeini hidroliz edip etmedikleri, kazein hidrolizi testi ile ortaya çıkarılmaktadır (1).

Jelatin zorunlu amino asitlerden biri olan triptofanı içermeyen, bu yüzdede eksik protein olarak adlandırılan bir makromoleküldür. Eksik bir protein olması dolayısıyla, hücre için besleyici değeri tartışılır olmasına rağmen, bakteri türlerinin karakterizasyonunda çok önemli olan bir makromoleküldür. Jelatin, insan ve diğer hayvanlardaki bağ dokusu ve tendonların büyük bileşeni, kollajenin hidrolizi sonucu meydana gelmiş olan bir proteindir. 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda jelatin katı olmasına karşın, 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise sıvıdır. Mikroorganizmalar, bu proteini, jelatinaz adı verilen bir enzim yardımıyla amino asitlere kadar parçalar. Bu parçalanma bir kez meydana geldikten sonra, +4°C'de bile katı hale dönme özelliği geri kazanılmaz (1). Jelatinin bakteriler tarafından hidroliz edilip edilmediği, jelatin hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (20).

b) İntraselülar Enzimler: Bu enzimler hücre içerisinde faaliyet gösteren enzimlerdir ve hücre için gerekli olan yeni protoplazmik ihtiyaçların sentezinden sorumludurlar. Bu enzimlerin diğer görevleri ise, hücre içerisine asimile olan materyallerden hücrenel enerji elde edilmesidir.

Enzimler yardımı ile meydana gelen değişim, hücrenin yaşaması ve fonksiyonu için gereklidir ve hücrenel metabolizmanın temelidir. Meydana gelen bu metabolik işlemler sonucunda, metabolik ürünler oluşur ve bundan sonra çevreye verilir. Oluşan bu son ürünlerin anlaşılması, sadece özel enzim sistemlerinin aydınlatılması için değil, aynı zamanda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve teşhisinde de kullanılmaktadır (1).

Çoğu mikroorganizmalar, kendileri için gerekli olan enerjiyi, karbohidratlar gibi substratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler. Organizmaların karbohidratları kullanımı sahip oldukları enzim sistemlerine göre değişmektedir. Bazı organizmalar, glukoz gibi şekerleri anaerobik olarak fermente ederken, diğerleri ise aerobik veya fakültatif anaerobik olarak fermente etmektedirler. Bazı organizmalar da, glukozu fermente edebilecekleri enzim sistemlerinden yoksun olabilirler. Karbohidrat fermentasyonu sonucunda, organik asitler (laktik, formik veya asetik asit), bunun yanında hidrojen ve karbondioksit gibi gazlar meydana

getirirler (1). Karbohidrat fermentasyonu testleri ile, meydana gelen bu son ürünler kullanılarak, bir organizmanın herhangi bir karbohidratı fermente edip etmediği anlaşılır (20).

Triptofan, bazı bakterilerin enzimatik reaksiyonları için, oksidasyona uğraması gerekli bir amino asittir. Triptofanın metabolik ürünlere çevrimine triptofanaz adı verilen bir enzim aracılık etmektedir. Triptofanın sonuçta indol üretilecek şekilde hidrolize edilebilme kabiliyeti tüm organizmalar için karakteristik olan bir özellik değildir ancak biyokimyasal bir işaret olarak iş görmektedir. İndol testi yapılarak, organizmaların triptofanı oksidasyona uğratıp uğratmadıkları ortaya çıkarılmaktadır (20).

Voges-Proskauer testi yardımıyla, bazı organizmaların glukoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetilkarbinol gibi nötral son ürünleri veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetleri ortaya çıkarılır (20). Kullanılan ayıraçlar yardımıyla ortamdaki bu moleküller tayin edilerek, organizma bu özellik açısından test edilmiş olur.

Bazı mikroorganizmalar, fermente edebilecekleri glukoz veya laktoz mevcut olmadığında, enerji elde etmek için, karbon kaynağı olarak sitrat veya propionatı kullanmaktadır. Bu özellik, hücrede sitratın taşınımından sorumlu olan, sitrat permeaz enzimi aracılığı ile olmaktadır. Sitrat, Krebs döngüsünün en önemli ara maddesidir ve aktif asetilli oksaloasetik asitin kondenzasyonundan üretilmektedir. Sitrata etki eden enzim, sitraz enzimidir ve reaksiyon sonucunda oksaloasetik asit ve asetat meydana gelir. Bu ürünler daha sonra enzimatik olarak pirüvik asit ve karbondioksite çevrilir. Meydana gelen bu reaksiyon sırasında ortam alkaliye çevrilir ve oluşan karbondioksit alkali bir üründür. Değişen pH nedeniyle ortamdaki indikatörün rengi değişir (1). Mikroorganizmaların sitrat ve propionatı kullanıp kullanmadıkları, sitrat ve propionatı kullanım testleri ile ortaya çıkarılır (20).

Mikroorganizmaların hidrojen sülfürü (H_2S) üretilip üretilmediği, bakteri sistematğinde kullanılan kriterlerden biridir. Organizmalar, H_2S 'ü iki yolla üretmektedirler (18):

a) H_2S gazı, pepton ihtiva eden besiyerlerinin bir bileşeni olan sistein amino asitindeki, organik kükürtün indirgenmesi sonucunda meydana gelebilir. Olay sırasında, peptonlar enzimler tarafından amino asitlere dönüştürülürler. Bu amino asitler içerisinde, kükürt ihtiva eden, sistein de bulunmaktadır. Bu amino asit, eğer ortamda sistein desülfüraz enzimi

mevcutsa, kükürt atomunu kaybeder ve bu atom daha sonra, ortamdaki sudan bir hidrojen kazanarak, H₂S gazını oluşturur.

b) H₂S gazı, tiosülfat (S₂O₃²⁻), sülfat (SO₄²⁻) veya sülfid (SO₃²⁻) gibi inorganik kükürt bileşiklerinin indirgenmesi ile meydana gelebilir. Olayın meydana gelebilmesi için deneylerde sodyum tiosülfat içeren besiyerler kullanılmaktadır. Kükürt atomları, inorganik bileşiklerin oksidasyonu sırasında hidrojen tutucusu olarak iş görmektedir. Yapılan inkübasyonlar neticesinde besiyerinde meydana gelen kararmalar, H₂S üretimini göstermektedir (1). Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların nitratı indirgemesi moleküler oksijen olmadığında yani anaerobik şartlar altında meydana gelir. Bu organizmalarda anaerobik solunum, bir oksidatif süreçtir ve böylece hücre nitrat (NO₃⁻) veya sülfat (SO₄²⁻) gibi substratları oksijen sağlamak amacıyla kullanırlar. Buradan elde edilen oksijen enerji oluşumu esnasında hidrojen tutucu olarak iş görür ve olay nitrat redüktaz adı verilen bir enzim tarafından katalizlenir. Bakterilerin nitratı nitrit veya amonyaka indirgeyip indirgemediği, nitratı indirgeme testi ile ortaya çıkarılmaktadır (20).

Aerobik solunum esnasında mikroorganizmalar hidrojen peroksit veya bazı durumlarda da aşırı derecede toksik olan süper oksitleri meydana getirmektedirler. Eğer bu ürünler enzimatik olarak ortadan kaldırılmazlarsa organizmanın ölümüne neden olurlar. Bu maddeler aeroblar, fakültatif anaeroblar ve mikroaerofiller tarafından solunum yolunda meydana gelirler. Bu solunum yolunda oksijen son elektron tutucusudur ve olay karbohidratların enerji eldesi için kullanımları sırasında cereyan eder. Katalaz veya peroksidaz adı verilen enzimleri üretebilen organizmalar, bu enzimler yardımıyla hidrojen peroksiti ortadan kaldırırılar. Organizmaların katalaz enzimini üretilip üretmedikleri, katalaz testi ile ortaya çıkarılır (20).

Oksidaz enzimi, aerobik solunum sırasında elektron taşınımının düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Sitokrom oksidaz, moleküler oksijenle (O₂) indirgenmiş olan sitokromun oksidasyonunu katalizler. Bazı fakültatif ve mikroaerofilik organizmalar kadar aerobik bakteriler de oksidaz aktivitesi göstermektedirler. Bakterilerin oksidaz enzimi üretilip üretmedikleri, oksidaz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (1).

1.5.3. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Genetiksel Özellikler

Önceleri bakterilerin sınıflandırılmaları aralarındaki fenotipik benzerliklere bakılarak yapılırdı. Bu metodlar, halen daha çok başarıyla kullanılmasına rağmen, bu özellikler birbirine aşırı derecede benzeyen organizmaların ayrılmasında ve bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında çok başarılı olmayabilirler. Ortaya çıkan bu tip problemlerin çözümlenmesinde nükleik asitlerle yapılan çalışmaların kullanılması, ilk olarak 20 sene önce başlandı (21) ve bundan sonra da teşhis çalışmalarında çok önemli metodlar haline geldiler. Sınıflandırma çalışmalarında genomik ilişkilerin kullanılması birçok faydalar sağlar:

- a) Yapılan tür tayinlerinin daha kesin olması,
- b) Genomik akrabalıklara göre yapılan sınıflandırmanın sık sık veya radikal olarak meydana gelen değişikliklere konu olmaması,
- c) Daha güvenilir bir teşhis olayının genetik akrabalıklara dayalı olan organizma sınıflandırması ardından yapılması,
- d) Elde edilen bu verilere bakılarak organizmada meydana gelen değişiklikler ve akrabalar arasındaki ilişkilerin nasıl olduğu bu yolla daha iyi ortaya çıkarılabilir.

Nükleik asitler aşağıda açıklanan bazı özellikleri ile sınıflandırma çalışmalarında kullanılmaktadırlar.

1.5.3.1. DNA Baz Kompozisyonu

Deoksiribonükleik asitlerin (DNA) sınıflandırmada kullanılan özelliklerinden biri içerisindeki guanin (G) ve sitozin (C) oranıdır (%G+C). Bakteriler arasında %G+C içeriği 25-75 arasında değişmektedir ve bu değer tür içerisinde sabittir. Bununla birlikte, benzer %G+C oranına sahip olan iki organizmanın her zaman birbirleriyle çok yakın olması gibi bir durum söz konusu değildir. Sözü edilen bu durum, elde edilen %G+C oranı değeri bakterinin nükleik asitindeki nükleotidlerin düzenlenmesi ile ilişkili olmadığı gerçeğinden dolayı doğrudur. %G+C içeriği önceleri DNA'nın asitle hidroliz edilip, nükleotidlerin kağıt kromatografisi ile ayrılıp ve tek tek bazların hesaplanarak ayrılması yöntemine göre yapılırdı. Ancak bugün bu metodlar pek kullanılmamaktadırlar. Bugün kullanılmakta olan metodlar termal denatürasyon, buoyant yoğunluk ve HPLC kromatografisidir (21).

1.5.3.2. DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu

Çift zincirli DNA belli şartlar altında (yüksek sıcaklık, yüksek pH) denatüre olmaktadır. Oluşan bu tek zincirli moleküller ısı düşürüldüğünde yeniden birleşmekte (renatürasyon) ve böylece renatürasyon hızına bakılarak genom büyüklüğü ve özellikleri hakkında karara varılmaktadır (21).

1.5.3.3. DNA-RNA Hibridizasyonu

DNA'nın tek bir zinciri RNA sentezi için kalıp olarak kullanıldığından, RNA sadece bu zincirin tamamlayıcısıdır. RNA tek zincirli olduğundan, RNA molekülleri diğer bir RNA molekülü ile birleşemezler. Bununla birlikte RNA molekülleri denatüre edilmiş DNA molekülleri ile karıştırılırsa, RNA molekülü tamamlayıcısı olan DNA zinciri ile birleşecektir. Bu özelliklere bakılarak bakteri türleri hakkında yorum yapılabilmektedir. Ancak tür tayini için yapılan hibridizasyon işleminde kullanılan bu genler türe spesifik olan genlere ait olan DNA molekülleri olmalıdır (21).

1.5.3.4. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması

Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. Gray ve arkadaşları (22) 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkardılar ve bu araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rDNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla belli primerler kullanarak artırdılar (23). PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Stackebradt ve Goebel (24) hibridizasyon çalışmalarında aynı cinse ait olan türlerin arasında 16S rRNA dizisi açısından %97'den daha az benzerlik gösteren suşların farklı türler olduğunu ortaya koymuşlardır (20).

1.5.3.5. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması

Ekstrakromozomal elementler (plazmid) bakterilere ekstra özellikler veren genetik elementlerdir. Bu elementler, bir bakteriden diğerine herhangi bir yolla (transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon) aktarıldığından bunlara bağlı olarak bir sınıflandırmanın yapılması çok güvenilir olmaz. Ancak bu elementler üzerinde sınıflandırmada sıkça kullanılan bazı biyokimyasal ve fenotipik özellikleri kodlayan genler olduğundan tür tayini yapılırken bakterinin böyle genetik elementlere sahip olup olmadığının ortaya çıkarılması çok önemlidir (21).

1.5.4. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kemotaksonomik Özellikler

Bakteri tür tayininde birçok kemotaksonomik metod kullanılmaktadır. Bunların kullanılış amaçları şöyledir: Hücre duvarı kompozisyonunun belirlenmesi, lipid kompozisyonunun belirlenmesi, izoprenoid kinonların analizi, sitokrom kompozisyonunun belirlenmesi, çeşitli proteinlerin amino asit dizilerinin belirlenmesi, protein profilinin ortaya çıkarılması, enzim karakterizasyonu ve fermentasyon ürün profilinin belirlenmesi.

1.5.4.1. Lipid Kompozisyonu

Gram-negatif, Gram-pozitif ve cyanobakterileri içine alan birçok prokaryotların hücre duvarlarının karakteristik polimeri peptidoglukandır. Peptidoglukan tabakası mycoplazmalarda ve archaeobacterium'larda bulunmamaktadır. Bu tabaka, Gram-pozitif bakterilerde kalınken Gram-negatif bakterilerde ise daha incedir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının kompozisyonları, çalışmalarda kullanılan önemli metodlardan biridir. Bu analiz, hücre duvarının saflaştırılıp analiz edilmesine dayanır. Cummins ve Harris (25) hücre duvarının amino asit kompozisyonunun cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli bir rol oynadığını ve şeker kompozisyonunun ise türlerin ayırt edilmesinde önemli olduğunu ortaya koydular.

İzoprenoid kinonlar birçok bakterinin sitoplazmik membranında yerleşmiş olan terpenoid lipidlerin bir sınıfıdır. Bunlar, elektron taşınımında, oksidatif fosforilasyonda ve muhtemelen aktif transportta da

rol oynamaktadırlar. Bunların bakteri sınıflandırmasındaki rolleri Jeffries ve arkadaşları (26) ve Yamada ve arkadaşları (27) tarafından açıklanmıştır. Şimdiye kadar yapılan prokaryot çalışmalarında, bunlarda üç ana tip ortaya çıkarılmıştır: Ubikinonlar, menakinonlar ve dimetilmenakinonlardır. Cyanobakteriler, ne ubikinonları ne de menakinonları ihtiva eder. Bununla birlikte, bunlar flokinonları ve plastokinonları ihtiva etmektedirler. Ancak bu kinonlar genellikle bitkilerde bulunurlar ve bakterilerde görülmezler. Şimdiye kadar çalışılan bütün *Mycoplasma*'lar sadece menakinonlara sahiptirler. Archaeobacterium'lara ait olan böcek patojeni ve anaerobik bir tür olan *Methanobacterium thermoautotrophicum*'da isoprenoid kinonlar bulunmamaktadır. Ancak bu tip kinonlara tamamen anaerobik olan eubakterilerde rastlanmaktadır.

Bütün prokaryotlar arasında iki büyük lipid grubu bulunmaktadır. Archaeobakteriler eter bağlı lipidleri ihtiva ederken eubakteriler ise ester bağlı açıl lipidlere sahiptirler. Böylece eter bağlı lipidler yardımıyla Archaeobakteriler diğer bakterilerden ayrılmaktadır.

Lipidler, bütün eubakterilerin stoplazmik membranında bulunmaktadırlar. Gram-negatif bakteriler ve kesin olarak Gram-pozitif olan *Corynebacterium* ve *Mycobacterium* da hücre duvarında bulunmaktadırlar. Eubakteriler çok fazla sayıda değişik lipid içeriklerine sahiptirler ve lipid içeriklerinin sınıflandırmada kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (21).

Bakteri hücrelerinin yağ asidi kompozisyonları, belli bakterilerin sınıflandırılmasında fayda sağlamaktadır ve bazı durumlarda belli taksonları karakterize edebilirler. Bununla birlikte, organizmaların sahip oldukları yağ asidi kompozisyonları birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bunlar; büyüme ortamının kompozisyonu, inkübasyon sıcaklığı, kültürün yaşı ve örneğin analizinde kullanılan tekniklere göre değişmektedir (21).

1.5.4.2. Total Protein Profili

Tür tayininde genel kanaat, birbirleriyle ilişkili olan organizmaların benzer veya aynı tür hücresel proteinlere sahip olduklarıdır. İki yönlü elektroforetik ve izoelektrik nokta prosedürleri (28) hücre ekstraktından yüzlerce proteini ayırabilme yeteneğindedir. Yapılan fingerprintlerin karşılaştırılması ile bir türün suşları veya farklı türler arasındaki suşlar karşılaştırılırlar ve böylece aralarındaki benzerlikler ortaya çıkarılmış olur.

Böyle bir karşılaştırma Roberts ve arkadaşları (29) tarafından *Rhizobium* suşlarının karşılaştırması için yapılmıştır.

Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) hücresel proteinlerin ayrılmasında kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntemle örnekten otuza yakın bant elde edilebilir ve karşılaştırması yapılabilir. Cato ve arkadaşları (30), 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını baz alan bir araştırma yapmışlar ve araştırmanın sonucunda %80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların aynı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür. Aralarında %70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken farklı türlerin ise birbirinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür.

1.5.4.3. Sitokrom Özelliği

Sitokromlar, prokaryotik hücrede çeşitli redoks işlemlerinin meydana geldiği özelleşmiş hemoproteinlerdir. Bunlar, yapılarındaki hem prostetik gruplarına göre a, b, c ve d olmak üzere dört büyük gruba ayrılarak incelenirler. Sitokromların bakteri sınıflandırmasında ve karakterizasyonunda kullanımında, iki temel metod bulunmaktadır. Bunlar model ve yapıya göre uygulanan metodlardır. Farklı bakteri türlerinin sitokrom modellerinin karşılaştırması spektrofotometrik yöntemlerle olmaktadır. Primer yapıların karşılaştırmasında ise kolaylıkla saflaştırılabilen sitokrom c'nin amino asit dizisi ve x-ışınları difraksiyonu kullanılmaktadır (21).

1.5.4.4. İmmünolojik Özellikler

Özel tip proteinlerin amino asit dizilerinin veya bu proteinlerin amino asit dizisini yansıtan antijenik reaktiviteleri gibi özelliklerin karşılaştırılması, organizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Herhangi bir özel grubun (sitokrom c, süperoksit dismutaz, ferrodoksin veya diğer enzimler) proteinlerinin karşılaştırılması sonucunda, aralarındaki farkların çok veya az oluşuna göre bu organizmaların filogenetik olarak birbirlerine yakın veya uzak oldukları gözlenilir (21).

1.5.4.5. Enzim Karakterizasyonu

Sınıflandırmada fonksiyonel veya yapısal enzimlerin karakterizasyonunun kullanılması çok önemli faydalar sağlamaktadır. Bu karakterizasyonda kullanılan enzimlere örnek olarak bakteri sitrat sentataz veya suksinat thiokinaz enzimleri verilebilir. Bunların her ikisi de sitrik asit döngüsünün enzimleridir ve bu olaylar bütün canlılarda cereyan etmektedirler. Bu olay sırasında farklı organizmaların enzim özellikleri incelenerek böyle çalışmalar yapılmaktadır (21).

1.5.4.6. Fermentasyon Ürünlerinin Profili

Gaz-sıvı kromatografisi metodu, protein ve karbohidrat metabolizması sonucunda oluşan yağ asitlerinin analizi için kullanılmaktadır. Protein ve karbohidrat metabolizması sonucunda son ürün olarak oluşan yağ asitlerinin analiz edilmesi anaerobik cinsler olan *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Eubacterium*'ların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (31).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Besiyeri ve Kimyasallar

Nutrient Broth, Nutrient Agar, Gelatin (Difco), Bacteriolojik agar, Trypton Soya Broth, Brain Heart Infizyon Broth, Tryptic Soy Agar, Trypton Water, Pepton, glukoz, sodyum klorür, potasyum klorür, fenol red, etilen diamintetraasetik asit (EDTA), sodyum molipten, sulfonilic asit, diketil α -naftolamin, p-dimetil amino benzaldehit, kristal viyole, amonyum oksalat, safranin, malaşit yeşili ve tannic asid Merck'den, yeast extract, nişasta, gliserol, L-tirozin, üre, Tris bazı, sodyum dodesil sülfat (SDS), potasyum asetat, fenol:kloroform:İzoamilalkol, fenol, akrilamid, bis-akrilamid, agaroz, ksilen syanol FF, brom fenol blue, coomassie brilliant blue-G 250, coomassie brilliant blue-R 250, etidium bromür, bovin serum albumin (BSA), guanidium thiocyanata, sarkosyl, amonyum asetat, izoamil alkol, pararosaline asetat ve pararosaline hidroklorid Sigma'dan, diamonyum hidrojen fosfat, trisodyum sitrat, metanol ve aseton Carlo Erba'dan satın alınmıştır. Kullanılan tuz bileşikleri %99 ya da daha saftırlar.

2.2. Metod

2.2.1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan besiyeri ve ayıraçların hazırlanmasında, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2'den (21) ve diğer laboratuvar klavuzlarından (1, 18) faydalanıldı.

2.2.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

Anaerobik Agar: 20 g trypticase, 10 g glukoz, 5 g sodyum klorür, 15 g agar, 2 g sodyum thioglycolate, 1 g sodyum formaldehit sulfoksilat bir litre deiyonize suda (ddH₂O) çözüldü, pH'ı 7,2'ye ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Fenilalanin agar: 3 g yeast extract, 2 g DL-fenilalanin, 1 g disodyum hidrojen fosfat, 5 g sodyum klorür, 12 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7,3'e ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Gliserol Agar: 100 ml nutrient agar, 1g yeast extract, 2 ml gliserol karıştırılarak otoklavda steril edildi.

İndol Üretimi Besiyeri: İndol üretiminin test edilmesi için %1'lik Tryptone Broth veya %1'lik Trypticase Broth kullanıldı. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

Karbohidrat Fermentasyonu Besiyeri: Bu besiyerinin hazırlanması için ilk olarak temel besiyeri hazırlandı. 1 g diamonyum hidrojen fosfat, 0,2 g potasyum klorür, 0,2 g magnezyum sülfat, 0,2 g yeast extract, 15 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7,0'a ayarlanmadan önce %0,04 (w/v) oranında hazırlanan bromcresol purple solusyonundan 15 ml ilave edildi, otoklavlanarak steril edildi.

Fermentasyon özelliklerine bakılacak olan şekerler ise şöyle hazırlandı: Öncelikle herbir besiyerinin hazırlanacağı test tüpleri otoklavla steril edildi, %10 oranındaki karbohidrat solüsyonları ise filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulan steril temel besiyerine %0,5 oranında olacak şekilde karbohidrat solüsyonundan ilave edildi, besiyerleri slant (eğik) olarak kullanıldı.

Lizozimli Nutrient Broth: Mililitresinde 10.000 ünite lizozim ihtiva eden bir solüsyon hazırlandı ve 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra 1ml'lik steril lizozim solüsyonu 99 ml steril nutrient brothla karıştırılarak besiyeri hazırlanmış oldu.

Nişasta Agar: 1 g patates nişastası, 10 ml soğuk ddH₂O'da çözüldü ve 100 ml nutrient agarla karıştırıldı, otoklavlanarak steril edildi.

Nitrat Broth: 5 g pepton, 3 g beef extract, 1 g potasyum nitrat, 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH 7,0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

Nutrient Agar: 5 g pepton, 3 g beef extract, 15 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada, ayrıca ticari olarak satılan nutrient agar da kullanıldı.

Nutrient Broth: 3 g beef extract, 5 g pepton 1000 ml deiyonize suda (ddH₂O) çözüldü ve pH'ı 6,8'e ayarlanarak kullanıldı. Otoklavda 121°C 'de 20 dakika bekletilerek steril edildi. Ayrıca, çalışmada ticari olarak satılan nutrient broth da kullanıldı.

Nutrient Jelatin: Ticari olarak satılan nutrient jelatinden 120 g 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7,0'a ayarlandı ve böylece kullanıldı. Ayrıca, %0,4 oranında gelatin ihtiva eden nutrient agar besiyeri de aynı amaç için kullanıldı.

Sabouraud Dextroz Agar: 10 g pepton, 40 g dekstroz, 15 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 5,6'ya ayarlandı, otoklavda steril edilerek kullanıldı.

Sabouraud Dextroz Broth: 10 g pepton, 20 g dekstroz, 15 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 5,6'ya ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Sitrat ve Propionat Kullanım Besiyerleri: 1g trisodyum sitrat 2H₂O (veya 2g sodyum propionat), 1,2 g magnezyum sulfat.7H₂O, 0,5 g diamonyum hidrojen fosfat, 1 g potasyum klorür, 40 ml eser element solüsyonu, 15 g agar, 920 ml ddH₂O ve 20 ml %0,04'lük fenol red solüsyonu karıştırıldı, otoklavlanarak steril edilmeden önce pH'ı 6,8'e ayarlandı. Eser element solüsyonu şöyle hazırlandı: 50 mg etilendiamintetraasetat, 200 mg FeSO₄.7H₂O, 10 mg ZnSO₄, 3 mg MnCl₂.4H₂O, 30 mg H₃BO₃, 20 mg CoCl₂.6H₂O, 1 mg CuCl₂.2H₂O, 2 mg NiCl₂.6H₂O, 3 mg NaMoO₄.2H₂O, 1000 ml ddH₂O'da çözümlenerek hazırlandı.

Tirozin Agar: 0,5 g L-tirozin, 10 ml ddH₂O'da çözümlenip otoklavlanarak steril edildikten sonra aseptik şartlar altında 100 ml steril nutrient agarla karıştırılarak petrilere dökülüp kullanıldı.

Üre Hidrolizi Besiyeri: 0,1 g yeast extract, 9,1 g potasyum fosfat monobazik, 9,5 g potasyum fosfat dibazik, 0,2 g üre ve 0,001 g fenol red karışımına 117 ml ddH₂O ilave edildi. pH'ı 6,8'e ayarlandıktan sonra 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi.

Voges-Proskover Broth: 7 g pepton, 5 g glukoz, 5 g sodyum klorür, 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 6,5'e ayarlandı, otoklavlanarak steril edildi.

2.2.1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

Aseton Alkol: 250 ml %95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.

Demir Klorür Solüsyonu: Bu ayıraç fenilalanin deaminasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Ayıraç %10'luk demir klorür (FeCl₃) çözeltisinden ibarettir.

Jelatin Hidrolizi Ayıracı: Sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile doyurulmuş 1 N H₂SO₄, ayıraç olarak kullanıldı.

Flagella Boyası: Flagellaların boyanması için gerekli olan boya üç farklı solüsyondan oluşmaktadır. A) 0,9 g pararosaline asetat ve 0,3 g pararosaline hidroklorid, 100 ml %95'lik etil alkolde çözüldü. Solüsyonun tam karışması için bir gece oda sıcaklığında saklandı. B) 3 g tannik asit, 100 ml dH₂O'da çözümlenerek hazırlandı. C) 1,5 g sodyum klorür (NaCl) 100 ml dH₂O'da çözümlenerek hazırlandı. Sonuçta hazırlanan bütün bu solüsyonlar birbirine karıştırılarak flagella boyası hazırlanmış oldu. Karışım iki saat +4°C'de bekletildikten sonra kullanıldı.

İyot Çözeltisi: 1 g iyot, 2 g potasyum iyodür, 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 240 ml distile H₂O ile karıştırılarak hazırlandı.

İndol Ayırıcı: 5 g p-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml izoamilalkol ve 25 ml konsantirik hidroklorik asit (HCl) karıştırılarak yapıldı.

Lügol Ayırıcı: Lügol solüsyonu mikroorganizmanın nişastayı hidroliz edip etmediğinin belirlenmesi amacıyla kullanılır. 1g iyot, 2 g potasyum iyodür (KI), 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 240 ml distile H₂O ile karıştırılarak hazırlandı.

Katalaz Ayırıcı: Ayıraç olarak %10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi kullanıldı.

Kristal Viyole Boyası: Bu boya, iki ayrı solüsyon halinde hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı. A) 1 g kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml distile su ile karıştırıldı. B) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml dH₂O karıştırıldı. Bu her iki solüsyon hazırlandıktan sonra ikisi birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Nitrit Ayırıcı: Bu ayıraç ortamdaki nitratın nitrite indirgenip indirgenmediğinin ortaya çıkarılması için kullanıldı. Bu amaçla iki ayrı ayıraç kullanıldı. Ayıraçlardan birincisi 1N hidroklorik asit solüsyonudur. Kullanılan diğer ayıraç ise şu şekilde hazırlandı. A) 8 g Sulfonilik asit, 5 N asetik asit 1000 ml distile suda çözüldü. B) 6 ml dimetil α-naftolamin, 5 N asetik asit 1000 ml distile suda çözümlenerek hazırlandı.

Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml %95'lik etanol ve 500 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Spor Boyası: 5 g malaşit yeşili 100 ml dH₂O'da çözüldü, süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Voges-Proskauer Ayırıcı: %40'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin 3 mililitresine 0,5-1 mg keratin ilave edilerek hazırlandı.

2.2.2. Örneklerin Alınması ve Kaplıca Suyunun Kantitatif Analizinin Yapılması

Araştırmanın yapıldığı kaplıca alanındaki su ve çamurlu su örnekleri steril, ağzı kapaklı şişelere alındı. Alınan numuneler, 3-4 saat içinde laboratuvara getirildi. Sudaki bakteri sayısını tesbit etmek amacıyla 20 ml su, 0.2 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtrelerden geçirildi (18). Hazırlanan filtreler nutrient agar üzerine alındı. Filtrelerden biri normal aerobik şartlar altında 55°C'de bir gece inkübe edilirken, diğeri ise yine 55°C'de "anaerobik jar"da inkübe edildi. Bir gece sonra oluşan koloniler sayılarak, suyun mililitresindeki bakteri sayısı bulundu.

2.2.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması

Filtrasyon sonucunda nutrient agar üzerinde üreyen koloniler binoküler mikroskop altında incelenerek birbirinden farklı olabilecek olan koloniler tek koloniler, halinde alınarak yeniden çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve saf kültürler hazırlandı. Koloni morfolojisi ve rengine göre birbirlerinden farklı olan izolatlar tespit edildi. Birbirinden morfolojik olarak farklı olan bu izolatların çeşitli boyama ve ayırt edici diğeri özelliklerinin incelenmesine geçildi.

2.2.4. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.1. Basit Boyama

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kültürleri açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilmek suretiyle tespit edildiler. Tespit işleminden sonra lam üzerine kristal viyole boya solüsyonu ilave edildi, 3-4 dakika beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelendi.

2.2.4.2. Gram Boyama

Gram boyama şu şekilde yapıldı: Genç (24 saatlikten az) bakteri kültürlerinden bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı. Açık havada

kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edildi. 10 saniye kristal viyole ile muamele edildikten sonra lugolle yıkandı ve 10 saniye lugolle muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderildikten sonra 10 saniye safraninle muamele edildi, dH₂O ile yıkandıktan sonra açık havada kurutularak mikroskop altında incelemeye alındı ve mor renkli olarak boyanan bakterilerin Gram-pozitif, pembe renkli olarak boyanan bakterilerin ise Gram-negatif olduğuna karar verildi (18).

2.2.4.3. Spor Boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığı ve endosporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla genellikle yaşlı kültürler (48-72 saat) kullanıldı. Kültürler lam üzerine yayıldıktan ve açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Ardından kaynar su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edildi ve 5 dakika böylece boyanması beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı. Üzerine safranin boyası ilave edildi ve 30-60 saniye boyandıktan sonra dH₂O ile yıkandı, açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Boyama sonucunda yeşil olarak boyanan bölümler spor yapılarını göstermektedir (18).

2.2.4.4. Kapsül Boyama

İzolatların kapsül yapısına sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için öncelikle herbir izolattan 24-48 saatlik kültürler yapıldı. Yapılan bu kültürlerden bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine yayma preperat hazırlandı. Açık havada kuruması beklendikten sonra üzerine kristal viyole boyası ilave edildi ve 5-7 dakika beklendi. Daha sonra boya %20'lik CuSO₄ ile yıkandı. Açık havada kuruması beklendikten sonra mikroskop altında incelendi ve bakteri hücresi etrafındaki şeffaf olarak parlayan kısımların kapsül yapıları olduğu kabul edildi (1).

2.2.4.5. Flagella Boyama

Flagella pek çok bakteride bulunan ve hareketi sağlayan yapılardır. Bir bakterinin flagellaya sahip olup olmadığını ve sahipse bakteri etrafında dağılışının nasıl olduğunu belirlemek için, Leifson Flagella Boyama yöntemi (18) kullanıldı. Bu amaçla Brain Heart Broth besiyerinde 18-20 saat büyütülen bakteri kültürlerinin 4 mililitresine 0,250 ml formaldehit ilave

edildi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 1,5 ml dH₂O ilave edildi, karıştırıldı ve 3 dakika santrifüj edildi. 3000xrpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant kısım atıldı ve geride kalan pellet yeniden dH₂O'da çözüldü. Tekrar 3 dakika aynı şekilde santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı kısım yeniden atıldı ve altta kalan çökelek dH₂O'da çözüldü. Elde edilen bakteri süspansiyonu temiz bir lam üzerine yayıldı ve açık havada kurutuldu. Yayma preparat kuruduktan sonra, üzerine flagella boyası (solüsyon A+B+C) ilave edildi ve alkol uçuncaya kadar beklendikten sonra, boya dH₂O ile yıkandı. Açık havada kuruması beklendikten sonra, hemen mikroskop altında incelemeye alındı ve bakteri etrafında bulunan iplikçik şeklindeki yapıların flagellalar olduğu kabul edildi (18).

2.2.4.6. Hareket testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için "Lam lamel arası preparat" tekniği kullanıldı (18). Bu teknikle izolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için hazırlanan kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup üzerine lamel kapatıldı. Yapılan bu preparat, mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadıklarına karar verildi.

2.2.5. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi için bakteriler nutrient agar slantları üzerine ekildiler. 55°C ve daha yüksek sıcaklıklar için 3 gün, 30-50°C arasındaki sıcaklıklar için 5 gün, 20-25 °C arasındaki sıcaklıklar için 14 gün ve 20°C'nin altındaki sıcaklıklar için ise 21 gün etüvde inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (20).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient broth içinde yapılan gece kültürlerinden, OD₆₀₀=0,1 olacak şekilde yeniden nutrient broth'a ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 45, 50, 55, 60, ve 65°C'de belli bir süre sallayıcıda sallanarak büyütüldüler. Yapılan bu kültürlerden bir saat arayla örnekler alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀'de

absorbans değerleri ölçülerek, bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (1).

2.2.5.2. İzolatların Büyüyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

İzolatların büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için, izolatlar değişik pH değerlerine (5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 9,5 ve 10) sahip nutrient broth'a inoküle edildi ve optimum büyüme sıcaklıklarında üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığı spektrofotometrede (OD_{600} 'de) ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. Böylece izolatların maksimum ve minimum olarak büyüyebildiği pH değerleri ortaya çıkarıldı.

İzolatların hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğünün ortaya çıkarılması için izolatların büyüyebildiği pH değerine sahip olan nutrient broth besiyerlerine $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde gece kültürlerinden aşılama yapıldı ve saat başı spektrofotometrede ölçümler yapılarak, hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğü ortaya çıkarıldı (1).

Ayrıca bakterilerin 5,7 pH'lı Sabouraud Dekstroz Agar ve Broth'ta üreme özelliğine ve aynı zamanda pH'sı 6'dan düşük ve 7'den yüksek olan Voges-Proskover Broht besiyerindeki büyüme özellikleri incelendi (20).

2.2.5.3. İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla % 2; 2,5; 3; 5; 7 ve 10 oranında NaCl ihtiva eden nutrient broth besiyerleri hazırlandı. Bunun 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldı. 7 ve 14 gün $55^{\circ}C$ 'de etüvde inkübasyondan sonra, hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerde üreme olmuş ise, o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı (20).

2.2.5.4. İzolatların Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların lizozimde büyüüp büyümediğinin belirlenmesi amacıyla, 10 $\mu g/ml$ oranında (10.000 ünite) lizozim ihtiva eden nutrient broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyerine, herbir izolattan ekim yapıldı. Yedi ve ondört gün $55^{\circ}C$ 'de inkübasyondan sonra üremenin olup olmadığına bakıldı (20).

2.2.5.5. İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan Brain Heart Infuzyon Agar besiyeri deney tüplerine dağıtıldı, steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu, tüplere herbir izolattan ekim yapıldı ve çevirilerek karıştırıldıktan hemen sonra soğuk suya daldırılarak donması sağlandı. Uygun sıcaklıkta bir gece inkübe edildikten sonra, tüp içerisinde üredikleri bölgeye bakılarak, izolatların oksijen ihtiyaçları hakkında karar verildi (1).

Ayrıca izolatların aerobik olarak mı yoksa tamamen anaerobik solunum yaparak mı yaşadıklarının ortaya çıkarılması için deneylerde özel olarak hazırlanan anaerobik agar besiyeri kullanıldı (20).

2.2.5.6. Nişasta Hidrolizi Testi

Nişasta, glukoz monomerlerinin glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu yüksek moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür. Bu molekülün yıkımından sorumlu olan enzim, "amilaz"dır. İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin test edilmesi için hazırlanan nişasta agar petrilere, izolatlar, çizgi halinde ekildiler. Üç ve 7 günlük uygun sıcaklıktaki etüvlerde inkübasyondan sonra petrideki bakterilerin üzerine %95'lik etanol ilave edildi. Beyaz rengin oluşması durumunda testin pozitif olduğuna, bir renk değişikliği olamaması durumunda ise negatif olduğuna karar verildi (20). Ayrıca, bu test arıyaç olarak lügol kullanılarak da yapıldı. Petriler üzerine lugol ilave edildi ve koyu kahve rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (18).

2.2.5.7. Jelatin Hidrolizi Testi

İzolatlardan herbiri, nutrient jelatin besiyerine ekildikten sonra, 55°C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübe edilen tüpler, üçüncü günün sonunda inkübe edildikleri etüvden alındılar ve 20°C'ye ayarlanmış olan yeni bir etüve aktarıldılar. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı yada katı oluşuna göre testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi. 20°C'de besiyerinin sıvı olmaması, bakterinin jelatini parçaladığını göstermektedir (20).

2.2.5.8. Karbohidrat Fermentasyonu Testleri

Hazırlanan karbohidrat fermentasyon besiyerine herbir izolat ekildi. Yedi gün 55°C sıcaklığa ayarlanmış etüvde inkübe edildikten sonra, besiyerinde meydana gelen koyu pembe renkten sarı renge renk değişikliği organizmaların kullanılan şekeri fermente ettiğini, herhangi bir değişikliğin olmaması ise şekerin organizma tarafından karbohidrat kaynağı olarak kullanılmadığını göstermektedir. Ayrıca tüp içindeki besiyerinde meydana gelen kabarmalar ve çatlamlar organizmanın bu şekerden gaz oluşturduğunu göstermekteydi (20).

2.2.5.9. Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretim Testi

İzolatların H₂S üretilip üretilmediğinin ortaya çıkarılması için Triple-Sugar Iron agar besiyeri kullanıldı. Herbir izolat, bu besiyerine inoküle edildi ve 55°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpün alt tarafında bir kararmanın olup olmadığına bakılarak, organizmanın H₂S üretimi hakkında karara varıldı. Besiyerinin alt kısmında koyu rengin oluşumu, H₂S'in üretildiğini göstermektedir (1).

2.2.5.10. Voges-Proskauer Testi

Bu testin gerçekleştirilmesi amacıyla Voges-Proskauer broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldıktan sonra, 55°C'de 3 gün etüvde inkübe edildi. Üç günden sonra kültürlerin üzerine Voges-Proskauer ayırıcı ilave edildi. Tamamen karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sonuçta kültür yüzeyinde kırmızı rengin oluşumu testin pozitif olduğunu, rengin oluşmaması ise negatif olduğunu göstermektedir (20).

2.2.5.11. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi

Mikroorganizmalar ortamda fermente edebilecekleri glukoz veya laktozu bulamadıklarında gerekli olan enerjiyi sağlamak için ortamda bulunan sitrat veya propionatı kullanmaktadırlar. İzolatların bu molekülleri kullanıp kullanmadığının ortaya çıkarılması amacıyla sitrat ve propionatı kullanım besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerlere herbir izolat ekildi, 55°C'de inkübe edildi, 3 ve 7 gün sonra yapılan incelemeler

sonucunda besiyerinde üreme ve renk değişikliği olup olmadığına bakılarak, eğer mavi renge bir dönüş varsa organizmaların sitrat ve propionatı karbon kaynağı olarak kullandığına karar verildi (20).

2.2.5.12. Nitratı İndirgeme Testi

İzolatların nitratı indirgeyip indirgemediğinin ortaya çıkarılması için nitrat broth besiyeri hazırlandı ve bu besiyerinin 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldı. Üç ve 7 gün 55°C'de inkübasyondan sonra kültürler üzerine nitrit ayırıcı ilave edilerek veya 1N HCl emdirilmiş kurutma kağıdına herbir izolatın kültüründen 1 damla damlatılarak oluşan rengin incelenmesi neticesinde testin sonucu ortaya çıkarıldı. Her iki ayıraç ilave edildiğinde de kahverengi renk oluşunu görülürse testin pozitif olduğu aksi durumda ise negatif olduğuna karar verildi (20).

2.2.5.13. Katalaz Testi

İzolatların katalaz enzimini oluşturup oluşturmadığının ortaya çıkarılması için Triptik Soy Agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine inoküle edildikten sonra, 24-48 saat 55°C'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra, üzerine %10'luk H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verilir (20).

2.2.5.14. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, Çizgi Ekim Metoduna (18) göre yapıldı. Bu testin yapılabilmesi amacıyla Triptik Soy Agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine ekildi. Uygun sıcaklıkta 24-48 saat bekletildikten sonra üzerine oksidaz testi ayırıcı ilave edildi, oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.2.6. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.6.1. Plazmid DNA'larının İzolasyonu

İzolatların plazmid içerikleri, Voskuil ve Chambliss'in (32) geliştirdiği metoda göre ortaya çıkarıldı. Herbir bakteriden 5-10 ml olarak hazırlanan gece kültürleri (12-16 saat) 10.000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve çökelek 200 µl SET tamponunda (%25 sakkaroz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) vortekslenerek çözüldü. Kullanılan SET tamponunun 1ml'sine 5 mg lizozim ilave edildi. Daha sonra, karışım mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bunun üzerine 350 µl yeni hazırlanmış sodyum hidroksit-sodyum dodesil sülfat solüsyonundan (0,2 N NaOH, %1 SDS) ilave edildi. Süspansiyon şeffaf bir durum alıncaya kadar ters düz çevrildi ve bu şeffaf süspansiyona 350 µl soğuk 3 M K⁺ - 5 M asetat solüsyonundan ilave edildi. Süspansiyon, 13.000 rpm'de, 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve alınan bu sıvı kısma, 650 µl soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) karışımından ilave edildi. Bir dakika vortekslenerek karıştırıldı. Karışım daha sonra 5 dakika mikrosantrifujde santrifuj edildi. Üst faz alındı ve buna 620 µl soğuk kloroform:izoamilalkol karışımından ilave edildi. Otuz saniye vortekslenerek karıştırıldıktan, sonra karışım mikrosantrifujde 3 dakika santrifuj edildi. 550 µl'lik üst faz pipetörle alınıp yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, buna eşit miktarda soğuk (-20°C) izopropanol ilave edildi. Karışım ters düz çevrilerek tamamen karıştırıldıktan sonra, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü ve izopropanol açık havada uçurulduktan sonra çökelek kısmı %70'lik etanol ilave edilerek 2 dakika santrifüjlendi, kalan etanol açık havada uçurulduktan sonra 50 µl ddH₂O'da çözüldü.

Yapılan plazmid DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, plazmid DNA'larının izole edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması için, 0,5 µg/ml etidium bromür içeren %0,7'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10X yürütme boyası ve 4 µl ddH₂O veya TE tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan herbir kuyucuğa yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment büyüklüğü belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, plazmid DNA'larının var olup olmadıkları ve moleküler ağırlıkları tesbit edildi.

2.2.6.2. Genomik DNA'nın İzolasyonu

Elde edilen 5 izolat ve *B. flavothermus* (DSM 2641) suşu %0,4 oranında yeast extract ihtiva eden Tripton Soya Broth'ta bir gece 55°C'de inkübe edilerek üretildi.

Genomik DNA izolasyonu, Pitcher ve arkadaşlarının (33) geliştirdiği metoda göre yapıldı. Elde edilen sıvı kültürler, üremelerinin exponansiyel fazında 1.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Daha sonra, üstteki sıvı kısım döküldü ve pellet kısmı saklandı. Elde edilen bu pellet kısmı, 100 µl 50 mg/ml oranında lizozim içeren TE tamponunda (10 mM Tris-HCl; 1 mmol EDTA, pH 8) çözüldü. Hücreler, 0,5 ml 5 mol/lit guanidium thiocyanata, 100 mmol/lit EDTA ve %0,5 v/v sarkosyl (GES ayırıcı) ile parçalandı. Hücre süspansiyonu daha sonra iyice vortekslenerek karıştırıldı. Tüpler, hücrelerin tamamının patlaması için 5-10 dakika buz üzerine alındılar. Daha sonra üzerlerine 0,5 ml soğuk 7,5 mol/lit amonyum asetat ilave edildi, karıştırıldı ve 10 dakika daha buz üzerine bırakıldı. Daha sonra üzerine 0,5 ml kloroform:2-pentanol (24:1) ilave edildi, karıştırıldı. Fazlar tamamen karıştırıldı ve eldeki süspansiyon bir Pastör pipeti yardımıyla 1,5 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarıldı. 16.000 xg'de 20 dakika santrifuj edildi. Üst faz başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0,54 ml soğuk 2-propanol ilave edildi. Tüpler, 1 dakika ters-düz çevrilerek solüsyonlar karıştırıldıktan sonra 6.500 xg'de 20 saniye santrifuj edilerek çöktürüldü. Pellet 500 ml %70'lik etanolle yıkandı ve açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 50-100 µl steril ddH₂O'da çözülerek -20°C'de saklandı.

2.2.6.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemiyle 16S rRNA Analizi

Elde edilen izolatların ve kontrol olarak kullanılan *B. flavothermus*, *B. stherothermophilus* ile *E. coli* B suşunun genomik DNA'larının izolasyonları 2.2.6.2'de açıklandığı gibi yapıldı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak, 260 nm dalga boyunda ölçüldü.

16S rRNA'yı kodlayan DNA, saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA) sırasına sahip forward primeri ile UNI16S- R (5'ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGT GTA) sırasına sahip revers primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan forward primeri, *E. coli* 16S rRNA geninin 11-26'ıncı

pozisyonlarına göre düzenlenmişken, revers primeri ise yine bu genin 1411-1393'üncü pozisyonlarına göre düzenlenmiştir (34).

PCR reaksiyonlarının şartları, Beffa ve arkadaşlarına (35) göre oluşturuldu: 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10XPCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 (oda sıcaklığında); 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 ünite *Taq* DNA polimeraz, 0,25 mM forward primeri, 0,25 mM revers primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 500 µl'lik tüplerde, Techne Progene Fuse 230U TZA termal cycler'da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri şu şekilde ayarlandı: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten, sonra 36 döngü 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) bekletilerek gerçekleştirildi.

Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1,3'lük agaroz jelde yürütüldü ve etidium bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra Polaroid DS34 Hoefer's photoman fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

2.2.6.4. 16S rDNA'nın Restriksiyon Fragmenti Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

2.2.6.3.'de açıklandığı gibi elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizi için 6 µg PCR ürünü 2 µl 10X restriksiyon enzim tamponu ve 10 ünite *Hinf*I restriksiyon enzimi karıştırıldı ve 20 µl'lik son hacim içerisinde, 37°C'de 2 saat kesildi.

Kesilen örnekler ve şahit DNA'lar, %2,5'lik agaroz jelde 10V/cm'lik elektrik alanında 70 dakika yürütüldü, etidium bromür ile boyandı ve görüntülendi.

2.2.7. İzolatların Total Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması

2.2.7.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

İzolatların ihtiva ettikleri proteinlerin profilini çıkarmak için, elde edilen her bir izolattan ve tür tayinleri yapılmış olan diğer iki şahit bakteriden 10 mililitrelik gece kültürleri yapıldı. Hücreler, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ve %10 sakkaroz'dan oluşan TS tamponunda çözüldü. Sıvı azot (-194°C) kazanında 1

dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edildi. Hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 30 dakika, 16.000 xg'de santrifüj edildi. Protein özütünü ihtiva eden sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

2.2.7.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonu, Bradford metodu (36) ile tayin edildi. Protein konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda alınan değerlere göre hesaplandı. Önce, spektrofotometre, Coomassie Brilliant Blue-G250 (CBB-250) ve 0,15 M'lık NaCl'den oluşan çözelti (kör) ile sıfırlandı. Numuneler ölçüm için hazırlandıktan sonra, iyice karıştırıldı ve 2 ile 60 dakika arasında değerleri okundu. Standart konsantrasyon eğrisi, farklı miktarda BSA içeren numunelerin ölçülmesiyle elde edildi. Konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinenlerin verdiği absorbans değerinin, standart eğrisi üzerine çakıştırılması ile bulundu. Bulunan bu değerlerden faydalanılarak numunelerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.2.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Miktarları tayin edilmiş olan *B. flavothermus* (DSM2641), 5 izolat (1, 2, 3, 4, 5) ile şahit protein özütlerinden uygun miktarlarda (50 µg) alındı. Bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl pH 6,8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6 β-merkaptoetanol) ilave edildikten sonra, numuneler 65°C'de 90 saniye bekletildi ve Laemmli (37) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 0.75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel coomassie brilliant blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı. Yıkama-I (%50 Metanol, %10 Asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı. Jeller iki selofan yaprak arasına alındı ve 80°C'de 2 saat vakumlu jel kurutucuda kurutulularak, daimi olarak saklanabilecek hale getirildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Ayder Yaylası Kaplıcası'ndan termofilik bakteri izole edilerek bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı. Ayrıca kaplıca suyunun mililitresindeki bakteri sayısı, membran filtresi yöntemiyle belirlendi.

Kaplıcadan alınan su ve çamurlu su örneklerinden bakteri izolasyonu zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilmek suretiyle gerçekleştirildi. Çalışmada, izolatların tür tayinlerinin yapılması için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler uygulandı.

3.1. Kaplıca Suyunun Kantitatif Analizi

Kaplıca suyundaki toplam bakteri konsantrasyonu tayini üç tekrarlı olarak yapıldı. Bu amaçla, 20 ml suyun filtre edilmesi sonucunda hazırlanan filtrelerde nutrient agar üzerinde oluşturdukları koloni sayısı 258 olarak belirlendi. Buna göre, suyun mililitresindeki termofilik bakteri sayısının 13 bakteri/ml olduğu bulundu.

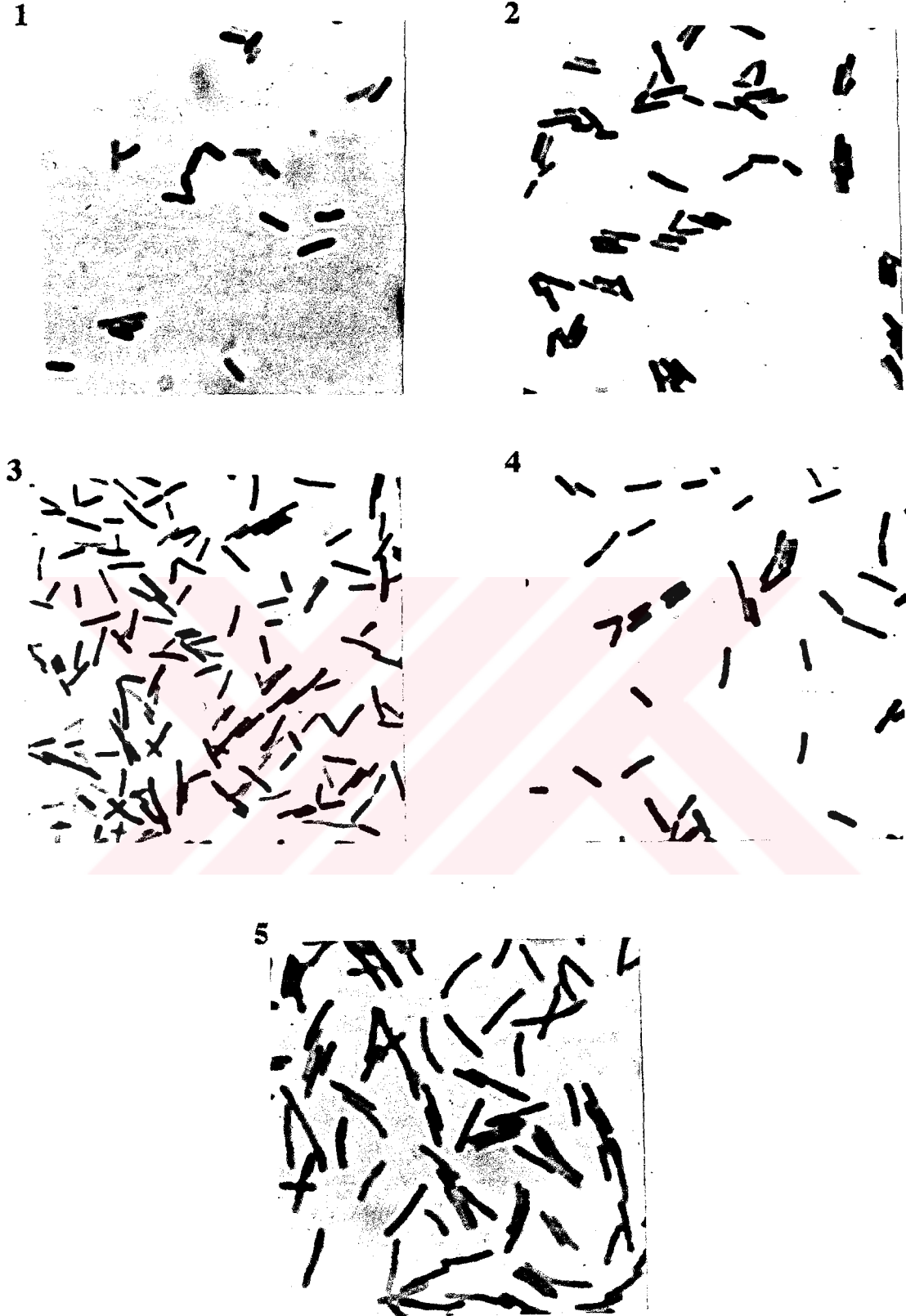
3.2. İzolatların Morfolojik Özellikleri

İzolatların çeşitli boyama ve morfolojik özellikleri Tablo 4'de gösterilmiştir. İlk olarak yapılan basit boyamalar neticesinde bütün izolatların basil morfolojisine sahip, tek veya uzun zincirler oluşturan basiller oldukları görüldü. Şekil 1'de de görüldüğü gibi izolatların hepsinin Gram boyamaları sonucunda, hayatlarının erken safhalarında (3-4 saat) Gram-pozitif, daha sonra ise Gram-negatif olarak boyandıkları tesbit edildi. İzolatların endospor yapılarını meydana getirip getirmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla yapılan spor boyamalar neticesinde, Şekil 2'de de görüldüğü gibi bütün izolatların endosporlara sahip oldukları gözlemlendi. Ancak yapılan incelemeler sonucunda 1, 2, 4 ve 5 numaralı izolatların çok çabuk (6-7 saat) spor oluşturduğu, 3 numaralı izolatın ise ancak iki gün inkübasyondan sonra endospor yapılarını meydana getirdiği görüldü. Aynı boyama neticesinde izolatların hepsinin terminal sporlara sahip olduğu, 1 ve 3 nolu izolatların ise buna ilave olarak santral (merkezi) sporlara da sahip olduğu gözlemlendi. Yapılan kapsül boyama neticesinde Şekil 3'de de görüldüğü gibi izolatlardan 1 ve 2 numaralı olanlarının kapsül yapısına sahip oldukları,

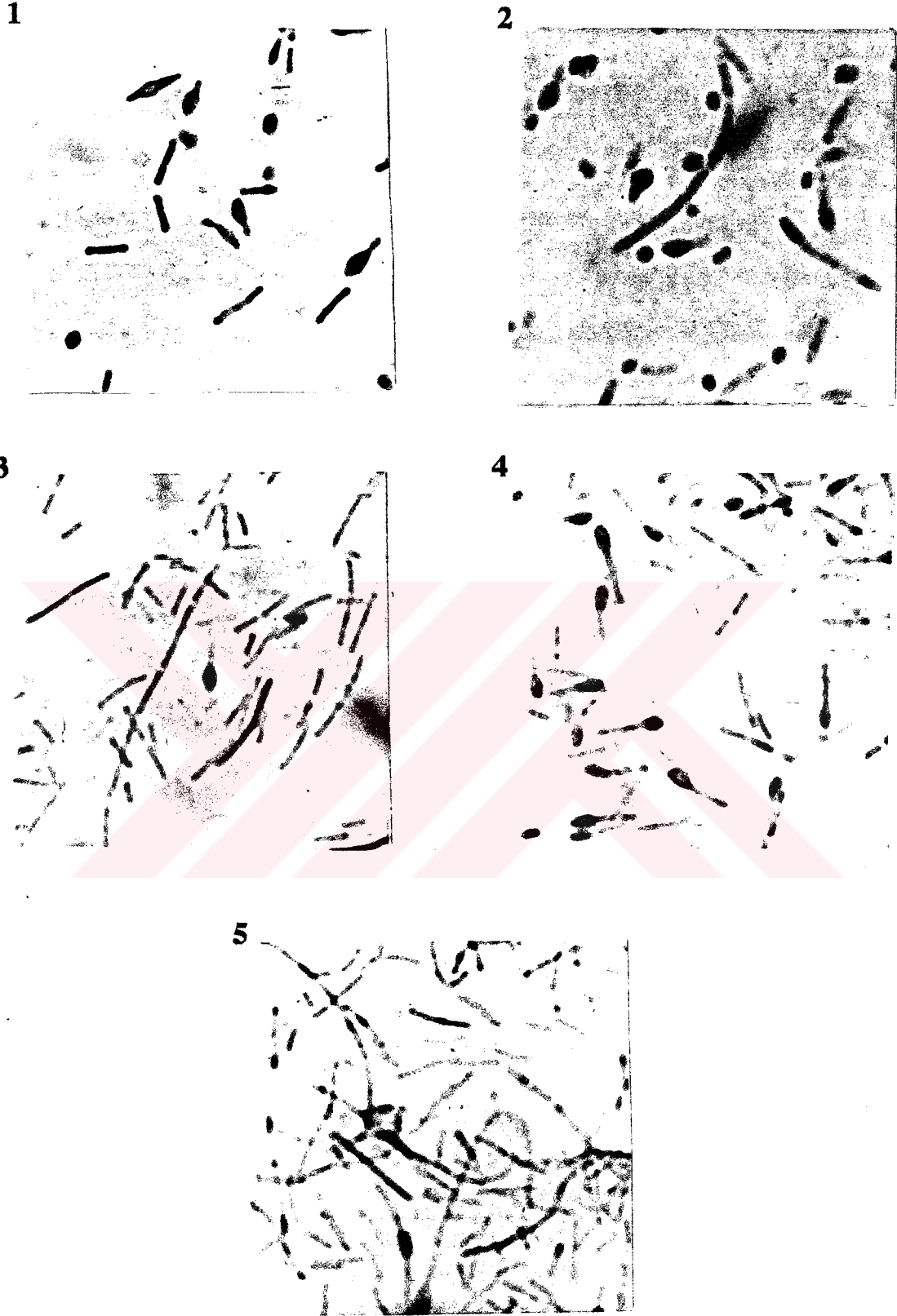
Tablo 4: Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatların Morfolojik ve Büyüme Özellikleri

İzolat No	<i>Bacillus flavothermus</i>	1	2	3	4	5
Petridaki koloni rengi ve görünüşü	Sarı, düzgün, yuvarlak	Sarı, konsantrik	Açık Sarı, konsantrik	Krem, düzgün, yuvarlak	Krem, düzgün, yuvarlak	Krem, düzgün, yuvarlak
İzolatların O ₂ ihtiyacı	Fakültatif anaerobik	Aerobik	Aerobik	Aerobik	Aerobik	Aerobik
İzolatların N.B'de görünüşü	Bulanık	Bulanık	Bulanık	Bulanık	Bulanık	Bulanık
Gram Boyama	+	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken
Kapsül Boyama	ND.	+	+	-	-	-
Spor boyama	+	+	+	+	+	+
Flagella Boyama	ND.	Peritrokus	Peritrokus	Peritrokus	ND	Polar
Spor şekli	ND.	Elipsoid	Elipsoid	Elipsoid	Elipsoid	Elipsoid
Spor formu	Terminal	Sent-Terminal	Terminal	Terminal	Sent-Terminal	Terminal
Boy(µm)	2-7	1.8-8	2.1-8	2-20	1.8-5	3-13
En(µm)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5-0.8	0.5-0.9
Hareket	+	+	+	+	+	+

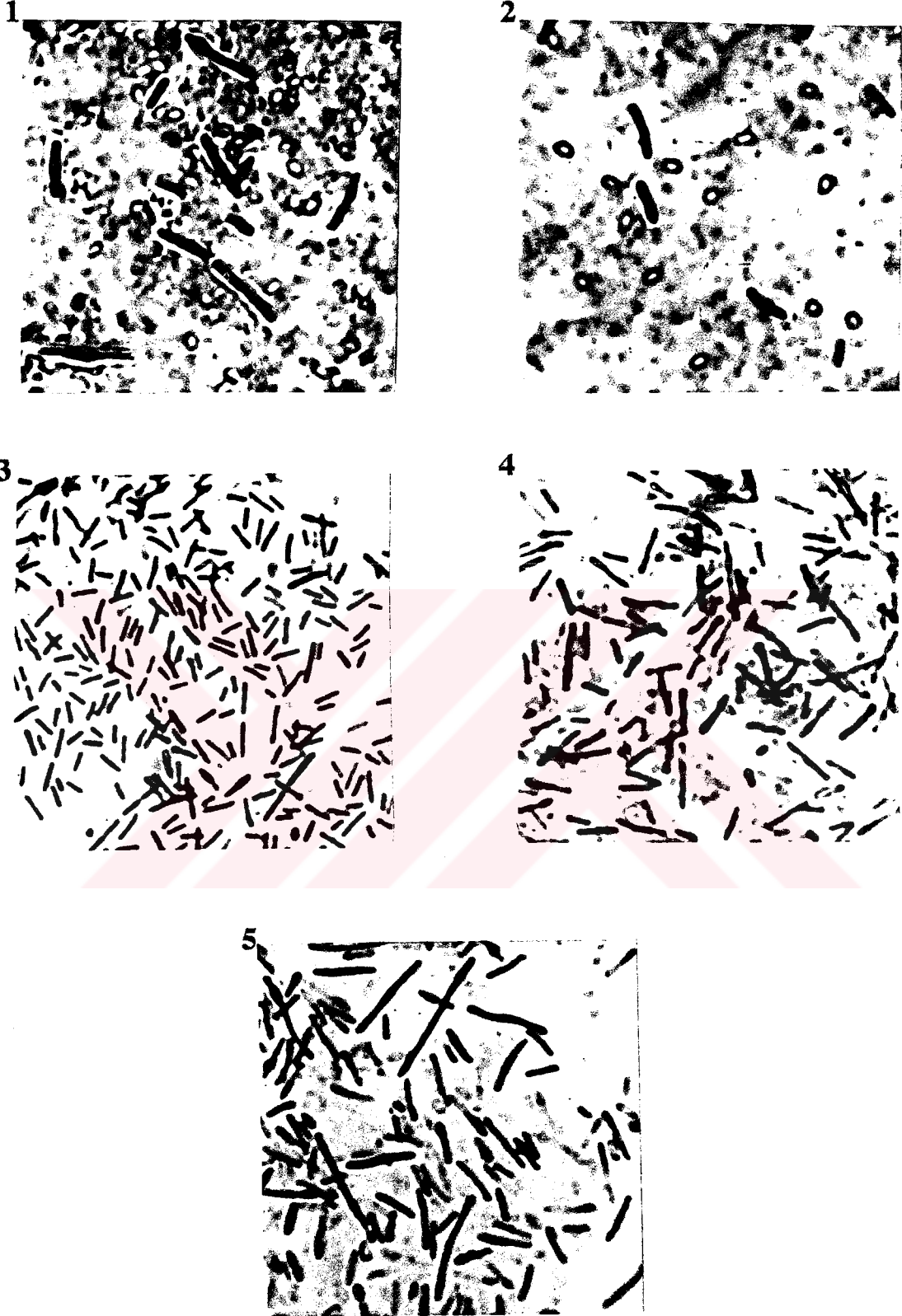
ND: Kullanılabilecek bilgi yok
Rakamlar izolat numaralarını göstermektedir.



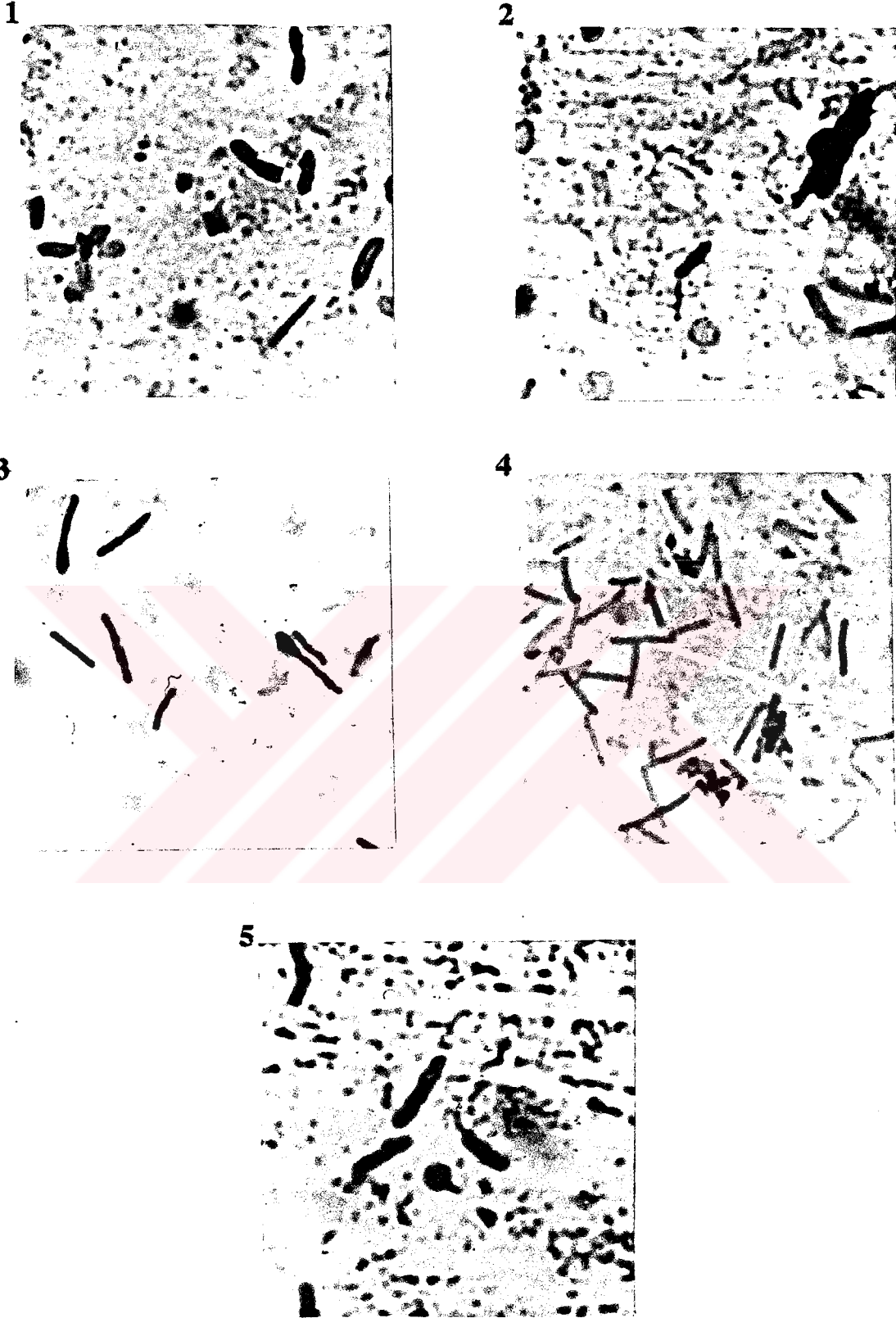
Şekil 1. Ayder Kaplıcasından elde edilen 5 İzolatın Gram Boyamaları. Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir. Büyütme: 3 Numaralı İzolat 10x100, Diğerleri 10x125.



Şekil 2. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Spor Boyamaları.
Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir. Büyütme:10x125.



Şekil 3. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Kapsül Boyamaları. Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir. Büyütme: Bir, 2 ve 4 Numaralı İzolatlar 10x125, Diğerleri 10x100.



Şekil 4. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolatın Flagella Boyamaları. Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir. Büyütme: 10x125

3, 4 ve 5 numaralı izolatların ise böyle bir yapıya sahip olmadıkları görüldü. Bütün izolatların hareket testi sonucunda hareket edebilme özelliğine sahip olduğu görüldüğünden, bunların flagellaya sahip olup olmadıkları ve eğer sahip iseler hangi tip flagellaya sahip oldukları araştırıldı. Şekil 4 'de görüldüğü gibi flagella boyaması sonucunda sadece 4 nolu izolatın flagellaya sahip olmadığı, 1, 2 ve 3 numaralı izolatların peritrokus tipli flagellaya sahip olduğu, 5 numaralı izolatın ise polar tipli flagellaya sahip olduğu görüldü.

3.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 5'de görülmektedir. Mikroorganizmaların büyümesi üzerine etkili faktörlerden olan sıcaklık, pH, NaCl'ye karşı tolerans ve atmosferik oksijen ihtiyaçları gibi fiziksel etkilerin araştırılması amacıyla testler yapıldı. Yapılan testler sonucunda 1 numaralı izolatın optimum olarak 60°C'de üreyebildiği ve minimum-maksimum üreme sıcaklıklarının ise 30-71°C olduğu gözlenirken 2 numaralı izolatın ise optimum üreme sıcaklığının 50°C ve minimum-maksimum üreme sıcaklıklarının ise 30-72°C olduğu görüldü. Üç ve 5 numaralı izolatların optimum üreme sıcaklık aralıkları 50-55°C ve minimum-maksimum üreme sıcaklıkları ise 30-71°C'dir. Dört numaralı izolat ise, optimum olarak 50°C'de ürerken minimum ve maksimum olarak 30-71°C'de üreyebilmektedir.

Tablo 5'de de görüldüğü gibi, 3, 4 ve 5 numaralı izolatlar optimum olarak pH 5-8 arası olan besiyerlerde üreyebilirken, 1 numaralı izolat pH 6-8 arası pH'lı besiyerinde ve 2 numaralı izolat ise 5,5-8 arası pH'lı besiyerinde optimum olarak üreyebilmektedir.

İzolatların belli oranlarda NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilme özelliklerinin, yani NaCl'ye karşı tolerans sınırının araştırılması sonucunda 1 ve 2 nolu izolatların %2'ye kadar NaCl'e tolerans gösterdiği, 3, 4 ve 5 numaralı izolatların ise %2,5'e kadar NaCl içeren besiyerlerinde üreyebildikleri gözlemlendi.

İzolatların 10 mg/ml lizozim ihtiva eden besiyerindeki üreme özelliği incelendi ve sonuçta 1 ve 2 numaralı izolatların bu besiyerinde üreyemediği, 3, 4 ve 5 numaralı izolatların ise üreyebildiği gözlemlendi.

İzolatların atmosferik oksijene olan ihtiyaçları incelendiğinde, hepsinin sadece aerobik ortamda üreyebildiği, anaerobik şartlarda ise üreyemedikleri gözlemlendi.

Tablo 5: Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolat No	<i>B.flavothermus</i>	1	2	3	4	5
Nitrat ind.	+(AB)	+	+	+	-	+
Katalaz test.	+	+	+	+	+	+
Oksidaz test.	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-
V.P. Testi	+	-	-	-	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-
%1NaCl büy.	+	+	+	+	+	+
%2NaCl büy.	+	+	+	+	+	+
%2,5NaCl büy.	+	-	-	+	+	+
%3NaCl büy.	-	-	-	-	-	-
Lizozimde büy.	ND	-	-	+	+	+
28°C büy.	-	W	W	W	W	W
37°C büy.	+	+	+	+	+	+
71°C büy.	+	+	+	+	+	+
72°C büy.	-	-	+	-	-	-
Nişasta hid.	+	+	+	+	+	+
Jelatin hid.	-	-	-	+	+	+
Üre hidrolizi	-	-	-	-	-	-
Sitrat kul.	ND	-	-	-	-	-
Propionat kul.	ND	-	-	-	-	-
5,7 pH'da büy.	ND	-	-	-	-	-
pH>7 MVRP broth'ta büy.	ND	+	+	+	+	+
pH<6 MVRP broth'ta büy.	ND	W	W	W	W	W
Glukoz fer.	+	+	+	+	+	+
Arabinoz fer.	W	-	-	-	+	-
Ksiloz fer.	ND	-	-	+	+	+
Mannitol fer.	+	+	+	+	+	+
Maltoz fer.	+	+	+	+	+	+
Sorbitol fer.	+	-	-	-	-	-
Ramnoz fer.	+	-	-	-	-	-
Sakkaroz fer.	+	+	+	+	+	+
Optimum pH	6-9	6-8	5.5-8	5-8	5-8	5-8
Optimumı(°C)	60,AB 65	60	50	50-55	50	50-55
Anaerobik büy	+	-	-	-	-	-
Glukozdan gaz oluşturma	-	-	-	-	-	-

W: Zayıf büyüme; ND: Belirlenmedi; AB: Anaerobik Büyüme
Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir.

Bakteri tür tayininde kullanılan kriterlerden birisi de bazı organik maddeleri hidroliz etme özellikleridir. Tablo 5'de de görüldüğü gibi yapılan testler sonucunda 1 ve 2 numaralı izolatların her ikisinin de nişastayı hidroliz ettiği, ancak jelatini ve üreyi hidroliz etmediği gözlemlendi. Üç, 4 ve 5 numaralı izolatların ise, nişastayı ve jelatini hidroliz ettikleri, üreyi ise hidroliz etmedikleri gözlemlendi.

İzolatların bazı enzim ve kimyasal maddeleri üretilip üretilmediği incelendi. Burada da görüldüğü gibi, 1 ve 2 numaralı izolatların her ikisinin de katalaz ve oksidaz enzimini ürettikleri, ancak H₂S gazını üretilmediği gözlemlendi. Aynı şekilde 3, 4 ve 5 numaralı izolatların her üçünde katalaz ve oksidaz enzimlerini ürettikleri ve H₂S gazını ise üretilmediği ortaya çıkarıldı.

Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal özelliklerinden bir diğeri, glukoz metabolizması neticesinde asetil metilkarbinol gibi asidik olmayan veya nötral son ürünleri üretebilme kabiliyetleridir. Yapılan incelemeler sonucunda bütün izolatların bu özellik açısından negatif oldukları gözlemlendi.

Organizmaların sitrat ve propionatı kullanımları ve nitratı indirgeme özellikleri sınıflandırmada kullanılan diğer özelliklerden birkaçıdır. Tablo 5'de de görüldüğü gibi yapılan incelemeler sonucunda, izolatların hiçbirisinin sitrat veya propionatı kullanmadıkları, 1, 2, 3 ve 5 numaralı izolatların nitratı indirgeyebildiği ancak 4 numaralı izolatın ise nitratı indirgeme özelliğine sahip olmadığı gözlemlendi.

Bakterilerin karbohidratları fermente etme özellikleri test edildi. Yapılan deneyler sonucunda 1 ve 2 numaralı izolatların her ikisinin de glukozu, mannitolu, maltozu ve sakkarozu fermente ettikleri, arabinoz, ksiloz, sorbitol ve ramnozu fermente etmedikleri tesbit edildi. Üç ve 5 numaralı izolatlar glukozu, ksilozu, mannitolü, maltozu ve sakkarozu fermente ederken, arabinoz, sorbitol ve rhamnozu fermente etmemektedirler. Dört numaralı izolat ise glukoz, arabinoz, ksiloz, mannitol, maltoz ve sakkarozu fermente ederken, sadece sorbitol ve rhamnozu fermente edememektedir.

3.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri

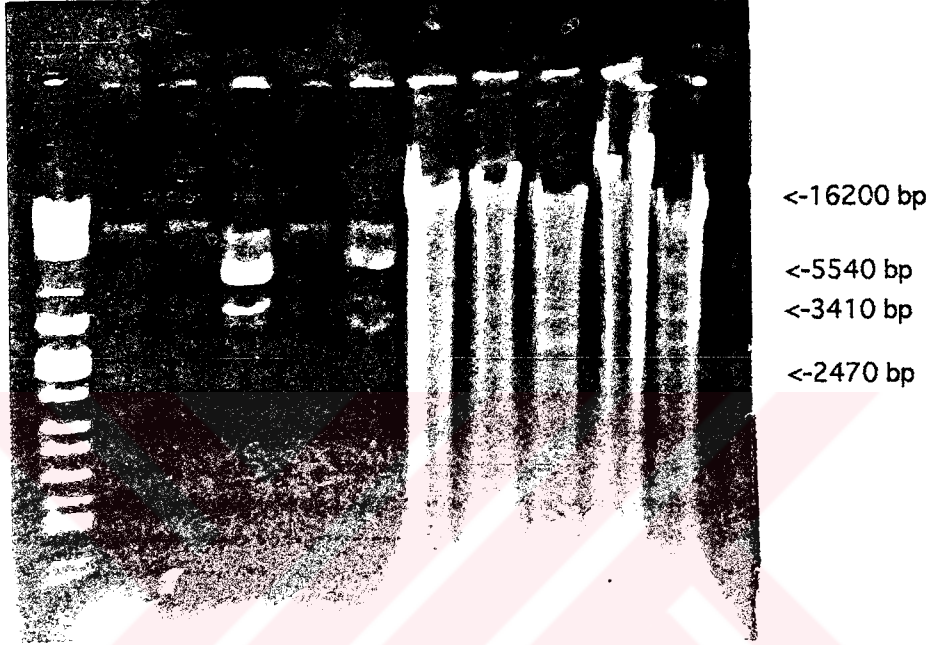
Elde edilen izolatlar, plazmid içerikleri, elde edilen plazmidlerin restriksiyon analizleri ve 16S rRNA genlerinin restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) açısından incelendiler.

Şekil 5'de görüldüğü gibi plazmid DNA'sı izolasyonu sonucunda 1, 2 ve 3 numaralı izolatların 16 kb ağırlığında birer adet lineer plazmide benzeyen genomik DNA parçalarını ihtiva ettiği gözlenirken, 3 ve 5 numaralı izolatların ise halka halinde 5,6 kb ağırlığında birer plazmide sahip oldukları görülmektedir. Bir, 2 ve 3 nolu izolatlardan plazmid izolasyonu yöntemi ile izole edilen lineer DNA parçalarının plazmid olmayıp genom DNA parçaları olduğu Şekil 6'da görüldüğü gibi *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde homojen olmayan DNA parçaları oluşturmaları ile ortaya çıkarıldı. Ayrıca izole edilen plazmidler ve plazmid DNA'sı izolasyonu ile elde edilen genomik DNA parçaları *PstI*, *KpnI*, *NdeI*, *SacI*, *BamHI*, *AlwNI* gibi restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı muamele edilerek restriksiyon haritaları çıkarılmaya çalışıldı. Şekil 7'de de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucunda 1, 2 ve 4 numaralı izolatlardan elde edilen linear genom DNA'sı parçaları, bu enzimlerden hiçbirisi ile kesilmezlerken, 3 ve 5 numaralı izolatlardan elde edilen halka halindeki plazmidler ise Şekil 7'de görüldüğü gibi *PstI* enzimi ile kesilmektedir ve her iki plazmidin de *PstI* ile tek bir noktadan kesilmesi sonucunda 5600 bp civarında bir bant oluşturduğu tespit edildi. Aynı şekilde Şekil 8'de görüldüğü gibi her iki plazmidin *Sau3A* endonükleaz enzimi ile kesilmesi sonucunda ise yaklaşık olarak 1600, 1300, 750, 550 ve 400 bp uzunluğunda bantların oluştuğu gözlemlendi.

İzolatların 16S rRNA genlerinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen 16S rRNA genleri Şekil 9'da görülmektedir. Yapılan PCR analizi sonucunda *E. coli*'nin evrensel primerleri ile arttırılan 16S rRNA geninin *E. coli* için 1400 bp olduğu, elde edilen 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı izolatlar ile *B. flavothermus* ve *B. sterothermophilus*'ta da bu uzunluğun 1400 bp civarında olduğu tespit edildi. Elde edilen 16S rRNA genlerinin *HinfI* endonükleaz enzimi ile yapılan restriksiyon analizleri sonucunda Şekil 10 A ve B'de görüldüğü gibi 1, 2, 3 ve 5 numaralı izolatlar, oluşan 1000 bp, 280 bp, 70 bp, 50 bp'lik fragmentler açısından birbirlerine benzemektedirler. Beş numaralı izolat diğer üç izolattan sadece 30 bp'lik bir fragmente sahip olmaması yönüyle ayrılmaktadır. Dört numaralı izolat ise diğer dört izolattan farklı bir restriksiyon polimorfizm göstermekte olup 1000 bp, 280 bp, 230 bp, 70 bp, 50 bp ve 30 bp'lik fragmentlere sahip olduğu

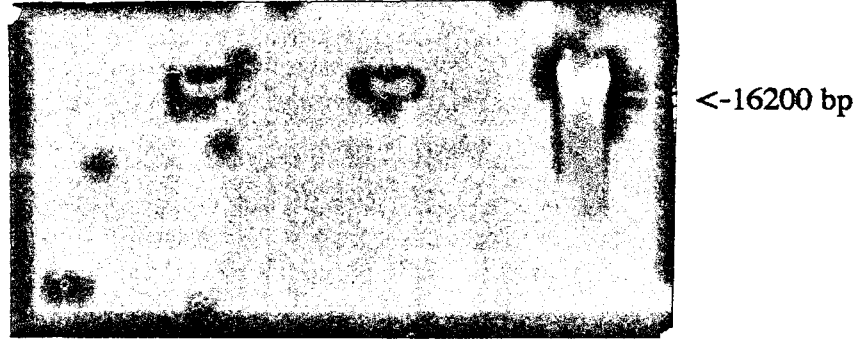
görülmektedir. Aynı zamanda, izolatların bazı özellikleri bakımından benzer oldukları *B. flavothermus*'un 1000 bp, 330 bp, 230 bp, 70 bp ve 50 bp'lik fragmentleri meydana getirmesi yönüyle izolatlardan bariz bir şekilde farklı olduğu görüldü. Aynı zamanda, yine izolatların bir *Bacillus* cinsi üyesi olan *B. stearothermophilus*'tan farklı bir polimorfizm gösterdikleri görüldü.

K 1P 2P 3P 4P 5P 1G 2G 3G 4G 5G

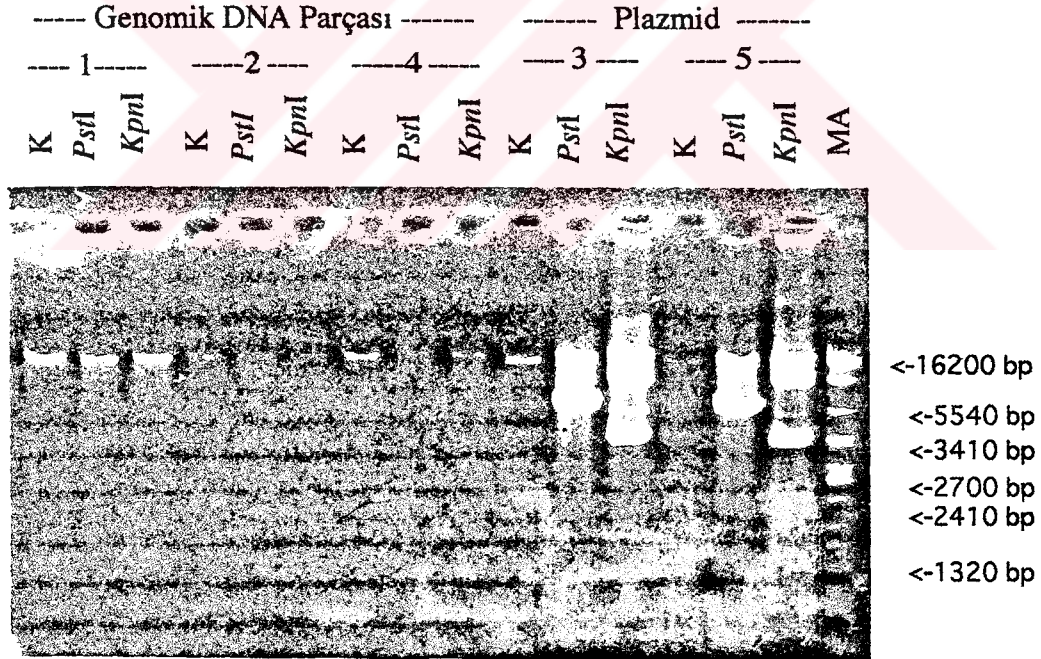


Şekil 5. Ayder Kaplıcasından İzole Edilen İzolatlardan Safılaştırılan Genomik ve Plazmid DNA'larının %0,7'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. K: Kontrol Olarak Kullanılan *Eco RI-BamHI-HindIII* ile Kesilmiş λ DNA'sını göstermektedir. Rakamlar İzolatları; P: İzolatlardan Elde Edilen Plazmid DNA'larını, G: İzolatlardan Elde Edilen Genomik DNA'ları Göstermektedir.

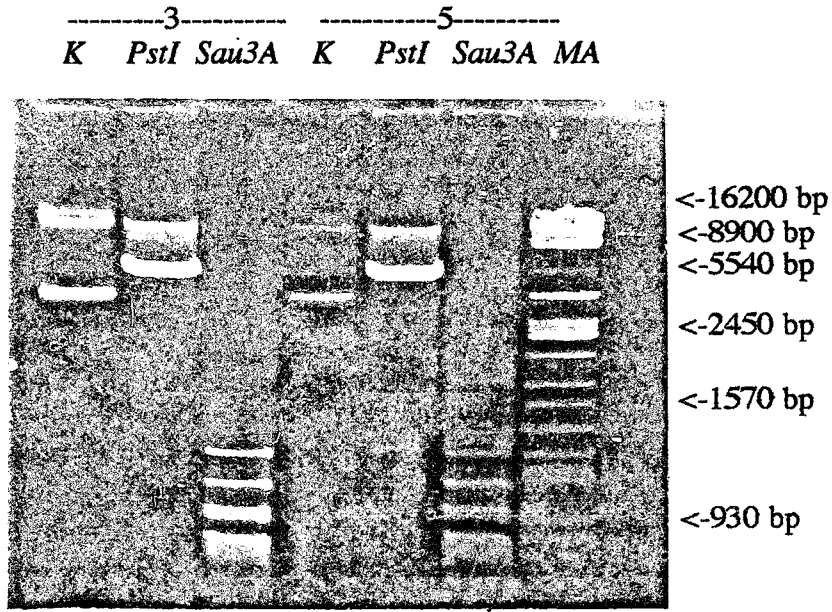
1A 1B 1C 2A 2B 2C 4A 4B 4C K



Şekil 6. Ayder Kaplıcasından Saflaştırılan İzolatlardan Plazmid İzolasyonu Yöntemi ile Elde Edilen Lineer DNA Parçalarının Genom DNA'sı Parçası Olduğunun %0,7'lik Agaroz Jelde Gösterilmesi. Rakamlar İzolat Numaralarını Göstermektedir. A: İzolattan Saflaştırılan Genom DNA'sı Parçasının *Sau3A* ile Kesilmesi, B: İzolattan Saflaştırılan Genom DNA'sı Parçası, C: İzolattan Saflaştırılan Genom DNA'sı, K: Kontrol Olarak Kullanılan *Eco RI-BamHI-HindIII* ile Kesilmiş λ DNA'sını Göstermektedir.

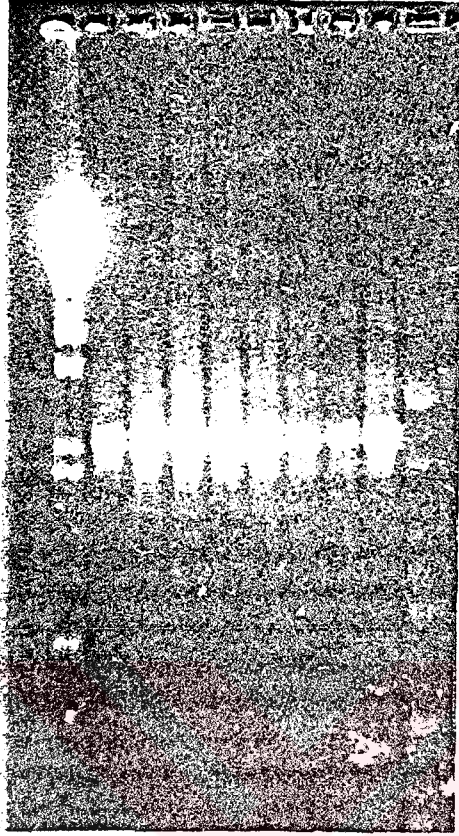


Şekil 7. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen İzolatlardan Saflaştırılan Plazmid ve Genom DNA'sı Parçalarının *PstI* ve *KpnI* Enzimi ile Kesilmesinin % 0.8'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. Rakamlar, Kesilmemiş Kontrol DNA'larını, Restriksiyon Enzimleri Uygulanan Enzimleri Göstermektedir. MA ise *Eco RI-BamHI-HindIII* ile Kesilmiş λ DNA'sını Göstermektedir.



Şekil 8. Ayder Kaplıcasından İzole Edilen 3 ve 5 Numaralı İzolatlardan Saflaştırılan Plazmid DNA'larının *PstI* ve *Sau3A* ile Kesilmiş Hallerinin %0,7'lik Agaroz Jelde Görünüşü. Rakamlar Plazmidlerin Saflaştırıldığı İzolat Numaralarını, K, Kesilmemiş Kontrol Plazmid DNA'ları, Restriksiyon Enzimlerini Test İçin Kullanılan Restriksiyon Enzimlerini, MA, *Eco RI-BamHI-HindIII* İle Kesilmiş λ DNA'sını göstermektedir.

MA 1 2 3 4 5 Bf Bs Ec

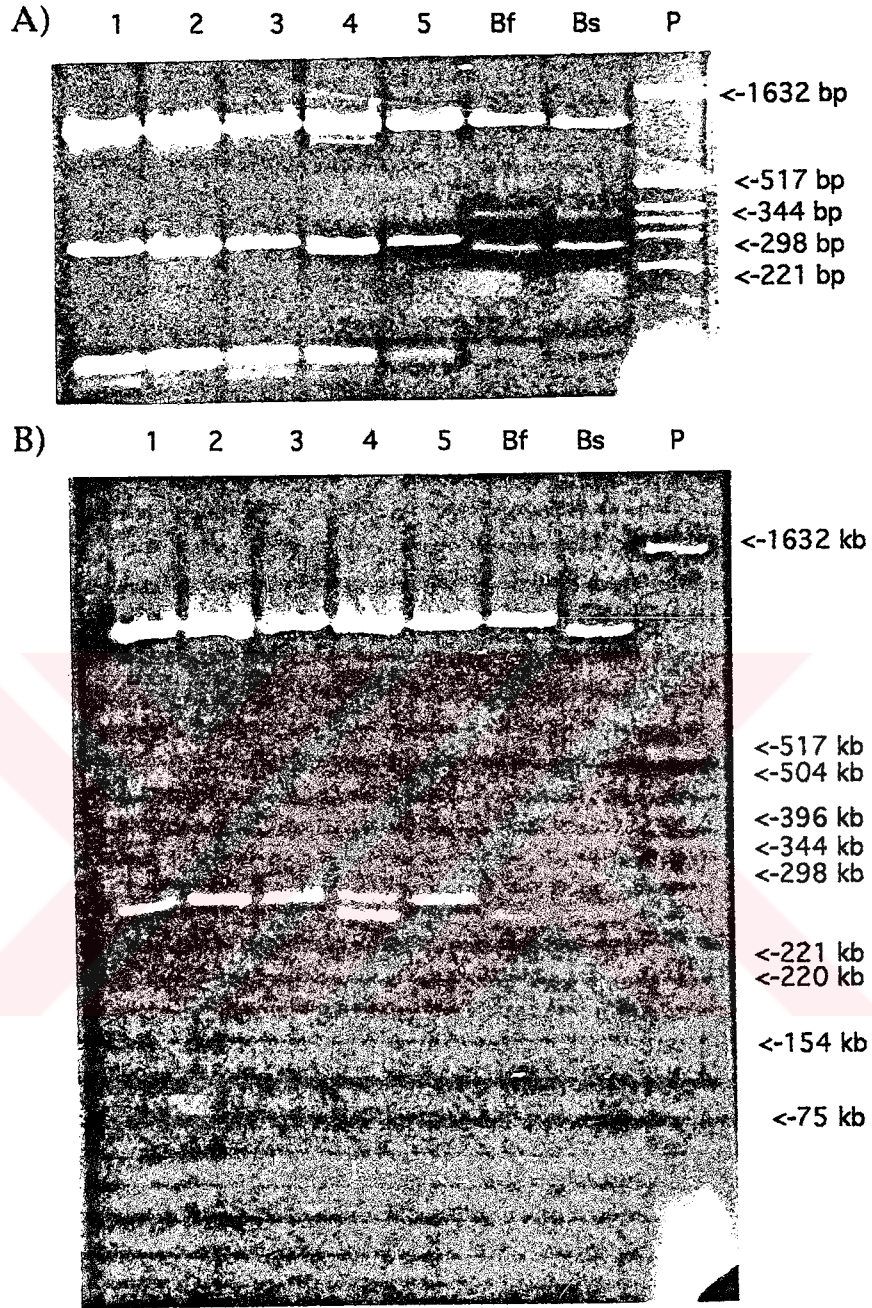


<-2323 bp
<-1929 bp

<-1371 bp
<-1264 bp

<-702 bp

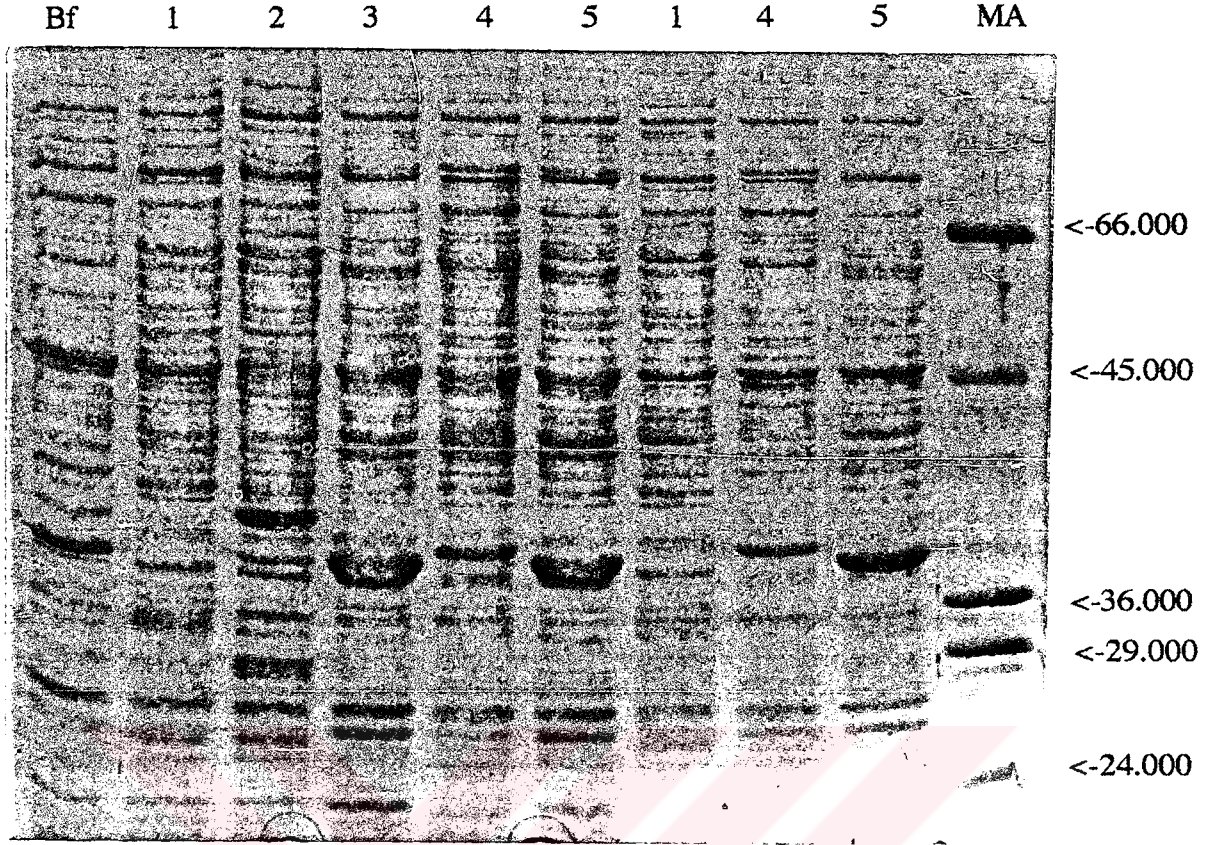
Şekil 9. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolat ve Kontrol Olarak Test Edilen *B. flavothermus*, *B. stearothermophilus* ve *E. coli* Türlerinden Saflaştırılan Genom DNA'sından PCR Yöntemiyle Çoğaltılan 16S rDNA Geninin %1.3'lük Agaroz Jeldeki Görüntüsü. MA: *BstEII* ile Kesilen λ Faj Şahit DNA'sını, Rakamlar: İzolat Numaralarını, Bf: *Bacillus flavothermus*, Bs: *Bacillus stearothermophilus* ve Ec: *Escherichia coli* 16S rDNA'sını Göstermektedir.



Şekil 10. Ayder Kaplıcasından Elde Edilen 5 İzolattan ve *B. flavothermus* ile *B. stearothermophilus* Türlerinden PCR Aracılığı ile Elde Edilen 16S rDNA Geninin *Hin*I Enzimi ile RFLP'sinin %2,5'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. A) DNA Örneklerinin Kısa Süre Yürütülmesi, B) DNA Örneklerinin Uzun Süre Yürütülmesi. Rakamlar İzolat Numaralarını, Bf: *B. flavothermus*, Bs: *B. stearothermophilus* ve P İse pBR322'nin *Hin*I ile Kesilmiş Durumlarını Göstermektedir.

3.5. İzolatların Total Protein Profili

Elde edilen 5 izolattan ve standart olarak kullanılan *B. flavothermus* (DSM2641)'den izole edilen çözünebilir proteinler, her kuyuya 50 µg olacak şekilde %12 SDS-PAGE jeline yüklendi. 15 mA'lık elektrik akımında proteinlerin yürütülmesi sonucunda Şekil 11'de de görüldüğü gibi izolatların bazı özellikleri bakımından benzer oldukları, *B. flavothermus*'tan farklı protein bantlarına sahip oldukları görüldü. Jelde elde edilen bantların birbirlerine benzerliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla her izolattaki diğer izolata benzer olan bantlar sayıldı ve izolatin görülen tüm bant sayısına oranı bulunarak aralarındaki benzerlikler ortaya çıkarıldı. Yapılan inceleme sonucunda 1 numaralı izolatin *B. flavothermus*'a % 46 oranında, 2 numaralı izolatin % 47 oranında, 3 numaralı izolatin % 36 oranında, 4 numaralı izolatin % 41 oranında ve 5 numaralı izolatin ise % 36 oranında benzediği görüldü. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından birbirine çok benzeyen 1 ve 2 numaralı izolatların protein profilleri ise birbirlerine % 66 oranında benzemektedir. Birçok özellikleri bakımından birbirlerine çok benzeyen 3 ve 5 numaralı izolatlar protein bantları açısından da birbirlerine çok benzemekte olup aralarındaki benzerlik oranı %96'dır. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından diğer izolatlardan bazı farklara sahip olan 4 numaralı izolat, protein profili açısından ilk bakışta en çok 2 numaralı izolatin protein profiline benzemektedir ve aralarındaki benzerliğin oranı % 43'dür.



Şekil 11. Ayder Kaplıcasından İzole Edilen İzolatlardan ve *B. flavothermus*'tan Saflaştırılan Çözünebilir Total Hücre Proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi. İlk 6 Hattta 50 μ g Protein Özütü, Sonraki 3 Hattta İse 25 μ g Protein Özütü Vardır. Bf: *B. flavothermus*'u, Rakamlar: İzolat Numaralarını, MA: Moleküler Ağırlığı Bilinen Şahit Proteinleri Göstermektedir. Yüksek Moleküler Ağırlığa Sahip Protein Bantlarının Aralarındaki Farklılıkların Daha İyi Bir Şekilde Ortaya Çıkarılması Amacıyla 1, 4 ve 5 Numaralı İzolatlar İkinci Defa Denenmiştir.

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda, termofilik çevrelerin ekolojileri ve evrimleri, uygulamalı ve genel mikrobiyoloji kadar ilgi çekmektedir. Bilinen bütün termofilik türler arasında, termofilik *Bacillus sp.* ve *Clostridium sp.* türleri, spor oluşturabilmeleri sebebiyle çok geniş sıcaklık aralığında, yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmeleri ve ısıya dayanıklı enzimler üretmelerinden dolayı ilgi çekmektedirler (38, 39, 40.41).

Araştırma alanından izole edilen bakterilerin hepsinin *Bacillus* cinsine ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. Literatürler incelendiğinde, sadece birkaç termofilik *Bacillus* türünün sıcak su kaplıcalarından izole edildiği görülmektedir. Bunlar; *B. flavothermus* (42), *B. caldotenax* (43), *B. caldovelox* (43), *B. acidocaldarius* (44), *B. thermocatenulatus* (45), *B. tusciae* (46) ve *B. caldolyticus*'tur (47). Bunların dışındaki *Bacillus* türleri ise mezofilik ortamlardan ve diğer habitatlardan izole edilmişlerdir (19).

Bacillus cinsi büyük bir grup olup, Gram-pozitif, aerobik, endospor oluşturan çubuk şekilli bakterilerin heterojen bir grubunu içine almaktadır. Cins içerisinde büyük oranda fenotipik çeşitlilik ortaya çıkarılmış olup, tür içerisinde veya türler arasında önemli miktarda fenotipik farklılıklar ortaya çıkarılmıştır (20, 48, 49, 50, 51, 52). Araştırma alanından izole edilen bakteriler, hem yüksek hemde düşük sıcaklıklarda üreyebildiğinden, fakültatif termofilik bakteriler olarak adlandırılmaktadırlar. Elde edilen izolatlardan hepsi endosporlu, aerobik, Gram-değişken, basil morfolojisine sahip ve hareketli olduklarından *Bacillus* cinsi içine sokulmuştur. Genelde *Bacillus* cinsine ait olan türler Gram-pozitif olarak boyanmasına rağmen, bu cins içinde Gram-negatif boyanan ve Gram-değişken olan türlerin mevcut olduğu bilinmektedir (20). İzolatlardan 1, 2, 4 ve 5 numaralı olanlar çok çabuk bir şekilde sporlanırken 3 numaralı izolat ise daha geç sporlanması ile diğerlerinden farklılık arz etmektedir. Ancak sporlanma özelliğinin *Bacillus* türlerinde çok çabuk kaybolabildiği bilinmektedir (20). Bu olay, belki de sporlanma ile ilgili olan operonların (*Bacillus subtilis*'de en azından 50 operon vardır) mutasyon ve regülasyonlara konu olması sebebiyle olabilir. Bu özelliğe bakıldığında, 3 numaralı izolatta böyle bir mutasyon veya regülasyonun olabileceği düşünülmektedir, çünkü diğer özellikleri bakımından çok benzediği 5 numaralı izolattan, sadece geç sporlanması, flagella yapısı ve daha hızlı büyümesi özelliği ile ayrılmaktadır.

Elde edilen izolatlar, bazı biyokimyasal ve üreme özellikleri açısından mevcut olan *Bacillus* türlerinden farklılık arz etmektedirler (20). İzolatlardan dördü 28-71°C arasında büyüebilirken sadece bir tanesi (2 nolu izolat) 28-72°C arasında büyümektedir. Yapılan literatür araştırmalarına göre bu sıcaklık aralığında yaşayan tek termofilik *Bacillus* türünün, *Bacillus flavothermus* olduğu görülmüştür (20, 42). Ancak izolatlardan sadece iki tanesi (1 ve 2 nolu izolatlar) koloni rengi itibariyle (açık sarı ve sarı) bu türe benzemektedir. Bu her iki izolat da Tablo 4 ve 5'de gösterilen bazı özellikleri açısından *Bacillus flavothermus*'tan farklılık arzettiğinden, bu izolatların bu türe ait olup olmadığının ortaya çıkarılması ancak diğer metodlar (genetiksel ve kemotaksonomik) yardımıyla mümkündür. Bir ve 2 nolu izolatlar bütün biyokimyasal özellikleri bakımından birbirine benzemesine rağmen, birbirlerinden, 2 nolu izolatin daha açık sarı renkli oluşu ve 72°C'de büyüebilmesi özelliği ile ayrılırlar. Bu özelliklere bakılarak bu her iki izolatin aynı türün farklı suşları olduğu düşünülmektedir. Elde edilen diğer 3 izolat (3, 4 ve 5) renk itibariyle birbirine benzemektedirler. Ancak, 4 nolu izolat, bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile diğerlerinden farklıdır. Üç ve 5 nolu izolatlar bütün biyokimyasal özellikleri bakımından birbirlerine benzemelerine rağmen 3 nolu izolat çabuk üreyebilme özelliği, geç sporlanması, flagella yapısı ve koloni morfolojisi açısından 5 nolu izolattan farklılık arz etmektedir.

Yapılan plazmid izolasyonu denemeleri sonucunda 3 ve 5 nolu izolatlardan elde edilen halka halindeki plazmidlerin restriksiyon analizleri yapıldı. Ancak 1, 2 ve 4 numaralı izolatlardan elde edilen lineer plazmid gibi görünen yapıların, genomik DNA parçaları olduğu, %0,7'lik agaroz jelde aynı miktarda lineer plazmid olduğu sanılan DNA ve genomik DNA'nın yanyana yürütülerek ve lineer plazmid zannedilen yapının *Sau3A* enzimiyle homojen olmayan parçalara ayrılmasıyla, plazmid olmadığına karar verildi.

Elde edilen bakterilerin bazı biyokimyasal ve büyüme özellikleri bakımından birbirlerine göre farklılıklar gösterdiği ve bazı özellikler bakımından mevcut olan *Bacillus* türlerinden ayrıldıkları tesbit edildi. Ancak, sadece biyokimyasal, büyüme ve fizyolojik özelliklere dayanılarak yapılan sınıflandırmanın bazı karışıklıklara neden olduğu ve bu yüzden de tam sınıflandırmanın yapılabilmesi için sonuçların bazı genetik, serolojik ve kemotaksonomik bulgularla desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (21). Bu amaçla, elde edilen izolatların içerdiği total proteinlerin profili ve 16S

rRNA'nın RFLP'leri incelendi. Yapılan SDS-PAGE jel elektroforezi sonucunda izolatların protein profilleri incelendiğinde elde edilen izolatların bazı özellikleri açısından benzer oldukları fakültatif termofilik bir bakteri olan *B. flavothermus*'a sırasıyla %46, %47, %36, %41 ve %36 oranlarında benzediği görüldü. Ayrıca biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından birbirine benzer izolatlar olan 1 ve 2 numaralı izolatların birbirlerine %66 oranında benzediği ancak 3 ve 5 numaralı izolatların ise birbirlerine %96 oranında benzedikleri gözlemlendi. Diğerlerine göre bazı bariz farklılıklara sahip olan 4 numaralı izolat ise ilk bakışta protein profili açısından benzer gibi görüldüğü 2 numaralı izolata, %43 oranında benzemektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatürlerle karşılaştırıldığında hepsinin *B. flavothermus*'tan farklı türler olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda kendi aralarında da önemli oranlarda farklılıklar olduğundan, sadece 3 ve 5 numaralı izolatların aynı türün farklı suşları olabileceği, diğerlerinden 1 ve 2 numaralı izolatların ise farklı türler olduğu, 4 numaralı izolatın ise farklı bir tür olduğu düşünülmektedir. Bilindiği gibi aynı türün suşları DNA-DNA homolojisi açısından birbirlerine en az %70 oranında benzemektedirler. Cato ve arkadaşları (30) yaptıkları çalışmada, aralarında %40 oranında DNA-DNA homolojisi olan, aynı *Clostridium* türü olduğu öne sürülen suşların, protein profili açısından çok bariz farklılıklara sahip olduğunu ve bu yüzden de bunların farklı türler olabileceğini önerdiler. Cato ve arkadaşları tarafından, 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını esas alan bir araştırma yapılmış ve araştırmanın sonucunda %80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların, aynı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür (30). Aralarında %70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken, farklı türlerin ise birbirinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür (30). Elde edilen protein profili sonuçları fizyolojik ve biyokimyasal sonuçları destekler niteliktedir.

Bilindiği gibi makromoleküllerin filogenetik analizlerde kullanılması önemli bilgiler sağlamaktadır. rRNA'ların özellikle de 16S rRNA'nın akrabalıkların incelenmesinde önemli olduğu bilinmektedir. Çünkü 16S rRNA yapısında büyük oranda bilgi içermekte olup, korunmuş bir tabiatı ve evrensel bir dağılımı vardır (53). Ayrıca Stackebrandt ve Goebel (24), aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin dizileri arasındaki benzerliğin %97'den daha az olduğunu önermektedirler. Beffa ve arkadaşları (35) aynı türe ait olan suşların, aynı RFLP'yi gösterdiğini

önermektedirler. Yapılan PCR analizi sonucunda *E. coli*'nin evrensel primerleri ile artırılan 16S rRNA geninin, *E. coli* için 1400 bp olduğu, elde edilen 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı izolatlar ve *B. flavothermus* için *E. coli*'ye benzer olarak 1400 bp uzunluğunda olduğu görülmektedir. Yapılan 16S rRNA gen amplifikasyonu sonucunda elde edilen 16S rRNA gen parçaları, *Hinf* I restriksiyon enzimi ile kesildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde izolatlardan 4 numaralı olanının diğer hepsinden kesinlikle farklı olduğu, 1, 2 ve 3 numaralı izolatların oluşan fragmentler açısından birbirine benzediği ve 5 numaralı izolatın ise diğer üç izolattan sadece 30 bp'lik bir fragment bakımından farklı olduğu görüldü. Ayrıca izolatların bazı özellikleri açısından benzer oldukları *B. flavothermus* ve *B. stherothermophilus*'tan farklı oldukları gözlemlendi. Bir ve 2 numaralı, 3 ve 5 numaralı izolatlar, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından birbirine büyük oranda benzemektedir. Diğer özelliklere bakıldığında RFLP sonuçlarının daha değişik olacağı beklenmekteydi. Yani 1 ve 2 numaraların birbirine benzemesi beklenirken 3 ve 5 numaralı izolatların RFLP'lerinin birbirlerine benzemesi beklenmekteydi. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi, aynı türün suşları arasında 16S rRNA geninin nükleotid sırası açısından, %3'lük, yani 45 nükleotidlik bir farklılığın olabileceği bilinmektedir ve bu farklılık molekülün primer yapısında olmayıp molekülün büyük oranda değişikliğe maruz kalabilen bölümlerinde olmaktadır. Önerilen bir fikre göre (24), bu farklılıklar suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi göstermekte olup, bu ilişkilerin ortaya çıkarılması için, sadece bu bölgelerin nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılmasının yeterli olabileceği düşünülmektedir. Yapılan 16S rRNA geninin, RFLP'si sonucunda beklenmediği halde, 1, 2 ve 3 nolu izolatların birbirlerine benzemesi ve 5 numaralı izolatın ise 3 numaralı izolattan farklı olması *Hinf*I ile kesme sonucunda farklılığı meydana getiren 30 bp'lik fragmentin *Hinf*I bölgesindeki böyle bir bölgede olabileceği ve diğer özellikleri bakımından birbirine çok benzeyen izolatların birbirlerinin suşları olabileceği fikrini düşündürmektedir. Elde edilen protein profili sonuçları ile karşılaştırıldığında, oluşan protein bantları açısından birbirine %96 oranında benzeyen 3 ve 5 numaralı izolatların aynı türün farklı suşları olduğu düşünülmektedir. Ancak protein profili açısından birbirine %66 oranında benzeyen 1 ve 2 numaralı izolatların aynı türün farklı suşları mı yoksa farklı türler mi oldukları yapılacak detaylı 16S rRNA dizin analizi sonucunda ortaya çıkarılacaktır. Dört numaralı izolat ise hem bazı fizyolojik ve biyokimyasal, hem protein profili ve hem de 16S rRNA

RFLP'si açısından diğerlerinden bariz bir şekilde farklı olduğundan, bu izolatın farklı bir tür olduğu düşünülmektedir.

Mevcut sonuçlar ve literatür bilgileri karşılaştırıldığında, elde edilen izolatların *B. flavothermus* ve *B. sterothermophilus*'tan farklı oldukları, bu yüzden de bunların *Bacillus* cinsine ait literatürlerde mevcut olmayan yeni türler oldukları düşünülmektedir. Aynı zamanda, izolatların kendi aralarında göstermiş oldukları farklılıklar yüzünden ya 3 farklı tür ya da aynı türün farklı suşları oldukları düşünülmektedir.

Çalışmanın yapıldığı alan halkın kaplıca olarak faydalandığı bir sıcak su kaynağı olduğundan izole edilen bakterilerin herhangi bir patojeniteye sahip olup olmadıklarının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Patojenite meydana getiren bakteriler genel olarak kapsül yapılarını meydana getirmektedir (8). Yapılan kapsül boyamalar neticesinde 1 ve 2 numaralı izolatların kapsüle sahip oldukları, 3, 4 ve 5 numaralı izolatların ise böyle bir yapıya sahip olmadıkları görüldüğünden 1 ve 2 nolu izolatların patojeniteye sebep olabileceği, 3, 4 ve 5 nolu izolatların ise olmayabileceği düşünülmektedir. Ancak kapsül yapısına sahip olan bakterilerin patojen, diğerlerinin ise patojen olmadığını kesin olarak söylenmesi mümkün olmadığından, elde edilen izolatların herhangi bir patojeniteye sahip olup olmadıkları, kesin tür tayinleri yapıldıktan sonra, yapılacak olan "biyo-assay" denemeleriyle ortaya çıkarılabilecektir.

5. SONUÇLAR

1) Sonuç olarak bu çalışmada, Ayder Kaplıcasının termofilik bakteri florası belirlendi.

2) Yapılan kantitatif sayım sonucunda kaplıca suyunun mililitresindeki termofilik bakteri sayısının 13/ml olduğu görüldü.

3) Kantitatif sayım sonucunda, filtreden geçirilmek suretiyle ve zenginleştirme kültürleri yapılarak elde edilen bakterilerden, birbirlerinden farklı oldukları gözlenen 5 izolat alınarak, diğer testlere tabi tutuldu. Yapılan morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal testler sonucunda izolatların *Bacillus* cinsine ait türler olduğu ortaya çıkarıldı.

4) Yapılan literatür araştırmalarında, *Bacillus flavothermus*'un elde edilen izolatlarla aynı sıcaklık aralığında yaşayan ve bazı özellikleri bakımından bu izolatlarla benzeyen *Bacillus* türü olduğu ortaya çıkarıldı. İzolatların gerçekten bu *Bacillus* türü olup olmadığının ortaya çıkarılması amacıyla, total protein profilleri ve 16S rRNA genlerinin RFLP'leri çıkarıldı. İzolatların ve *Bacillus flavothermus*'un total protein profilinin ve 16S rRNA genlerinin *Hinf*I ile yapılan RFLP'lerinin karşılaştırılmaları sonucunda, izolatların *B. flavothermus*'tan farklı olduğu, ayrıca kendi aralarında da önemli oranlarda farklılıklar gösterdikleri gözlemlendi.

5) Yapılan bütün testlerin sonuçları incelendiğinde, 3 ve 5 numaralı izolatların aynı türün farklı suşları olduğuna karar verilirken 1 ve 2 numaralı izolatların ya aynı türün farklı suşları veya birbirinden farklı iki tür olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, 4 numaralı izolatın ise, kesinlikle diğer dört izolattan farklı olduğuna karar verildi. Yukarıda da bahsedildiği gibi, yapılan literatür araştırmalarında, izolatlarla aynı veya çok yakın özelliklere sahip *Bacillus* türleri görülmediğinden elde edilen izolatların ya üç farklı yeni tür veya aynı türün farklı suşları olduğu düşünülmektedir. Elde edilen izolatların kesin tür tayinlerinin yapılabilmesi için 16S rRNA genlerinin dizin analizinin yapılması düşünülmektedir. Ancak bu takdirde kesin tür tayinleri yapılmış olabilecektir.

6. ÖNERİLER

Araştırma sonucunda, Ayder Kaplıcasında düşük sayıya bile olsa termofilik bakterilerin bulunmuş olması ve elde edilen bu bakterilerden iki tanesinin kapsül yapılarına sahip olmaları sebebiyle, halk sağlığı açısından bu bakterilerin herhangi bir patojeniteye sahip olup olmadığının araştırılmasını gerektirmektedir.

Kaplıcadan izole edilen bakterilerin dünya literatürü için yeni türler olduğu düşünüldüğünden, bunların ihtiva ettikleri ısıya dayanıklı enzimlerin incelenmesi gerekmektedir. Isıya dayanıklı olan bu enzimlerin endüstriyel amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan plazmid DNA'sı izolasyonları sonucunda, iki izolatta 5600 bp'lik halka halinde plazmidler bulunduğundan, bu plazmidler üzerinde bazı çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyim. Bu amaçla, elde edilen plazmidlerin taşıdıkları biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi, restriksiyon enzimi analizleri ile plazmid RFLP'lerinin yapılması düşünülmektedir. Böylece, termofilik *Bacillus* türlerinde çoğalabilen bu plazmidin, ileride bir vektör olarak kullanılması mümkün olabilecektir.

Aynı zamanda, yapılan bu çalışmanın, sonuçları ve kullanılan metodlar açısından ileride yapılması düşünülen buna benzer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyim.

7. KAYNAKLAR

1. Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., Microbiology: a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
2. Holt, J.G., Krieg, N.R, Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
3. Brock, T.D., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
4. Weimer, J.P., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
5. Beguin, P. ve Millet, J., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., New York, 1986.
6. Thomas, K.N. ve Kenealy, W.F., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
7. Brock, T.D. ve Freeze, H., *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. , A Nonspulating Extreme Thermophile, J. Bacteriol. 98 (1969) 289-97.
8. Brock, T.D. ve Madigan, M.T., Biology of Microorganisms, Prentice Hall, New Jersey, 1988.
9. Brock, T.D., Life at High Temperatures, Science, 230 (1985) 132-138.
10. Tansey, M.R. ve Brock, T.D., Microbial Life in Extreme Environments, Academic Press, New York, 1978.
11. Woese, C.R., Archaeobacteria, Wolfe, R.S., Academic Press, New York, 1985.
12. Brock, T.D., Brock, M.L., Bott, T.L. ve Edward, M.R., Microbial Life at 90°C: The Sulfur Bacteria of Boulder Spring, J. Bacteriol., 170 (1971) 303-314.
13. ANONİM, Rize İli Turizm Envanteri, Rize, 1994.

14. ANONİM, Maden Suyu Analiz Raporu, T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Çevre Sağlığı Müdürlüğü, Ankara, 1986.
15. Matsumura, M., Katakura, Y., Imanaka, T. ve Aiba, S., Enzymatic and Nucleotide Sequence Studies of a Kanamycin-Inactivating Enzyme Encoded by a Plasmid from Thermophilic Bacilli in Comparison with That Encoded by Plasmid pUB110, J. Bacteriol., 160 (1984) 413-420.
16. Watanabe, K., Oshima, T. ve Nishimura, S., CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nucleic Acids Res., 3 (1976) 1703-1713.
17. Zinder, S.H., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
18. Benson, H.J., Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, 1985.
19. Canganella, F. ve Trovatelli, L.D., Ecological and Physiological Studies on Thermophilic Bacilli from Sulfataric Hot Springs of Central Italy, J. Basic Microbiol., 35 (1995) 9-19.
20. Sneath, A.P., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
21. Johnson, J.L., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
22. Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nucleic Acids Res., 12 (1984) 5837-5852.
23. Relman, D.A., Schmidt, T.M., MacDermott, R.P. ve Falkow, S., Identification of The Uncultured Bacillus of Whipple's Disease, N. Engl. J. Med., 327 (1992) 293-301.
24. Stackebrant, E. ve Goebel, B.M., Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, Int. J. Syst. Bacteriol., 44 (1994) 846-849.

25. Cummins, C.S. ve Harris, H., The Chemical Composition of the Cell Wall in Some Gram-Positive Bacteria and Its Possible Value as a Taxonomic Character, J. Gen. Microbiol., 14 (1956) 583-600.

26. Jeffries, L., Cawthorne, M.A., Harris, M., Cook, B. ve Diplock, A.T., Menaquinone Determination in the Taxonomy of *Micrococcaceae*, J. Gen. Microbiol., 54 (1969) 365-380.

27. Yamada, Y., Inouye, G., Tahara, Y. ve Kondo, K., The Menaquinone System in the Classification of Aerobic Gram-Positive Cocci in the Genera *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* and *Sporasarcina*, J. Gen. Appl. Microbiol., 22 (1976) 227-236.

28. O'Farrel, P., High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, J. Biol. Chem., 250 (1975) 4007-4021.

29. Roberts, G.P., Leps, W.T., Silver, L.E. ve Brill, W.J., Use of Two-Dimensional Electrophoresis to Identify and Classify *Rhizobium* strains, Appl. Environ. Microbiol., 39 (1980) 414-422.

30. Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman, L.V. ve Moore, W.E.C., Electroforetic Study of *Clostridium* Species, J. Clin. Microbiol. 15 (1982) 688-702.

31. Holdeman, L.V. ve Cato, E.P., Anaerobic Laboratory Manual, Moore, W. E. C., Fouth Edition, Blacksburg, 1977.

32. Voskuil, M.I. ve Chambbiss, G.H., Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 59 (1993) 1138-1142.

33. Pitcher, D.G., Saunders, N.A. ve Owen, R.J., Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate, Lett. Appl. Microbiol, 8 (1989) 151-156.

34. Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. ve Noller, H.F., Complete Nucleotid Sequense of a 16S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (1978) 4801-4805.

35. Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L. ve Aragno, M., Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), Appl. Environ. Microbiol., 62 (1996) 1723-1727.

36. Marion, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
37. Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York, (1982).
38. Ljungdahl, L.G., Physiology of Thermophilic Bacteria, Adv. Microbiol. Physiol., 19 (1979) 149-156.
39. Sonnleitner, A., Biotechnology of Thermophilic Bacteria, Growth Products and Application, Adv. Biochem. Eng. Biotech., 28 (1983) 69-138.
40. Sharp, R.J., Riley, P.W. ve White, D., Heterotrophic Thermophilic Bacilli. In: Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J.K., CRC Press, Boca Raton, 1991.
41. Cangenella, F. ve Wiegel, J., The Clostridia and Biotechnology, Woods, D.R, Butterworth Press, Stoneham, MA, 1993.
42. Heinen, W., Lauwers, A.M. ve Mulders, J.W.M., *Bacillus flavothermus*, A Newly Isolated Facultative Thermophile, Antonie van Leeuwenhoek, 48 (1982) 265-268.
43. Heinen, W.J. ve Heinen, W., Characteristics and Properties of a Caldoactive Bacterium Producing Extracellular Enzymes and Two Related Strains, Arch. Microbiol, 82 (1972) 1-7.
44. Darland, G. ve Brock, T.D., *Bacillus acidocaldarius* sp., nov. An Acidophilic Thermophilic spore-forming Bacterium, J. Gen. Microbiol, 67 (1971) 9-15.
45. Heinen, W., Growth Conditions and Temperature Dependent Substrate Specificity of Two Extremely Thermophilic Bacteria, Arch. Microbiol, 76 (1971) 2-8.
46. Golovacheva, R.S., Egora, L.A. ve Loginoya, I.G., Ecology and Systematics of Aerobic Obligate Thermophilic Bacteria Isolated from Thermal Localities on Mount Yangou-Tau and Kunashir Isle of the Kuril Chain, Microbiology, 34 (1965) 693-670.
47. Bonjour, F. ve Aragno, M., *Bacillus tusciae*, A New Species of Thermoacidophilic, Facultatively Chemolithoautotrophic, Hydrogen Oxidizing Spore Former from a Geothermal Area, Arch. Microbiol, 199 (1984) 397-401.

48. Claus, D. ve Fatz, D., Bacillus, En. C.R. Harwood, Plenum Press, New York, 1989.

49. Gordon, R.E., The Aerobic Endospore Forming Bacteria - Classification and Identification, Berkeley, C.W. ve Goodfellow, M., Academic Press, London, 1981.

50. Gordon, R.E., Haynes, W.C. ve Pang, C.H.-N., The Genus Bacillus, Washinton D.C., 1973.

51. Priest, F.G., Goodfellow, M. ve Tood, C., The Aerobic Endospore Forming Bacteria - Classification and Identification, Berkeley, C.W. ve Goodfellow, M., Academic Press, London, 1981.

52. Priest, F.G., Goodfellow, M. ve Tood, C., A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*, J. Gen. Microbiol, 143 (1988) 1847-1882.

53. Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. ve Pace, N.R., Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetics Analysis, Proc. Natl. Acad. Sci, 82 (1985) 6955-6959.

8. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Sürmene'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Araklı'da Lise öğrenimini Samsun'da tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1993 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve Şu anda Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

