

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MUŞ-ÇUKURBAĞ GAZLI SONDAJ SUYUNDAN BAKTERİ
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Biyolog Çiğdem ALBAYRAK

36793

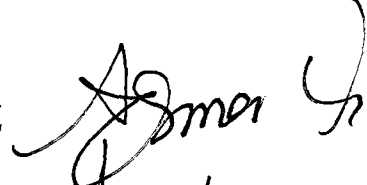
Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28.12.1999
Tezin Savunma Tarihi : 01.02.2000

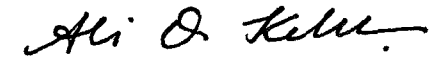
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ



Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU



Trabzon 2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

"Muş-Çukurbağ Gazlı Sondaj Suyundan Bakteri İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu" konulu bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasını bana veren ve çalışmamın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Ali Osman BELDÜZ'e ve çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım Doç.Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Doç.Dr. Ali Osman KILIÇ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, her konuda bana yardımcı olan değerli arkadaşım Arş.Gör. Sabriye Dülger'e içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca, ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Arş.Gör. Remziye Nalçacıoğlu'na, Nuran Durmuş'a, Hatice Katı'ya ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, gerek özel ve gerekse bütün öğrenim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, sevgili anneme ve babama özellikle teşekkür ederim.

Ayrıca, bu projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Araştırma Fonu'na da (Proje No: 99.111.004.1) teşekkür ederim.

Çiğdem ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
TABLO LİSTESİ.....	IX
SEMBOL LİSTESİ	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2.Mikroorganizmaların Sınıflandırılması.....	3
1.3. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler	4
1.3.1. Bakteri Hücresinin Yapısı.....	4
1.3.2. Bakterilerin Hücre Duvarı Varlığına ve Yapısına Göre Sınıflandırılması.....	7
1.3.2.1. Gram-negatif Öbakteriler	7
1.3.2.2.Gram-pozitif Öbakteriler.....	7
1.3.2.3. Hücre Duvarına Sahip Olmayan Öbakteriler	8
1.3.2.4. Arkebakteriler.....	8
1.3.3. Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Aralığına Göre Gruplandırılmaları.....	9
1.3.3.1. Sakrofiller	9
1.3.3.2. Mezofiller.....	9
1.3.3.3.Termofiller.....	9
1.4. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgiler.....	10
1.5. Kontrol Olarak Kullanılan Cinslerin Genel Özellikleri.....	12
1.5.1. <i>Bordetella</i> Cinsi.....	12
1.5.2. <i>Bacillus</i> Cinsi	12
1.5.3. <i>Providencia</i> Cinsi.....	13
1.6. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kriterler	13
1.6.1. Bakterilerin Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri.....	13
1.6.2. Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	14
1.6.2.1. Bakterilerin Fiziksel İhtiyaçları.....	14
1.6.2.2. Bakterilerin Biyokimyasal Aktiviteleri.....	15
1.6.2.2.1.Ekstraselüler Enzimler	15

1.6.2.2.2. İntraselüler Enzimler	15
1.6.3. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Genetiksel Özellikler.....	16
1.6.3.1. DNA Baz Kompozisyonu.....	16
1.6.3.2. DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu	17
1.6.3.3. Nükleik Asit Hibridizasyonu.....	17
1.6.3.4. 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması.....	17
1.6.3.5. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması.....	18
1.6.4. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kemotaksonomik Özellikler....	18
1.6.4.1. Lipid Kompozisyonu.....	18
1.6.4.2. Total Protein Profili	19
1.6.4.3. Sitokrom Özelliği.....	20
1.6.4.4. İmmünolojik Özellikler	20
1.6.4.5. Enzim Karakterizasyonu.....	20
1.6.4.6. Fermentasyon Ürünlerinin Profili	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
2.1. Materyaller.....	21
2.1.1. Besiyerleri ve Kimyasallar	21
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri	21
2.2. Metotlar	22
2.2.1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı.....	22
2.2.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanışı	22
2.2.1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı.....	24
2.2.2. Örneklerin Alınması ve Araştırılan Suyun Kantitatif Analizinin Yapılması.....	25
2.2.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması	25
2.2.4. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
2.2.4.1. Basit Boyama	25
2.2.4.2. Gram Boyama	26
2.2.4.3. Spor Boyama.....	26
2.2.4.4. Hareket testleri	26
2.2.5. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	27
2.2.5.1. İzolatların Üreme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	27
2.2.5.2. İzolatların Üreyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi	27
2.2.5.3. İzolatların Sodyum Klorür İhtiyaçlarının Belirlenmesi	28

2.2.5.4. İzolatların Atmosferik O ₂ İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	28
2.2.5.5. Nişasta Hidrolizi Testi	28
2.2.5.6. Jelatin Hidrolizi Testi	29
2.2.5.7. Karbohidrat Fermentasyonu Testi.....	29
2.2.5.8. Hidrojen Sülfür Üretim Testi	29
2.2.5.9. Voges-Proskauer Testi	30
2.2.5.10. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi.....	30
2.2.5.11. Nitratı İndirgeme Testi.....	30
2.2.5.12. Katalaz Testi.....	30
2.2.5.13. Oksidaz Testi.....	31
2.2.5.14. İzolatların Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi	31
2.2.5.15. İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (Fenantren) Parçalama Özelliklerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.6. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi	31
2.2.6.1. Genom DNA'larının %G+C İçeriklerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.6.1.1. Genom DNA'larının İzolasyon Metodu.....	31
2.2.6.1.2. %G+C Oranının Belirlenmesi.....	32
2.2.6.2. Plazmit DNA'larının İzolasyonu.....	33
2.2.6.3. Plazmit Transformasyonu.....	34
2.2.6.4. PCR Yöntemiyle 16S rRNA Analizi.....	35
2.2.6.5. 16S rDNA'nın Restriksiyon Fragmenti Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP).....	35
2.2.7. İzolatların Total Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması.....	36
2.2.7.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu.....	36
2.2.7.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini	36
2.2.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	36
3. BULGULAR	38
3.1. Suyun Kantitatif Analizi.....	38
3.2. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri.....	38
3.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	39
3.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri	43
3.5. İzolatların Total Protein Profili	49
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇLAR.....	56
6. ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR.....	58
8. ÖZGEÇMİŞ	61

ÖZET

Bu araştırmada, Muş Çukurbağ Köyü'nden alınan gazlı sondaj suyundan bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Bu bakterilerin tür tayinleri yapıldı. Aynı zamanda, incelenen sudaki bakteri sayısı araştırıldı.

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

Yapılan araştırma sonucunda, gazlı sondaj suyundaki bakteri sayısının 124 bakteri/ml olduğu saptandı. Elde edilen izolatlar, özellikleri dikkate alınarak, *Bacillus*, *Bordetella* ve *Providencia* cinsleri iine dahil edildiler.

Anahtar Kelimeler: Gazlı Sondaj Suyu, *Bacillus sp.*, *Bordetella sp.*, *Providencia sp.*

SUMMARY

Isolation and Molecular Characterisation of Bacteria in Muş- Çukurbağ's Gas Saturated Ground Water

In this study, bacteria isolation were carried out from Mus-Cukurbag's gas saturated ground water, and then, species of isolates were tried to be determined. Meanwhile, the number of bacteria in the samples from water was determined.

The number of bacteria in the water samples was defined by the membrane filtration method. In addition, the samples obtained by filtration and the enrichment cultures from the gas saturated ground water were grown on nutrient agar medium and the colonies were examined under stereo microscope. Five different isolates were subjected to the further tests. Morphological, physiological, biochemical, some genetically and chemotaxonomical features of the isolates were examined.

As conclusion, the number of bacteria in the gas saturated ground water was found as 124 bacteria/ml. According to the properties of isolates, they are placed into genus *Bacillus*, *Bordetella* and *Providencia*.

Key Words: Gas Saturated Ground Water, *Bacillus* sp.,
Bordetella sp., *Providencia* sp.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. İncelenen suyun ateşle muamele edilmeden önceki görüntüsü.....11
- Şekil 2. İncelenen suyun ateşle muamele edildikten sonraki görüntüsü.....11
- Şekil 3. MC1'in Tm değeri.....44
- Şekil 4. MC2'nin Tm değeri.....44
- Şekil 5. MC3'ün Tm değeri.....45
- Şekil 6. MC4'ün Tm değeri.....45
- Şekil 7. MC5'in Tm değeri.....46
- Şekil 8. MC4'ten saflaştırılan plazmit DNA'sının %0,7'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....46
- Şekil 9. İzolatlardan saflaştırılan genom DNA'sından PCR yöntemiyle çoğaltılan 16S rRNA geninin %1,3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.47
- Şekil 10. İzolatlardan ve kontrol türlerden PCR ile elde edilen 16S rRNA geninin *Hinf* I enzimi ile RFLP'sinin % 2,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....48
- Şekil 11. MC1 ve kontrol olarak kullanılan *B. mycooides*'ten saflaştırılan çözünebilir total hücre proteinlerinin%12'lik SDS-PAGE'den analizi49
- Şekil 12. MC2, MC3, MC4 ve MC5'ten ve kontrol türlerden saflaştırılan çözünebilir total hücre proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'den analizi.....57

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Başlıca mikroorganizma grupları.....	3
Tablo 2. İncelenen suyun özellikleri.....	10
Tablo 3. İzolatların morfolojik ve üreme özellikleri.....	39
Tablo 4. Kontrol türlerin morfolojik ve üreme özellikleri.....	39
Tablo 5. İzolatların ve kontrol türlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	41
Tablo 6. İzolatların ve kontrol türlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	42
Tablo 7. İzolatların antibiyotiklere olan dirençlilikleri.....	43
Tablo 8. İzolatların ve kontrol türlerin %G+C içerikleri.....	43



SEMBOL LİSTESİ

<i>B. mycoides</i>	: <i>Bacillus mycoides</i>
<i>B. polymyxa</i>	: <i>Bacillus polymyxa</i>
<i>B. circulans</i>	: <i>Bacillus circulans</i>
<i>B. bronchiseptica</i>	: <i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>P. rustigianii</i>	: <i>Providencia rustigianii</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAz	: Ribonükleaz Enzimi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
dak	: Dakika
sn	: Saniye

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde yaşayan ve daha önce yaşadığı bilinen türlerin belirli bir sistem içinde ele alınıp sınıflandırılması uzun zamandır devam etmektedir. Gerek dış görünüşleri gerekse iç yapıları karşılaştırılan canlıların birçok bakımdan benzer oluşu bunları gruplandırmayı mümkün kılmıştır (1).

Mikroorganizmaların keşfinden önce, doğadaki bütün canlı yaratıkların hayvan veya bitki orijinli olduğu ve başka ara türlerin olmayacağı düşünülürdü. Mikroskobun keşfi ve bunun yardımı ile mikroorganizmaların bulunması, mevcut durumu tamamiyle değiştirmiş ve gözle görülmeyen başka bir canlılar aleminin varlığını ortaya koymuştur. Bu mikroskobik canlıların insan ve hayvanlarda hastalık oluşturdıkları saptandıktan sonra önemleri daha da artmış, üzerlerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır ve hala da yapılmaya devam etmektedir. Mikroorganizmaları belli, geçerli ve devamlı bir sınıflandırmaya tabi tutma fikri çok eskiden başlamış olmasına rağmen, yeni mikroorganizmaların bulunması ve bunların değişik karakterlere sahip olmaları nedeniyle, yapılan sistematiğe devamlı değişmekte ve yerlerine günün koşullarına uygun olanları hazırlanmakta ve konulmaktadır (2).

Mikroorganizmaların özellikleri, onlarda yüksek canlılarda uygulandığı gibi, filogenetik temele dayalı olarak tam bir şekilde tür, cins, familya, takım, sınıf, şube dizisine uygun bir sınıflandırma yapabilmek için sınırlıdır. Bilindiği gibi yüksek canlılarda bu tür sınıflandırmalar için fosillerden yararlanılır. Her ne kadar sınırlı sayıda mikroorganizma fosili bulunabilmekte ise de bunların özelliklerinin incelenmesi yüksek canlılarınkine kıyasla oldukça zordur (3). Ayrıca mikroorganizmaların gözle görülmemeleri ve küçük olmaları bunların birçok özelliğinin saptanamamasına yol açmaktadır. Bu durum da sistematikğin geçerliliğini ve devamlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Mikrobiyolojik teknikler ilerledikçe, mikroorganizmaların karakterlerinin büyük bir bölümü açıklığa kavuşmakta ve sistematikteki yerleri de buna bağlı olarak daha sağlam ve belirgin olmaktadır (2).

Önceleri bitki olarak ele alınan bakterilerin, günümüzde özel bir hücresel yapıya sahip olduğunun anlaşılması, bakteri sistematikğini ortaya çıkarmıştır. Mikrobiyolojik tekniklerin çok gelişmemiş olduğu dönemlerde bakterilerin sınıflandırılmaları aralarındaki fenotipik

benzerliklere bakılarak yapıldı. Bu metodlar, halen daha kullanılmaktadır. Ancak bu özellikleri birbirine aşırı derecede benzeyen organizmaların ayrılmasında ve bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında çok başarılı olmamaktadır. Ortaya çıkan bu tip problemlerin çözümlenmesinde nükleik asitlerle yapılan çalışmaların kullanılmasına ilk olarak 25 sene önce başlanmıştır (4). Sınıflandırma çalışmalarında genomik ilişkilerin kullanılması, yapılan tür tayinlerinin daha kesin olmasını sağlamaktadır.

Bilindiği gibi bakteriler havada, toprakta ve suda yaşayabilen mikroorganizmalardır. Günümüzde bakteri sistematığına yeni türler kazandırmak amacıyla, bu ortamlardan bakteri izolasyonu yapılmaktadır.

Bu çalışmada, Muş'un Çukurbağ Köyü'nden alınan su örneği incelenmiştir. Su, ateşle muamele edildiğinde yanıcı bir özelliğe sahiptir. Suyun yanıcı olma özelliği içerisinde gaz veya petrol gibi bileşiklerin varlığını göstermektedir. Bu nedenle suyun diğer bilinen ortamlardan farklılık göstermesi bize burada yeni bakteri türlerinin, yeni bir bakteri türü tespit edilmese bile yeni suşların olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan araştırmada, çalışma ortamı olarak belirlenen suyun bakteri izolasyonu yapılarak bunların teşhis edilmesi, böylece literatüre yeni türlerin kazandırılması ve ekonomik önemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

Yapılarına bakılarak mikroorganizmaların üç büyük grupta toplanmaları uygun bulunmaktadır. Birinci grupta, hücre yapıları bitki ve hayvan hücrelerinin yapısına benzerlik gösteren mikroorganizmalar yer almaktadır. Bunlara gerçek çekirdekli anlamına gelen ökaryotik mikroorganizmalar (**Eucaryotae**) adı verilir. Bu gruba algler, protozoonlar ve mantarlar girmektedir. Mikroorganizmaların ikinci grubunda daha basit bir hücre yapısına sahip olan mavi-yeşil algler (**Cyanobacteria**), bakteriler ve yapıları prokaryotlarla ökaryotlar arasında bir geçiş yapısı gösteren arkebakteriler (**Archaeobacteria**) bulunmaktadır. Bu gruba prokaryotlar (**Procaryotae**) denir. Mikroorganizmaların üçüncü grubunu ise bir hücre yapısı göstermeyen ve tek başlarına metabolizma aktiviteleri bulunmayan **virüsler** oluşturmaktadır. Başlıca mikroorganizma grupları Tablo 1'de görülmektedir (3).

Tablo 1: Başlıca mikroorganizma grupları

<p>Ökaryotlar (Eucaryotae) Algler (Algae) Protozoonlar (Protozoa) Mantarlar (Fungi) Küfler Mayalar</p>
<p>Prokaryotlar (Procaryotae) Arkebakteriler (Archaeobacteria) Siyanobakteriler (Cyanobacteria) Bakteriler (Bacteria) Spiroketler (Spirochaeta) Öbakteriler (Eubacteria) Klamidiyalar (Chlamydia) Riketsiyalar (Rickettsia) Mikoplazmalar (Mycoplasma)</p>
<p>Virüsler ve Viroidler</p>

1.3. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler

1.3.1. Bakteri Hücresinin Yapısı

Laboratuvarlarda araştırma amacıyla çok sık kullanılan ışık mikroskoplarının (faz kontrast, ultraviyole, vs.) ve özellikle de son yıllarda elektron mikroskopunun keşfedilmesi ile birlikte, mikroorganizmaların morfolojilerinin ve yapılarının ayrıntılı incelenmesi mümkün olmuştur (2).

Bakteri hücresi, prokaryotik hücre yapısındadır. Bu çeşit hücreler, temelde ökaryotik hücreye benzerlikler göstermekle beraber önemli ayrılıkları da bulunmaktadır. Genellikle daha basit hücre yapısı gösterirler (3). Tipik bir prokaryot hücresi, hücre duvarı, hücre zarı, ribozom ve nükleer bölgeden ibarettir (5).

Hücre zarının dışında bulunan hücre duvarı, hücreye desteklik sağlayan ve onu koruyan, hücrenin dışındaki yapıdır (6). Kalınlığı bakteri cins ve türlerine göre değişmek üzere, genellikle, 10-25 nm arasında bir ölçüye sahip olan hücre duvarı, sert ve aynı zamanda elastik bir yapı karakterine sahiptir ve bu özelliği sayesinde, bakterilere şekil vermektedir. Bakterilerin yaşamı için önemli olan permeabilitenin veya ozmosisin sağlanmasında ve devam ettirilmesinde, antijenik karakterlerinin ve virülens faktörlerinin oluşturulmasında ve ayrıca gram pozitiflik ve gram negatifliğin meydana gelmesinde, diğer faktörlerin yanı sıra, hücre duvarının rolü oldukça fazladır (2).

Hücre zarı, hücre duvarının altında, bundan ayrı, daha ince ve sitoplazmayı saran iki katmanlı (fosfolipid bilayer) bir zardır. Kalınlığı bakteri türleri arasında az çok değişmesine karşın yapısı hemen hemen benzerdir. Kalınlığı 5-10 nm kadar olan hücre zarı ile hücre duvarı arasında periplazmik bir boşluk bulunur. Hücre zarının, sitoplazmayı sarmak ve korumak, seçici geçirgenlik ve ozmotik bariyer sağlamak, enerji metabolizmasında görevli enzim reaksiyonlarını temin etmek, DNA'nın replikasyonunda görev almak ve hücre bölünmesinde ve sporulasyonda septum oluşumuna yardımcı olmak gibi çok önemli görevleri vardır (2).

Ribozomlar, bakteri sitoplazması içinde, sayısı, yoğunluğu ve büyüklükleri türlere göre değişebilen oluşumlardır. Yapısında %40 protein ve %60 ribonükleik asit (RNA) bulunan ribozomların çapı 10-20 nm arasındadır. Hücrenin total proteininin %40'ını ve RNA'sının %90'ını oluştururlar (2). Hücredeki ribozomlar, sadece elektron mikroskobu ile

görülebirlirler. Bir prokaryotik hücrenin ihtiva ettiği ribozom sayısı 10.000 civarındadır. Bilindiği gibi, hücrenel protein sentezi ribozomlar üzerinde gerçekteşmektedir (5). Prokaryotik ribozomlar, biri küçük (30S) ve diğeri büyük (50S) olmak üzere 70S karakteri gösterirler. Protein sentezi sırasında 70S ribozomlar mRNA üzerinde tespil gibi dizilerek poliribozom (veya polisom) oluştururlar. Ribozomlar, bakteri için lüzumlu olan proteinlerin ve enzimlerin sentez edildikleri ünitelerdir (2).

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 gerçekte bir nükleusa sahip değillerdir. 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 hücrelerdeki benzer olarak kromozom adı verilmektedir. Ayrıca prokaryotik hücreler bu kromozom DNA'sına ilave olarak, plazmit 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 görülebirlirler (5).

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. 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 (5).

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 üreme açlık veya diğer bazı nedenler dolayısıyla kesildiğinde, 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. Sporun germinasyonu başlar başlamaz, sıcaklığa ve diğer zararlı ajanlara karşı olan dirençlilik özelliği kaybolur (5).

Çoğu prokaryotik hücreler yüzeylelerinde 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 (5).

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 (5).

1.3.2. Bakterilerin Hücre Duvarı Varlığına ve Yapısına Göre Sınıflandırılması

1.3.2.1. Gram-negatif Öbakteriler

Gram-negatif tipe örnek teşkil eden bakteriler dış membran, iç membran ve ince bir peptidoglukan tabakasına sahiptirler (peptidoglukan tabakaları muramik asit ihtiva eder, ancak bu muramik asit çoğu organizmada olmakla beraber birkaç organizmada duvarın bu kısmı kaybolmuştur) (5). 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 olabildiği gibi, litotrofik veya heterotrofik de olabilirler. Aynı zamanda bakteriler aerobik, anaerobik, fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik türler olabilirler. Türlerden bazıları zorunlu hücre içi parazitleridir.

1.3.2.2. Gram-pozitif Öbakteriler

Bu gruba giren organizmalar, gram-pozitif tipli, hücre duvarına sahip olan prokaryotik canlılardır. Gram reaksiyonlarının genellikle pozitif çıktığı gözlenmekle birlikte, bazen de negatif olarak çıktıkları bilinmektedir. Hücreler yuvarlak, çubuk şeklinde veya filamentler halinde olabilirler. Çomak ve filamentlerin dallanma göstermediği durumlar olduğu gibi, tersine gerçek dallanma gösterenler de mevcuttur. Çoğalmaları genellikle ikiye bölünme şeklinde olur. Bazıları dinlenme formu olarak spor oluştururlar. Fotosentetik değillerdir ve genel olarak kemosentetik heterotrofturlar. Aerobik, anaerobik, fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik türleri içermektedirler. Bu bölümün üyeleri sporla üreyen ve üremeyen türleri içermektedir.

1.3.2.3. Hücre Duvarına Sahip Olmayan Öbakteriler

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. Çoğalmaları tomurcuklanma, parçalanma veya ikiye bölünme ile olur. Genellikle hareketsizdirler, ancak bazı türler kayma şeklinde hareket ederler. Dinlenme formları (endosporlar) yoktur. 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 mikoplazmaların genom büyüklükleri diğer prokaryotlardan çok daha küçük olup $0,5-1,0 \times 10^9$ daltondur. Mikoplazmalar saprofitik, parazitik veya patojenik olabilirler. Bunlar hayvanlarda ve bitkilerde büyük problemlere sebep olurlar.

1.3.2.4. Arkebakteriler

Anaerobik şartlarda çok tuzlu, hidrotermal veya jeotermal olarak ısıtılmış çevrelerde yaşarlar. Bazı türleri, hayvanların sindirim sisteminde simbiyotik hayat sürer. Bunlar kemolitotrofik, organotrofik veya fakültatif organotrofik olarak büyüyen fakültatif anaerop, anaerop veya aerobik canlılardır. Arkebakteriler, 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 olarak sonuçlanabilir. 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 $200 \mu\text{m}$ 'ye kadar çıkabilir. Çoğalmaları ikiye bölünme, tomurcuklanma, parçalara ayrılma veya bilinmeyen mekanizmalarla olabilir.

Arkebakterilerin ihtiva ettikleri büyük gruplar şunlardır: Metanojenik arkebakteriler, arkebakteriyal sülfat indirgeyiciler, tamamen halofilik

arkebakteriler, hücre duvarı olmayan arkebakteriler ve tamamen termofilik arkebakteriler.

1.3.3. Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Aralığına Göre Gruplandırılmaları

Tabiatta mevcut olan bütün bakteriler üreyebildikleri sıcaklık aralığına göre üç gruba ayrılarak incelenmektedirler (7). Bu gruplar şöyle sıralanmaktadır:

1.3.3.1. Sakrofiller

Bu gruba giren bakteriler -5 ile 20°C arasında üreyebilen bakterilerdir. Bunların en önemli ayırt edici özellikleri 0 ile 5°C arasında üreyememeleridir (8). Toprak, su, deniz ve göllerde yaşayan bazı mikroorganizmalar ile balıklarda ve soğuk kanlı hayvanlarda hastalık oluşturan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Soğuk seven bazı mikroorganizmalar ve mantarlar buzdolabı sıcaklığında (4°C 'de) kolaylıkla üreyebilir ve gıdaları bozabilirler (2).

1.3.3.2. Mezofiller

Mezofiller, $20-45^{\circ}\text{C}$ arasında üreyebilen bakterilerdir. Bunların en önemli ayırt edici özellikleri insan vücut sıcaklığında (37°C) üreyebilme yetenekleridir (8). Bu nedenle, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mikroorganizmaların büyük bir kısmı bu gruba dahildirler (2). Mezofillerin diğer bir özelliği ise, 45°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda üreyememeleridir. Mevcut olan tüm mezofilik bakteriler iki farklı grup altında incelenmektedirler: a) Örnek olarak bitki saprofitlerinin verildiği, optimum üreme sıcaklıkları, $20-30^{\circ}\text{C}$ arasında değişen bakteriler bu gruba girmektedirler, b) Sıcak kanlı hayvanların vücudunda yaşayan ve optimum üreme sıcaklıkları $35-40^{\circ}\text{C}$ arasındaki bakterilerdir.

1.3.3.3. Termofiller

Termofilik mikroorganizmalar hakkında birkaç tanım bulunmaktadır. Bir tanıma göre, $45-50^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde üreyebilen bakteriler olarak adlandırılırken (8), diğer bir tanıma göre ise yüksek sıcaklıklarda

üreyebilme yeteneğinde olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (9). Bu tür mikroorganizmalara, sıcak su kaynaklarında, gübrelerde ve tropikal ülkelerde rastlamak mümkündür. Termofilik bakteriler ve sporlar, pastörizasyon sıcaklığına dayanıklıdır. Sütlerin pasterizasyonundan sonra da ısıya dayanıklı birçok mikroorganizma canlı kalır. Konserve gıdaların sterilizasyonu bu nedenle önem kazanmaktadır (2).

Termofilik bakteriler iki gruba ayrılarak incelenmektedirler. Birinci grupta, optimum üreme sıcaklığı 45-60°C arasında olan, ancak 37°C'de de üreyebilen fakültatif termofilik bakteriler, ikinci grupta ise optimum üreme sıcaklığı 60°C'nin üzerinde olan ve minimum üreme sıcaklığı 50°C civarında olan tamamen termofilik bakteriler bulunmaktadır.

1.4. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgiler

Araştırmaya konu olan gazlı sondaj suyu, Muş'un merkezine bağlı Çukurbağ Köyü'nden alınmıştır. Su, ateşle muamele edildiğinde yanıcı bir özelliğe sahiptir. Yanma olayı uzun sürmemekte, parlama şeklinde olmaktadır. Su, topraktan, fazla geniş olmayan bir aralıktan, köpürerek çıkmaktadır. Söz konusu olan su hakkında daha önce bilimsel bir araştırma yapılmamıştır. İncelenen suyun bazı özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. Şekil 1 ve 2'de ise suyun, ateşle muamele edilmeden önceki ve sonraki görüntüsü verilmiştir.

Tablo 2: İncelenen suyun özellikleri

Ozellikler	Katyonlar (ppm)	Anyonlar (ppm)
Renksiz, Tortu Yok Gazlı, Kokulu pH 9.4 Nitrit Yok Amonyak Aşırı Miktarda Toplam Sertlik (ETDA ile) 30 FS°	Ca ⁺⁺ 120 Mg ⁺⁺ 180	Cl ⁻ 53

1.5. Kontrol Olarak Kullanılan Cinslerin Genel Özellikleri

1.5.1. *Bordetella* Cinsi

Küçük kokkobasildir, 0.2-0.5 μm çapında ve 0.5-2.0 μm uzunluğundadır. Gram negatiftir. İki türü hareketsizdir. Bir türü flagella ile hareket eder. Solunumları aerobiktir. Optimum sıcaklık 35-37°C'dir. Bordet-Gengoe besiyerinde koloniler düz, pürüzsüz, konveks, parlak ve hemen hemen saydam olup belirli bir çizgisi olmayan bir hemoliz zonu tarafından etrafı çevrilidir. Metabolizmaları solunumla olmaktadır ve hiçbir zaman fermentatif değildir. Organik nitrojene (amino asit), organik sülfüre (örneğin, sistein) ve nikotinamide gereksinimi vardır. Glutamik asit, prolin, alanin, aspartik asit ve serin, CO₂ ve amonyak üretiminde oksidatif olarak kullanılır. Memelilerde patojen ve parazittir. Solunum yollarının epitelial silialarında yerleşir ve çoğalır. Bu cins için DNA'daki G+C oranı %66-70 mol'dür. Tip tür, *Bordetella pertussis* 'tir (10).

1.5.2. *Bacillus* Cinsi

Hücreler çubuk şekillidir, düzdür. Endospor oluşturur. Endosporlar zor şartlara karşı çok dirençlidir. Gram pozitiftir. Ancak üremenin ilk safhasında gram pozitif veya gram negatif olabilir. Flagellaya sahiptir. Bazı türlerde bu yapı dejenere olmuştur. Aerobiktir veya fakültatif anaeroptur. Oksijen bazı türlerde alternatif olarak, terminal elektron alıcısı olarak kullanılır. Koloni morfolojisi ve büyüklüğü çok değişkendir. Pigment belirli besiyerinde üretilebilir. Fizyolojik özellikleri bakımından çeşitlilik gösterirler; psikrofilik veya termofilik, asidofilik veya alkalifilik olabilirler; bazı türler tuza toleranslıdır, bazıları da kesinlikle tuza ihtiyaç gösterirler. Çoğu türler katalaz üretir. Oksidaz pozitif veya negatif olabilir. Çoğu türlerin hücre duvarındaki peptidoglukan tabakası doğru çapraz bağlı meso-diaminopimelik asit tipine aittir. Fosfolipidler, yaygın olarak, fosfatidilgliserol ve fosfatidiletanolaminden oluşur. Çoğu türler doğada geniş olarak dağılmıştır. *B. anthracis*, bir insan ve hayvan patojenidir. *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus*'un belirli suşları böcek patojenidir. Diğer türler fırsatçı patojen olabilirler. Bu cins için DNA'daki G+C oranı %32-69 mol'dür. Tip tür, *Bacillus subtilis*'tir (11).

1.5.3. *Providencia* Cinsi

Basildir, 0.6-0.8x1.5-2.5 μm uzunluğundadır. Gram negatiftir. Peritriş flagella ile hareket eder. Fakültatif anaeroptur. Kemoorganotroftir. Hem solunum hem de fermentatif tip metabolizmaya sahiptir. Optimum sıcaklık 37°C'dir.

D-glukoz ve diğer karbohidratlar asit üretimiyle katabolize edilir. Bazı suşlar gaz üretir. Oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol pozitif, metil kırmızısı genellikle pozitif ve Voges-Proskauer negatiftir. Sitrat, bazı türlerde kullanılır. Lisin ve ornitin dekarboksilaz ve arjinin dihidrolaz testi negatiftir. Oksidatif olarak fenilalanin ve triptofan deamine edilir. H₂S üretilmez, üre hidroliz edilmez.

İnsan patojenidir. İnsan ishalleri dışkılarından, idrar yolu iltihabından, yaralardan ve yanıklardan izole edilir. Bu cins için DNA'daki G+C oranı %39-42 mol'dür (12).

1.6. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kriterler

1.6.1. 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 (13).

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 büyük gruba ayrılmaktadır. Gram boyamasına göre bakteri hücreleri gram pozitif ve gram negatif olmak üzere ayrılmaktadır. Bu özellik, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılan çok önemli ve gerekli olan bir özelliktir (7). 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*, *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 sporogenezis 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 (7).

1.6.2. Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

1.6.2.1. Bakterilerin Fiziksel İhtiyaçları

Bakterilerin sınıflandırılmasında, büyüdükleri ve 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 da yavaşlar ya da durur. Buna bağlı olarak, hücre büyümesi yavaşlar veya inhibe olur. Yüksek sıcaklıklar pıhtılaşmaya sebep olduğundan, sıcağa dayanıksız olan enzimler, dönüşümsüz olarak denatüre olurlar. Buna karşın enzimlerin sıcaklığa karşı duyarlılık dereceleri farklı farklıdır ve çoğunlukla gerekli olan enzimlerin 70°C'nin üzerinde bozuldukları bilinmektedir (13). Ancak, termofilik bakteriler sıcağa dayanıklı enzimler üretmeleri sebebiyle önemlidirler ve bilinen bazı *Bacillus* ve *Clostridium* türleri hem yüksek hem de düşük sıcaklıklarda yaşayabildiklerinden önemlidirler (14).

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 (7).

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 kullanılabilir şekle dönüştürülmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroplara, mikroaerofiller, zorunlu anaeroplara, aerotolerant anaeroplara ve fakültatif anaeroplara olarak gruplandırılmaktadırlar. Oksijenin varlığında solunum için gerekli olan enzimlerden yoksun olan anaerobik bakteriler anaerobik şartlarda solunum olayını meydana getirmektedir (7).

1.6.2.2. Bakterilerin Biyokimyasal Aktiviteleri

Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içinde hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteleri yerine getirmektedir. Bu olaylar, iki şekilde incelenmektedir (7).

1.6.2.2.1. Ekstraselüler Enzimler

Bu enzimler, hücre dışındaki substratlar üzerinde 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 (7).

1.6.2.2.2. İntraselüler Enzimler

Bu enzimler hücre içerisinde faaliyet gösteren enzimlerdir ve hücre için gerekli olan yeni protoplazmik ihtiyaçların sentezinden sorumludurlar. Bu enzimlerin diğer görevleri ise, hücre içine asimile olan materyallerden hücresel enerji elde edilmesidir. Enzimler yardımı ile meydana gelen değişim, hücrenin yaşaması ve fonksiyonu için gereklidir ve

hücrel 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 (7).

1.6.3. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Genetiksel Özellikler

Son yıllarda, mikroorganizmalar arasında benzerlik veya farklılıkları belirlerken, bunların oldukça yüzeysel ve değişken olan benzerliklerinden ziyade, genetik materyalleri, özellikle DNA'ları arasındaki homojenlik durumlarına dayanan daha esaslı ve tutarlı bir sınıflandırma yapılmaktadır. Bu tarz sınıflandırma bakterilerin nükleik asit analizlerini gerektirmekte ve bu işlem için de iki önemli yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan biri, DNA'lardaki baz sıralarının % olarak kompozisyonu ve diğeri de mikroorganizmalar arasında DNA-DNA veya DNA-RNA hibridizasyon oranlarıdır (2).

Sınıflandırma çalışmalarında genomik ilişkilerin kullanılması birçok fayda sağlamaktadır. Genomik akrabalıklara göre yapılan sınıflandırmanın sık sık veya radikal olarak meydana gelen değişikliklere konu olmaması, daha güvenilir bir teşhis olayının genetik akrabalıklara dayalı olan organizma sınıflandırması ardından yapılması, yapılan tür tayinlerinin daha kesin olmasını sağlamaktadır. Ayrıca, elde edilen bu verilere göre organizmada meydana gelen değişiklikler ve akrabalar arasındaki ilişkilerin nasıl olduğu da bu yolla daha iyi ortaya çıkarılmaktadır.

Nükleik asitler, aşağıda açıklanan bazı özellikleri ile sınıflandırma çalışmalarında kullanılmaktadırlar.

1.6.3.1. DNA Baz Kompozisyonu

Bakteri DNA'sı (deoksiribonükleik asit), iki sarmal biçimde polinükleotid iplikçiklerden oluşmakta ve bunların yapısında da pürin (adenin (A), guanin (G)) ve pirimidin (timin (T), sitozin (C)) bazları bulunmaktadır. Bir iplikçik üzerindeki pürin bazları, diğeri iplikçikteki pirimidin bazları ile karşılıklı olarak hidrojen bağları ile birleşmişlerdir. Adenin ile timin arasında iki hidrojen bağı olmasına karşın guanin ile sitozin arasında üç hidrojen bağı vardır. Böylece DNA'da pürin bazları ile pirimidin baz sayıları birbirlerine eşit olmuş olur (A=T ve G=C). Buna

pirimidin baz sayıları birbirlerine eşit olmuş olur ($A=T$ ve $G=C$). Buna göre, türlere göre değişmek üzere, $A+T$ ve $G+C$ molar oranları yüzdesi sabit kalmış olur. Guanin ile sitozin arasında üç bağın olması bu baz çiftini daha sağlam yaptığından genetik analizlerde $G+C$ 'nin yüzde (%) oranı esas alınır (2).

1.6.3.2. DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu

Çift zincirli DNA belli şartlar altında (yüksek sıcaklık ve 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 (4).

1.6.3.3. Nükleik Asit Hibridizasyonu

Nükleik asit hibridizasyonu ile de bakteriler arasındaki genetik ilişki (yakınlık veya uzaklık) saptanabilir. Bir bakterinin DNA suspansiyonu yavaş yavaş ısıtılırsa, bazlar arasındaki hidrojen bağları çözülür ve iki polinükleotid iplikçigi birbirinden ayrılır (DNA denatürasyonu). Eğer solüsyon yavaş yavaş soğutulursa bağlar karşılıklı olarak tekrar kurulur ve DNA orjinal çift iplikçikli formuna kavuşur (renatürasyon). Bu durumdan yararlanılarak DNA hibridizasyon testi yapılmaktadır (2).

1.6.3.4. 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 ark (18) 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 çoğalttılar (16). 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, Stackebrant ve Goebel (17) hibridizasyon çalışmalarında aynı cinse ait olan türlerin arasında 16S rRNA

dizisi açısından %97'den daha az benzerlik gösteren suşların farklı türler olduğunu ortaya koymuşlardır (18).

1.6.3.5. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması

Ekstrakromozomal elementler 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 (4).

1.6.4. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kemotaksonomik Özellikler

Daha az oranda spesifitesi olan ve bakterilerin kimyasal yapısını esas alan bu sınıflama, bakterilerde çok değişken olan yapısal özellikler nedeniyle genetik sınıflandırma kadar tutarlı bulunmamaktadır. Bakterilerin kimyasal yapıları her ne kadar genetik bir özellik gösterirse de, bunların yetiştiği veya ürediği besiyerinin kimyasal yapısı, osmotik basıncı, pH, vs. gibi çevresel koşullardan fazlaca etkilenmekte ve değişebilmektedir (2).

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.

1.6.4.1. Lipid Kompozisyonu

Bütün prokaryotlar arasında iki büyük lipid grubu bulunmaktadır. Arkebakteriler eter bağlı lipidleri ihtiva ederken öbakteriler ise ester bağlı açil lipidlere sahiptirler. Böylece eter bağlı lipidler yardımıyla arkebakteriler diğer bakterilerden ayrılmaktadır.

bulunmaktadırlar. Öbakteriler çok fazla sayıda değişik lipid içeriklerine sahiptirler ve lipid içeriklerinin sınıflandırmada kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (4).

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 üreme ortamının kompozisyonu, inkübasyon sıcaklığı, kültürün yaşı ve örneğin analizinde kullanılan tekniklere göre değişmektedir (4).

1.6.4.2. 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 (19) hücre ekstraktından yüzlerce proteini ayırabilme yeteneğindedir. Böylece bir türün suşları veya farklı türler arasındaki suşlar karşılaştırılır ve aralarındaki benzerlikler ortaya çıkarılmış olur. Böyle bir karşılaştırma Roberts ve arkadaşları (20) 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 ark (21), 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.

1.6.4.3. Sitokrom Özelliği

Sitokromlar, prokaryotik hücrelerde çeşitli redoks işlemlerinin meydana geldiği özelleşmiş hemoproteinlerdir. Farklı bakteri türlerinin sitokrom modellerinin karşılaştırılması spektrofotometrik yöntemlerle olmaktadır. Primer yapıların karşılaştırmasında ise kolaylıkla saflaştırılabilen sitokrom c'nin amino asit dizisi ve x-ışınları difraksiyonu kullanılmaktadır (4).

1.6.4.4. 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 (4).

1.6.4.5. 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 etmektedir. Bu olay sırasında farklı organizmaların enzim özellikleri incelenerek böyle çalışmalar yapılmaktadır (4).

1.6.4.6. 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 (22).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Besiyerleri ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar şunlardır: nutrient broth , nutrient agar, gelatine (Difco), bacteriological agar, tryptic soy broth, brain heart infusion broth , tryptic soy agar, trypton water, peptone, glucose, sodium chloride, potassium chloride, phenol red, ethilenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium molybdate, sulfanilic acid, diethyl α -naphthylamine, p-dimethylaminobenzaldehyde, crystal violet, ammonium oxalate, safranin, malachite green, tannic acid (Merck), yeast extract, starch, glycerol, L-tyrosine, urea, tris base, sodium dodecyl sulphate (SDS), potassium acetate, phenol:chloroform:isoamylalcohol, phenol, acrylamide, bis-acrylamide, agarose, xylene cyanole FF, brom phenol blue, coomassie brilliant blue-G 250, coomassie brilliant blue-R 250, ethidium bromide, bovine serum albumin (BSA), guanidium thiocyanate, sarcosyl, ammonium acetate, isoamylalcohol, pararosaniline acetate, pararosaniline hydrochloride (Sigma), diammonium hydrogen phosphate, trisodium citrate, methanol, acetone (Carlo Erba), belirtilen firmalardan temin edilmiştir. Kullanılan tuz bileşikleri %99 veya daha saftırlar.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Bacillus mycoides (DSM 299), *Bordetella bronchiseptica* (DSM 10303), *Bacillus polymyxa* (DSM 36), *Providencia rustigianii* (DSM 4541) ve *Bacillus circulans* (DSM11) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)'den temin edildi. *Bacillus mycoides*, çalışma alanından izole edilen 1 no'lu izolatın (MC1), *Bordetella bronchiseptica* 2 no'lu izolatın (MC2), *Bacillus polymyxa* 3 no'lu izolatın (MC3), *Providencia rustigianii* 4 no'lu izolatın (MC4), *Bacillus circulans* ise 5 no'lu izolatın (MC5) kontrol türleri olarak kullanıldı.

2.2. Metotlar

2.2.1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

2.2.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

Anaerobik agar: %2 triptikaz, %1 glukoz, %0,5 sodyum klorür, %0,15 agar, %0,2 sodyum tiyoglukolat, %0,1 sodyum formaldehit sulfoksilat 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 7,2'ye ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Fenilalanin agar: %0,3 maya ekstraktı, %0,2 DL-fenilalanin, %0,1 diamonyum hidrojen fosfat, %0,5 sodyum klorür, %1,2 agar 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 7,3'e ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Gliserol agar: 100 ml nutrient agar, %0,1 maya ekstraktı, 2 ml gliserol karıştırılarak otoklavda steril edildi.

İndol üretimi besiyeri: İndol üretiminin test edilmesi için %1'lik tripton sıvı besiyeri veya %1'lik triptikaz sıvı besiyeri kullanıldı. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

Karbohidrat fermentasyonu besiyeri: Bu besiyerinin hazırlanması için ilk olarak temel besiyeri hazırlandı. %0,1 diamonyum hidrojen fosfat, %0,02 potasyum klorür, %0,02 magnezyumsülfat, %0,02 maya ekstraktı, %1,5 agar 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 7,0'a ayarlanmadan önce %0,04 (w/v) oranında hazırlanan Bromcresol purple solüsyonundan 15 ml ilave edildi, otoklavlanarak steril edildi.

Fermentasyon özelliklerine bakılacak olan şekerler ise şöyle hazırlandı: Öncelikle her bir 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 yatık olarak hazırlandı.

Lizozimli nutrient sıvı besiyeri: Mililitresinde 10.000 ünite lizozim ihtiva eden bir solüsyon hazırlandı ve 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden geçirilerek steril edildi. Daha sonra 1 ml'lik steril lizozim solüsyonu 99 ml steril nutrient sıvı besiyeri ile karıştırılarak besiyeri hazırlandı.

Nişasta agar: %0,1'lik patates nişastası solüsyonu, 10 ml soğuk deiyonize suda çözüldü ve 100 ml nutrient agarla karıştırıldı, otoklavlanarak steril edildi.

Nitrat sıvı besiyeri: %0,5 pepton, %0,3 beef extract, %0,1 potasyum nitrat, 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7,0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

Nutrient agar: %0,5 pepton, %0,3 beef ekstrakt, %1,5 agar 1000 ml deiyonize suda çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada, ayrıca ticari olarak satılan nutrient agar da kullanıldı.

Nutrient sıvı besiyeri : %0,3 beef ekstrakt, %0,5 pepton 1000 ml deiyonize suda çözüldü ve pH'sı 6,8'e ayarlanarak kullanıldı. Otoklavda 121°C'de 20 dak bekletilerek steril edildi. Ayrıca, çalışmada ticari olarak satılan nutrient sıvı besiyeri de kullanıldı.

Nutrient jelatin: Ticari olarak satılan nutrient jelatinin %12'si 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 7,0'a ayarlanarak kullanıldı.

Sabouraud dextrose agar: %0,1 pepton, %4 dekstroz, %1,5 agar 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 5,6'ya ayarlandı, otoklavlanarak steril edildi.

Sabouraud dextrose sıvı besiyeri : %1 pepton, %2 dekstroz, %1,5 agar 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 5,6'ya ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Sitrat ve propionat kullanım besiyerleri: %0,1 trisodyum sitrat 2H₂O (veya %0,2 sodyum propionat), %0,12 magnezyum sülfat 7H₂O, %0,05 diamonyum hidrojen fosfat, %0,1 potasyum klorür, 40 ml eser element solüsyonu, %1,5 agar, 920 ml deiyonize su ve 20 ml %0,04'lük fenol red solüsyonu karıştırıldı, otoklavlanarak steril edilmeden önce pH'sı 6,8'e ayarlandı. Eser element solüsyonu şöyle hazırlandı: %0,005 etilendiamintetraasetat, %0,02 demir sülfat 7H₂O, %0,001 çinko sülfat, %0,0003 magnezyum klorür 4H₂O, %0,003 borik asit, %0,002 kobalt klorür 6H₂O, %0,0001 bakır klorür 2H₂O, %0,0002 nikel klorür 6H₂O, %0,0003 sodyum molipten 2H₂O, 1000 ml deiyonize suda çözümlenerek hazırlandı.

Tirozin agar: %0,5 L-tirozin, 10 ml deiyonize suda çözülüp otoklavlanarak steril edildikten sonra aseptik şartlar altında 100 ml steril nutrient agarla karıştırılarak petrilere dökülüp kullanıldı.

Üre hidrolizi besiyeri: %0,05 maya ekstraktı, %4,6 potasyum fosfat monobazik, %4,8 potasyum fosfat dibazik, %0,1 üre ve %0,0005 fenol red karışımına 117 ml deiyonize su ilave edildi. pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi.

Voges-Proskauer sıvı besiyeri: %0,7 g pepton, %0,5 glukoz, %0,5 sodyum klorür, 1000 ml deiyonize suda çözüldü, pH'sı 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 çözeltisinden ibarettir.

Jelatin hidrolizi ayıracı: Sodyum sülfat ile doyurulmuş 1 N sülfirik asit ayıraç olarak kullanıldı.

İyot çözeltisi: %0,3 iyot, %0,6 potasyum iyodür, 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat, 240 ml deiyonize su ile karıştırılarak hazırlandı.

İndol ayıracı: %0,5 p-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml izoamilalkol ve 25 ml konsantirik hidroklorik asit karıştırılarak yapıldı.

Lügol ayıracı: %0,3 iyot, %0,7 potasyum iyodür, 60 ml %5'lik sodyumbikarbonat, 240 ml deiyonize su ile karıştırılarak hazırlandı.

Katalaz ayıracı: Ayıraç olarak %10'luk hidrojen peroksit çözeltisi kullanıldı.

Kristal viyole boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon halinde hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı. A) %1 kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml deiyonize su ile karıştırıldı. B) %1 amonyum oksalat ve 400 ml saf su karıştırıldı. Bu her iki solüsyon hazırlandıktan sonra ikisi birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Nitrit ayıracı: Bu ayıraç ortamdaki nitratın nitrite indirgenip indirgenmediğinin ortaya çıkarılması için kullanıldı. Bu amaçla iki ayrı ayıraç kullanıldı. Ayıraçlardan birincisi 1N HCl solüsyonudur. Kullanılan diğer ayıraç ise şu şekilde hazırlandı. A) %0,8 sulfonilik asit ve 5 N asetik asit 1000 ml deiyonize suda çözüldü. B) 6 ml dimetil α -naftolamin, 5 N asetik asit 1000 ml deiyonize suda çözümlenerek hazırlandı.

Safranin: %0,4 safranin O, 100 ml %95'lik etanol ve 500 ml saf su karıştırılarak hazırlandı.

Spor boyası: %5 malaşit yeşili 100 ml saf suda çözüldü, süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Voges-Proskauer ayıracı: %40'luk NaOH çözeltisinin 3 ml'sine 0,5-1 mg keratin ilave edilerek hazırlandı.

2.2.2. Örneklerin Alınması ve Araştırılan Suyun Kantitatif Analizinin Yapılması

Araştırmanın yapıldığı alandaki su ve çamurlu su örnekleri ağız kapaklı steril şişelere alındı. Alınan örnekler, 24 saat içinde laboratuvara getirildi. Sudaki bakteri sayısını tespit etmek amacıyla 20 ml su 0.2 μm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtrelerden geçirildi (13). Hazırlanan filtreler nutrient agar üzerine alındı. Filtrelerden biri aerobik şartlarda diğeri "anaerobik jar"da 37°C'de 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 steryo 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 havada kurutulduktan sonra alevden geçirilmek suretiyle tespit edildiler. Tespit işleminden sonra lam üzerine kristal viyole boya solüsyonu ilave edildi, 3-4 dak beklendikten sonra, saf su ile yıkandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelendi.

2.2.4.2. Gram Boyama

Gram boyama bakterinin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama türüdür. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglukon tabakası incedir. Gram pozitif olarak boyanan

bakterilerde ise bu tabaka daha kalındır. Gram boyama şu şekilde yapıldı: Genç (24 saatlikten az) bakteri kültürlerinden bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı. Havada kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edildi. 10 sn kristal viyole ile boyandıktan sonra 10 sn lugol ile boyandı. Aseton-alkolle renk giderildikten sonra 10 sn safraninle boyandı, saf su ile yıkandıktan sonra havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Mor renkli olarak boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renkli olarak boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (13).

2.2.4.3. Spor Boyama

Endosporlar, bazı bakterilerin uygun olmayan hayat şartlarında oluşturdukları, çoğu dış etkiye karşı dayanıklı olan yapılardır. İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığı ve endosporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla genellikle yaşlı kültürler (48-72 saat) kullanıldı. Kültürler lam üzerine yayıldıktan ve havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Ardından kaynar su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edildi ve 5 dak böylece boyanması beklendikten sonra, saf su ile yıkandı. Üzerine safranin boyası ilave edildi ve 30-60 sn boyandıktan sonra saf su ile yıkandı, havada kurutularak mikroskop altında incelendi (13).

2.2.4.4. Hareket testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için lam-lamel arası preparat tekniği kullanıldı (13). 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 Üreme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların maksimum ve minimum üreme 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 üreme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (18).

İzolatların optimum üreme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient sıvı besiyeri içinde yapılan gece kültürlerinden OD₆₀₀=0,1 nm olacak şekilde yeniden nutrient sıvı besiyeri 'a ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 37°C'de belli bir süre sallayıcıda sallanarak üretildiler. Yapılan bu kültürlerden saat başı örnekler alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ nm'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak ürettiği sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (7).

2.2.5.2. İzolatların Üreyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

İzolatların üreyebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 9,5 ve 10) sahip nutrient sıvı besiyerine inoküle edildi ve optimum üreme sıcaklıklarında üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığı spektrofotometrede (OD₆₀₀ nm) ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. Böylece izolatların maksimum ve minimum olarak üreyebildiği pH değerleri ortaya çıkarıldı.

İzolatların hangi pH değerinde optimum olarak ürettiğinin ortaya çıkarılması için izolatların üreyebildiği pH değerine sahip olan nutrient sıvı besiyerlerine OD₆₀₀=0,1 nm olacak şekilde gece kültürlerinden aşılama yapıldı ve saat başı spektrofotometrede ölçümler yapılarak hangi pH değerinde optimum olarak ürettiği ortaya çıkarıldı (7). Ayrıca bakterilerin 5,7 pH'lı Soutbord Dextrose agar ve sıvı besiyerinde üreme özellikleri ve aynı zamanda pH'sı 6'dan düşük ve 7'den yüksek olan Voges-Proskauer sıvı besiyerinde üreme özellikleri incelendi (18).

2.2.5.3. İzolatların Sodyum Klorür İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların sodyum klorür ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla % 2; 5; 6; 7; 10; 11 ve 12 oranında sodyum klorür ihtiva eden nutrient sıvı besiyerleri hazırlandı. Bunun 4 ml'sine herbir izolattan ekim yapılarak, 7 ve 14 gün 37°C'de inkübasyondan sonra hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerinde üreme olmuş ise, o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı (18).

2.2.5.4. İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan Brain Heart Infusion agar besiyeri deney tüplerine dağıtıldı, steril edildikten sonra 37°C'ye kadar soğutuldu, tüplere herbir izolattan ekim yapıldı ve çevirilerek karıştırıldıktan sonra hemen soğuk suya daldırılarak donması sağlandı. Uygun sıcaklıkta bir gece inkübe edildikten sonra, tüp içerisinde üredikleri bölgeye bakılarak, izolatların oksijen ihtiyaçları hakkında karar verildi (7).

Ayrıca izolatların aerobik olarak mı yoksa tamamen anaerobik solunum yaparak mı yaşadıklarının ortaya çıkarılması için deneylerde özel olarak hazırlanan anaerobik agar besiyeri kullanıldı (18).

2.2.5.5. Nişasta Hidrolizi Testi

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin test edilmesi için hazırlanan nişasta agar petrilere, izolatlar, çizgi halinde ekilerek 3 ve 7 günlük uygun sıcaklıktaki etüvlerde inkübe edildi. Daha sonra petrideki bakterilerin üzerine %95'lik etanol ilave edildi. Oluşan renge göre izolatların nişastayı hidroliz edip etmedikleri hakkında karar verildi (18). Bu test, ayrıca olarak lugol kullanılarak da yapıldı. Petriler üzerine lugol ilave edildi ve koyu kahve rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (13).

2.2.5.6. Jelatin Hidrolizi Testi

Jelatinin izolatlar tarafından hidroliz edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan nutrient jelatin besiyeri, steril tüplere döküldü. İzolatlardan herbiri, bu tüplere ekildikten sonra, 37°C'de 3 gün inkübe edildi. Kültürler, üçüncü günün sonunda inkübe edildikleri etüvden alındı ve 20°C'ye ayarlanmış olan yeni bir etüve aktarıldılar. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı veya katı oluşuna göre testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi. 20°C'de besiyerinin sıvı olmaması bakterinin jelatini parçaladığını gösterdi (18).

2.2.5.7. Karbohidrat Fermentasyonu Testi

İzolatların karbohidratları fermente edip etmediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla karbohidrat fermentasyon besiyerleri yapıldı. Bu besiyerlere izolat tarafından kullanılıp kullanılmadığı öğrenilmek istenen glukoz ve pH indikatörü olarak da bir boya ilave edildi. Hazırlanan karbohidrat fermentasyon besiyerine herbir izolat ekilerek 7 gün uygun sıcaklığa ayarlanmış etüvde inkübe edildi. 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 gösterdi. Tüpteki besiyerinde meydana gelen kabarmalar ve çatlamlar organizmanın glukozdan gaz oluşturduğunu gösterdi (18).

2.2.5.8. Hidrojen Sülfür Üretim Testi

İzolatların hidrojen sülfür üretip üretmediğinin ortaya çıkarılması için Triple-Sugar Iron agar besiyeri kullanıldı. Herbir izolat, bu besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpün alt tarafında bir kararmanın olup olmadığına bakılarak, organizmanın hidrojen sülfür üretimi hakkında karara varıldı. Besiyerinin alt kısmında koyu rengin oluşumu hidrojen sülfürün üretildiğini gösterdi (7).

2.2.5.9. Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer sıvı besiyeri hazırlandı ve bu besiyerinin 4 ml'sine herbir izolattan ekim yapıldıktan sonra, 37°C'de 3 gün inkübe edildi. Daha sonra kültürlerin üzerine Voges-Proskauer ayırıcı ilave edildi. Tamamen karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sonuçta kültür yüzeyinde kırmızı rengin oluşup oluşmadığına bakılarak testin sonucu hakkında karar verildi (18).

2.2.5.10. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi

İzolatların sitrat veya propionatı kullanıp kullanmadığının ortaya çıkarılması amacıyla sitrat ve propionatı kullanım besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerlere herbir izolat ekildi, 3 ve 7 gün 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyerinde üreme ve renk değişikliği olup olmadığına bakıldı. Eğer mavi renge bir dönüş varsa organizmaların sitrat ve propionatı karbon kaynağı olarak kullandığına karar verildi (18).

2.2.5.11. Nitratı İndirgeme Testi

İzolatların nitratı indirgeyip indirgemediğinin ortaya çıkarılması için nitrat sıvı besiyeri hazırlandı ve bu besiyerinin 4 ml'sine herbir izolattan ekim yapıldı. Kültürler, 3 ve 7 gün 37°C'de inkübe edildi. Sonra üzerlerine nitrit ayırıcı ilave edilerek veya 1N HCl emdirilmiş kurutma kağıdına herbir izolatin kültüründen 1 damla damlatılarak oluşan rengin incelenmesi neticesinde testin sonucu ortaya çıkarıldı. Her iki ayıraç ilave edildiğinde de kahverengi renk oluşumu görüldüğünde testin pozitif olduğuna, aksi durumda ise negatif olduğuna karar verildi(18).

2.2.5.12. Katalaz Testi

İzolatların katalaz enzimini oluşturup oluşturmadığının ortaya çıkarılması için Tryptic Soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine inoküle edildikten sonra 24-48 saat 37°C'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra üzerine %10'luk H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna, aksi durumda ise negatif olduğuna karar verildi(18).

2.2.5.13. Oksidaz Testi

Oksidaz testi çizgi ekim metoduna (13) göre yapıldı. Bu testin yapılabilmesi amacıyla Tryptic Soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine ekildi. Uygun sıcaklıkta 24-48 saat bekletildikten sonra üzerine oksidaz testi ayıracağı ilave edildi, oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.2.5.14. İzolatların Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan herbir izolatanın gece kültürlerinden 100'er μ l alınarak daha önce hazırlanmış olan nutrient agar petrilere emdirildi. Daha sonra her bir petri üzerine ampisilin, kanamisin, streptomisin, tetrasiklin ve gentamisin ihtiva eden hazır disklerden ilave edilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra disk etrafında bir zon oluşup oluşmamasına bakılarak izolatların bu antibiyotiklere dirençli olup olmadığı ortaya çıkarıldı.

2.2.5.15. İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (Fenantren) Parçalama Özelliklerinin Belirlenmesi

Minerel Salt besiyeri (MSM, 23) ihtiva eden petrilere kürdan aracılığıyla nokta inokülasyonu yapıldı. Üzerine aseton içerisinde çözünmüş %1'lik fenantren solüsyonu püskürtüldü ve 37°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda nokta inokülasyonların etrafında şeffaf bölge oluşumunu görebilmek için gözlem yapıldı (24).

2.2.6. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.6.1. Genom DNA'larının %G+C İçeriklerinin Belirlenmesi

2.2.6.1.1. Genom DNA'larının İzolasyon Metodu

Hücreler 20-40 ml'lik uygun bir besiyeri içinde büyümenin geç veya durgun fazına kadar büyütüldü. Daha sonra hücreler santrifüj edildi ve 5,0 ml'lik NaCl-EDTA tuz solüsyonunda çözüldü. Ardından hücrelere 5,0 ml tuz solüsyonu daha ilave edildikten sonra 0,5 ml %20 SDS, 2,5 ml 5 M perklorat ve 0,15 ml proteinaz K eklenerek 60°C'de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra 5 ml fenol kloroform ilave edildi ve 20 dak sallayıcıda sallandı. Süspansiyon 17 000 g'de 10 dak santrifüj edildikten sonra üst faz ikinci bir tüpe transfer edildi ve 2 hacim soğuk %95'lik etanol eklenerek karıştırıldı. Karışım -20°C'de 1 saat bekletildi. Yukarıda belirtildiği gibi tekrar santrifüj edildi. Daha sonra etanol boşaltıldı ve tüpler ters çevrilerek kağıt havlu üzerinde birkaç dak bekletildi. Ardından dikkatli bir şekilde nükleik asit pelletine zarar vermeden 10 ml %80'lik etanol ilave edildi. %80'lik etanolün tüpün yüzeyi ile temas etmesini sağlayacak şekilde tüp sallandı ve -20°C'de 0.5-1 saat bekletildi. İlk işlemde yapıldığı gibi santrifüj edildi. Ardından etanol boşaltıldı ve tüpler kurumaya bırakıldı. Nükleik asitler, 2 ml TE tamponu içinde çözülerek üzerine 0,3 ml RNAz karışımı ilave edildi, karıştırıldı ve 37°C'de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra 0,5 ml kloroform izopentanol ilave edilerek iki veya üç kez vorteks üzerinde karıştırıldı ve 17 000 g'de 100 dak santrifüj edildi. Üst faz bir başka tüpe transfer edildikten sonra 3 M sodyum asetatın 0,2 ml ilave edilerek karıştırıldı. İki hacim %95'lik etanol ilave edildi ve tekrar karıştırıldı. Tüp -20°C'de 1 saat bekletildikten sonra 17 000 g'de 10 dak santrifüj edildi. Pellet yukarıda belirtildiği gibi %80 'lik etanol ile yıkanarak havada kurutuldu. Pelleti 1,0 ml TE'de çözdükten sonra solusyon içindeki DNA'ya 1,0 ml TE-1,0 M NaCl ilave edildi (25).

2.2.6.1.2. %G+C Oranının Belirlenmesi

%G+C içereklere belirlenecek olan genom DNA'ları izole edildikten sonra konsantrasyonları 20 µg/ml olacak şekilde 0.5x SSC ile sulandırıldı. Daha sonra sulandırılan bu DNA örnekleri bir diyaliz tüpü içinde 0.5xSSC'ye karşı 24 saat diyaliz edilerek temizlendi.

Temizlenen DNA örnekleri spektrofotometrenin quarz küvetine konuldu ve ısı ayarlı JENWAY 6105 U.V./ Vis. spektrofotometresinde ilk olarak 25°C'de 260 nm'de absorbansı ölçüldü. Daha sonra sıcaklık 50°C'ye çıkarıldı ve daha sonraki bütün sıcaklıklarda 10 dak bekletilerek tam olarak DNA zincirlerinin ayrılması sağlandı. Absorbansta önemli bir derece artış olan sıcaklığa kadar spektrofotometrenin sıcaklığı 10'ar derece artırıldı. Absorbanstaki fazla artışın olmaya başladığı sıcaklıktan itibaren ısı 1 veya 2 derece artırılarak DNA zincirlerinin tam olarak ayrılması sağlandı. DNA zincirleri tam olarak ayrılmaya başladığı andan itibaren absorbans sabit kaldı ve böylece DNA'nın tam olarak denatüre olduğu sıcaklık bulundu.

Elde edilen bu sıcaklık değerlerine karşı olan absorbanlar A_T / A_{25} formülü kullanılarak 25°C'deki absorban değerine bölündü ve çıkan sonuçlar ile elde edildiği sıcaklık değerleri arasında bir grafik oluşturuldu. Bu grafiğin orta noktasındaki değer T_m olarak adlandırıldı. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak bakterilerin T_m 'e bağlı olarak %G+C içerikleri belirlendi (25).

$$GC = (T_m - 69,3) \times 2,44$$

2.2.6.2. Plazmit DNA'larının İzolasyonu

İzolatların plazmit içerikleri Voskuil ve Chambliss'ın (26) geliştirdiği metoda göre ortaya çıkarıldı. Herbir bakteriden 5-10 ml olarak hazırlanan gece kültürleri 10.000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve çökelek 200 ml SET tamponunda (%25 sakkaroz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) vortekslenerek çözüldü. Kullanılan SET tamponunun 1 ml'sine 5 mg lizozim ilave edildi. Daha sonra, karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 10 dak inkübe edildi. Bunun üzerine 350 ml 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 ml soğuk 3 M K^+ -5 M asetat solüsyonundan ilave edildi. Süspansiyon, mikrosantrifüjün en yüksek hızında, 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Alınan bu sıvı kısma, 650 ml soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) karışımından ilave edildi ve 1 dak vortekslendi. Karışım daha sonra 5 dak mikrosantrifüjde santrifüj edildi. Üst faz alındı ve buna 620 ml soğuk kloroform:izoamilalkol karışımından ilave edildi. Karışım 30 sn vortekslendikten sonra mikrosantrifüjde 3 dak santrifüj edildi. 550 μ l'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 dak santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü ve izopropanol açık havada uçurulduktan sonra çökelek kısmı %70'lik etanol ilave edilerek 2 dak santrifüjlendi, kalan etanol havada uçurulduktan sonra 50 ml deiyonize suda çözüldü.

Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, plazmit DNA'larının izole edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması için 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren %0,7'lik agaroz jel hazırlandı. DNA solüsyonunun

5 ml'si, 1 ml 10X elektroforez boyası ve 4 ml deiyonize su veya TE tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan herbir kuyucuğa yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment ağırlıkları belli olan moleküler ağırlık standartı ile elektroforez edildi. Elektroforez neticesinde, plazmit DNA'larının var olup olmadıkları ve moleküler ağırlıkları tespit edildi.

2.2.6.3. Plazmit Transformasyonu

E.coli JM101 stok kültüründen bir öze yardımıyla tek bir koloni alınıp 2 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de çalkalanan sulu çalkalayıcıda 12-16 saat üretildi. Hücre kültüründen, 30 ml LB'ye, OD₆₀₀=0,1 nm olacak şekilde taze kültür aşılandı ve OD₆₀₀=0,45-0,50 oluncaya kadar sulu sallayıcıda 200 rpm'de üretildi. İstenen yoğunluğa ulaşan hücreler kompetant hücre hazırlamak için kullanıldı. İlk önce, bu hücreler buz üzerinde 10 dak bekletildi ve 30 ml solusyon 2000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi ve sıvı kısım atıldı. Pellete (çökelek) 10 ml, 100 mM'luk soğuk ve steril CaCl₂ ilave edilip, pellet nazikçe sallanarak homojen hale getirildi ve 30 dak buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 2000 rpm'de 15 dak santrifüj edilip sıvı kısım atıldı ve tekrar pellet üzerine soğuk ve steril 100 mM CaCl₂'den 2 ml ilave edildi (27). Elde edilen hücreler taze olarak kullanıldı.

Transformasyondan önce *E.coli* JM101 kompetant hücreleri yukarıda anlatıldığı biçimde hazırlandı. Transformasyon için MC'ten izole edilen plazmit DNA'sı kullanıldı. Biri kontrol için olmak üzere 3 tüp hazırlandı. Kontrol tüpe sadece 200 µl kompetant hücre, diğer tüplere ise 200 µl kompetant hücre ve plazmitten elde edilen 1'er µl plazmit DNA'sı konuldu.

Hazırlanan bu tüpler sırasıyla 4°C'de 30 dak ve 45°C'de 2 dak bekletildi. Üzerlerine 0,8 ml LB sıvı besiyeri ilave edilerek 30°C'de 1 saat yavaşça sallanarak, antibiyotiğe direnç kazanmaları için inkübe edildi. Kültürler 50 µg/ml ampisilin ihtiva eden agar üzerine bagetle yayıldı ve petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona alınarak, plazmit ihtiva eden hücrelerin üremeleri sağlandı.

İnkübasyon sonucu oluşan kolonilerden bazıları kürdanla alınarak ampisilin ihtiva eden 2 ml LB sıvı besiyerine ekildi ve bir gece büyümeye bırakıldı ve bunlardan plazmit izolasyonları gerçekleştirildi.

2.2.6.4. PCR Yöntemiyle 16S rRNA Analizi

Elde edilen izolatların ve kontrol olarak kullanılan *B. mycoides*, *B. bronchiseptica*, *B. polymyxa*, *P. rustigianii* ve *B. circulans*'in genomik DNA'larının izolasyonları 2.2.6.1.1'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'ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) sırasına sahip "revers" primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Kullanılan forward primeri, *E.coli* 16S rRNA geninin 11-26. pozisyonlarına göre düzenlenmişken, revers primeri ise yine bu genin 1411-1393. pozisyonlarına göre düzenlenmiştir (28).

PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve ark (29)'na göre oluşturuldu: 12 ng kalıp DNA, 5 ml 10XPCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH8,3 (oda sıcaklığında); 500 mM KCl; (solusyon otaklavlandı)), 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 deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 500 ml'lik tüplerde Techne Progene Fuse 230U TZA Thermal Cycler'da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri şu şekilde ayarlandı: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dak olarak gerçekleştirildikten, sonra 36 döngü 94°C'de 1 dak (denatürasyon için), 56°C'de 1 dak (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dak (uzatma için) bekletilerek gerçekleştirildi.

Elde edilen PCR ürünleri %1,3'lük agaroz jelde elektroforez edildi ve etidyum bromür boyası (0,5 mg/ml) ile boyandıktan sonra Polaroid DS34 Hoefer's photoman fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

2.2.6.5. 16S rDNA'nın Restriksiyon Fragmenti Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

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

Kesilen örnekler ve moleküler ağırlık standartı, %2,5'lik agaroz jelde 10 V/cm'lik elektrik alanında 70 dak elektroforez edildi, etidyum

bromür ile boyandı ve jel Polaroid DS34 Hoefer's photoman fotoğraf makinesi ile 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 kontrol olarak kullanılan türlerden 10 ml'lik gece kültürleri yapıldı. Hücreler, 14.000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. Çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ve %10 sukrozdan oluşan TS'de çözülüp -194°C'de 1 dak 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 dak buz üzerinde bekletildikten sonra, 30 dak 16.000xg'de santrifüj edildi. Protein özütünü ihtiva eden sıvı kısım, -20°C'de saklandı.

2.2.7.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonu, Bradford metodu (30) 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. Örnekler ölçüm için hazırlandıktan sonra iyice karıştırıldı ve 2 ile 60 dak arasında değerleri okundu. Standart konsantrasyon eğrisi, farklı miktarda BSA içeren örneklerin ölçülmesiyle elde edildi. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinenlerin verdiği absorbans değerinin, standart eğrisi üzerine çakıştırılması ile bulundu. Bulunan bu değerlerden faydalanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.2.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Miktarları tayin edilmiş olan *B. mycoides*, *B. bronchiseptica*, *B. polymyxa*, *P. rustigianii*, *B. circulans*, 5 adet izolat (MC1, MC2, MC3, MC4, MC5) ile standart protein özütlerinden uygun miktarlarda (50 mg) alındı. Bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl

pH 6,8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6 β -merkaptolanol) ilave edildikten sonra, örnekler 65°C'de 90 sn bekletildi ve Laemmli (37) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 0,75 mm kalınlığındaki herbir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, jel CBB (%0,125 CBB 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. En iyi jeller seçilerek iki selofan yaprak arasına alındı ve 80°C'de 2 saat vakumlu jel kurutucuda kurutulurken, daimi olarak saklanabilecek hale getirildi.



3. BULGULAR

Bu çalışmada Muş'un Çukurbağ Köyü'nden alınan gazlı sondaj suyundan bakteri izole edilerek, bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı. Ayrıca suyun mililitresindeki bakteri sayısı, membran filtresi yöntemiyle belirlendi.

Çalışma ortamından alınan 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. Suyun Kantitatif Analizi

Sudaki toplam bakteri konsantrasyonu 20 ml suyun filtre edilmesi sonucunda hazırlanan filtrelerde nutrient agar üzerinde oluşturdukları koloni sayısı 2480 olarak belirlendi. Buna göre, suyun mililitresindeki bakteri sayısının 124 bakteri/ml olduğu bulundu.

3.2. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri

İzolatların çeşitli boyama ve morfolojik özellikleri Tablo 3'de görülmektedir. Kontrol olarak kullanılan türlerin boyama ve morfolojik özellikleri ise Tablo 4'de verilmiştir. İlk olarak yapılan basit boyamalar neticesinde MC2'nin kok, MC1, MC3, MC4 ve MC5'in ise basil morfolojisine sahip, tek veya uzun zincirler oluşturan basiller oldukları görüldü. İzolatların hayatlarının erken safhalarında ve daha sonra yapılan Gram boyamaları sonucunda, MC1, MC3 ve MC5'in gram pozitif, MC2 ve MC4'ün gram negatif olarak boyandıkları tespit edildi.

İzolatların, endospor yapılarını meydana getirip getirmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla yapılan spor boyamalar neticesinde, MC1, MC3 ve MC5'in endosporlara sahip oldukları, MC2 ve MC4'ün ise endosporlara sahip olmadıkları gözlemlendi.

Yapılan hareket testi sonucunda, bütün izolatların hareket edebilme yeteneğine sahip oldukları gözlemlendi.

Tablo 3: İzolatların morfolojik ve üreme özellikleri.

Özellikler	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5
Morfoloji	Basil	Kok	Basil	Basil	Basil
Petrideki koloni rengi ve görüntüsü	Krem, düzgün yuvarlak	Turuncu, düzgün, yuv.	Krem, dalgali	Krem, düzgün yuvarlak	Krem, düzgün yuvarlak
İzolatların O ₂ ihtiyaçları	Fakültatif anaerobik	Aerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik
Gram Boyama	+	-	+	-	+
Spor Boyama	+	-	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	+

+ = var, - = yok

Tablo 4: Kontrol türlerin morfolojik ve üreme özellikleri

Özellikler	B.m	B.b	B.p	P.r	B.c
Morfoloji	Basil	Kokkobasil	Basil	Basil	Basil
Petrideki koloni rengi ve görüntüsü	Krem, düzgün yuvarlak	Krem, düzgün yuvarlak	Krem, düzgün yuvarlak	Krem, düzgün yuvarlak	Krem, düzgün yuvarlak
İzolatların O ₂ ihtiyaçları	Fakültatif anaerobik	Aerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik
Gram Boyama	+	-	+	-	+
Spor Boyama	+	-	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	+

B.m; *B. mycoides*, B.b; *B. bronchiseptica*, B.p; *B. polymyxa*

P.r; *P. rustigianii*, B.c; *B. circulans*, + = var, - = yok

3.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların ve kontrol olarak kullanılan türlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri sırasıyla Tablo 5 ve 6'da görülmektedir. Mikroorganizmaların üremesi üzerinde etkili faktörlerden olan sıcaklık, pH, NaCl'ye karşı tolerans ve atmosferik oksijen ihtiyaçları gibi fiziksel etkilerin araştırılması amacıyla testler yapıldı. Yapılan testler sonucunda bütün izolatların optimum olarak 37°C'de üreyebildiği ve minimum-maksimum üreme sıcaklıklarının 20-40°C olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5 ve 6'da da görüldüğü gibi, bütün izolatların optimum olarak pH 6-9 arası olan besiyerlerde üreyebildiği tespit edilmiştir.

İzolatların belli oranlarda sodyum klorür içeren besiyerlerinde üreyebilme özelliklerinin, yani sodyum klorüre karşı tolerans sınırının araştırılması sonucunda MC1'in %5'e kadar sodyum klorüre tolerans gösterdiği, MC2'nin %10, MC3'ün %8, MC4'ün %6 ve MC5'in %1'e kadar sodyum klorür içeren besiyerlerinde üreyebildikleri gözlemlendi.

İzolatların atmosferik oksijene olan ihtiyaçları incelendiğinde, MC2'nin sadece aerobik ortamda üreyebildiği, diğer izolatların ise fakültatif anaerob oldukları yani hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda üreyebildikleri gözlemlendi.

Bakteri tür tayininde kullanılan kriterlerden birisi de bazı organik maddeleri hidroliz etme özellikleridir. Tablo 5 ve 6'da da görüldüğü gibi yapılan testler sonucunda bütün izolatların nişastayı hidroliz ettiği gözlemlenmiştir. Yine yapılan testler sonucunda MC1 ve MC3'ün jelatini hidroliz edebildikleri ancak MC2, MC4 ve MC5'in jelatini hidroliz edemedikleri gözlemlenmiştir. Üre hidrolizi testi sonucunda ise MC3'ün üreyi hidroliz edebildiği, buna karşın diğer izolatların üreyi hidroliz edemedikleri gözlemlenmiştir.

İzolatların bazı enzim ve kimyasal maddeleri üretilip üretilmediği incelendi. Sonuç olarak, MC1'in katalaz ve oksidaz enzimini ürettiği, MC2, MC3, MC4 ve MC5'in ise katalaz enzimini üretmelerine karşın oksidaz enzimini üretmedikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca bütün izolatların H₂S gazını üretmedikleri gözlemlendi.

Organizmaların sitrat ve propionatı kullanımları ve nitratı indirgeme özellikleri, sınıflandırmada kullanılan diğer özelliklerden birkaçıdır. Tablo 5 ve 6'da da görüldüğü gibi yapılan incelemeler sonucunda, MC5'in sitratı kullanmada değişken olduğu, diğer izolatların ise sitratı kullanmadıkları gözlemlenmiştir. Yapılan testler sonucunda, yalnızca MC4'ün propionatı kullandığı, diğerlerinin ise propionatı kullanmadıkları ve bütün izolatların nitratı indirgeme özelliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

İzolatların glukozu fermente etme özellikleri de test edildi. Yapılan deneyler sonucunda bütün izolatların glukozu fermente ettikleri ancak gaz oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

İzolatların antibiyotik dirençliliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda; MC1'in ampisiline karşı dirençli, kanamisin streptomisin, tetrasiklin ve gentamisin'e karşı duyarlı olduğu, MC2, MC3 ve MC5'in test edilen antibiyotiklerin hepsine karşı duyarlı oldukları, MC4'ün ise ampisilin ve streptomisine karşı dirençli, diğerlerine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 5: İzolatların ve kontrol türlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Özellikler	B.m	MC1	B. b	MC2	B.p	MC3
Nitrat ind.	+	+	+	+	+	+
Katalaz testi	+	+	+	+	+	+
Indol testi	-	-	Z	-	-	-
V.P. testi	+	+	Z	-	+	+
H ₂ S üretimi	B	-	B	-	B	-
%2 NaCl ür.	Z	-	B	+	B	Z
%5 NaCl ür.	Z	+	Z	+	-	-
%6 NaCl ür.	B	-	+	+	-	-
%7 NaCl ür.	B	-	+	+	-	-
%10 NaCl ür.	Z	-	+	+	-	-
%11 NaCl ür.	Z	-	-	-	-	-
%12 NaCl ür.	Z	-	-	-	-	-
5°C ür.	-	-	-	-	Z	-
10°C ür.	B	+	-	-	+	Z
30°C ür.	+	+	+	+	+	+
40°C ür.	Z	-	-	-	+	Z
50°C ür.	-	-	-	-	-	-
Jelatin hid.	+	+	B	-	+	+
Ure hid.	B	-	+	-	B	+
Sitrat kul.	Z	-	B	-	-	-
Propionat kul.	B	-	B	-	B	-
5,7 pH'da ür.	+	+	+	+	+	+
Glukoz fer.	+	+	B	Z	+	+
Opt. pH.	5-8	6-8	6-8	6-8	5-8	6-8
Opt. ısı (°C)	30-35	30-37	30-37	30-37	30-37	30-37
Anaerobik ür.	+	+	-	-	+	+
Pseudomonas agarda ür.	-	B	-	B	-	B
Fenantren parçalama öz.	-	B	-	B	-	B
Glukozdan gaz oluşturma	-	-	-	-	-	-

Z; Zayıf büyüme, B: Belirlenmedi, +=var, -=yok
 B.m; *B. mycoides*, B.b; *B. bronchiseptica*, B.p; *B. polymyxa*

Tablo 6: İzolatların ve kontrol türlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Özellikler	P.r	MC4	B.c	MC5
Nitrat ind.	+	+	Z	+
Katalaz testi	+	+	+	+
Oksidaz testi	-	-	-	-
İndol testi	+	+	-	-
V.P. testi	-	-	-	-
H ₂ S üretimi	B	-	B	-
%2 NaCl ür.	B	+	B	+
%5 NaCl ür.	B	+	Z	-
%6 NaCl ür.	B	-	Z	-
%7 NaCl ür.	B	-	Z	-
%10 NaCl ür.	B	-	-	-
%11 NaCl ür.	B	-	-	-
%12 NaCl ür.	B	-	-	-
5°C ür.	-	-	-	-
10°C ür.	B	-	Z	-
30°C ür.	+	+	+	+
40°C ür.	Z	-	+	+
50°C ür.	-	-	-	-
Jelatin hid.	-	-	-	-
Ure hid.	-	-	B	-
Niştasta hid.	B	+	+	+
Sitrat kul.	Z	-	Z	Z
Propionat kul.	B	+	B	-
5,7 pH'da ür.	+	+	+	+
Glukoz fer.	+	+	+	+
Opt. pH	6-8	6-8	5-8	6-8
Opt. ısı (°C)	30-37	30-37	30-37	30-37
Anaerobik ür.	+	+	+	+
Pseudomonas agarda ür.	B	-	B	-
Fenantren parçalama öz.	B	-	B	-
Glukozdan gaz oluşturma	-	-	-	-

Z; Zayıf büyüme, B: Belirlenmedi, +=var, -=yok
P.r; *P. rustigianii*, B.c; *B. circulans*

Tablo 7: İzolatların antibiyotiklere olan dirençlilikleri

Antibiyotikler	İzolatlar				
	MC1	MC 2	MC3	MC4	MC 5
Ampisilin	D	H	H	D	H
Kanamisin	H	H	H	H	H
Streptomisin	H	H	H	D	H
Tetrasiklin	H	H	H	H	H
Gentamisin	H	H	H	H	H

D; dirençli, H; hassas

3.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri

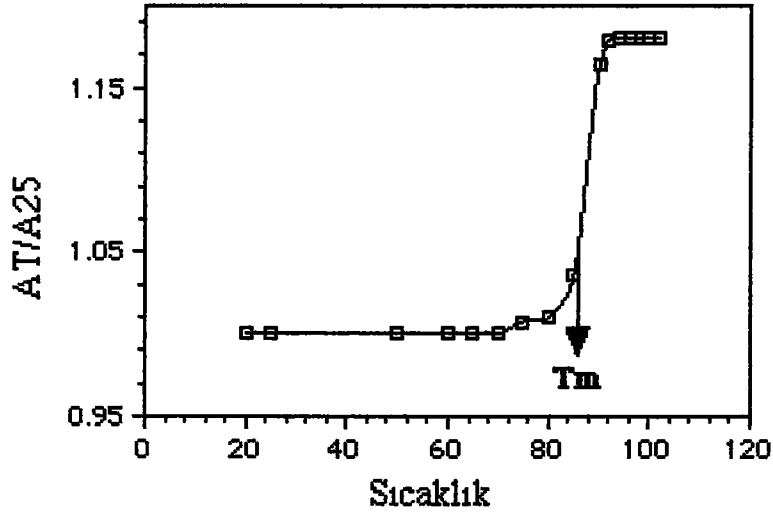
Yapılan %G+C içeriği analizi sonucunda, Tablo 8'de görüldüğü gibi, elde edilen izolatların %G+C içerikleri 43.7 ve 70.0 (Tm) arasında değişmektedir.

İzolatların Tm değerleri ve buna bağlı olarak hesaplanan %G+C değerleri şu şekildedir: MC1'in Tm değeri 86 ve %G+C içeriği 43.7 (Tm) (Şekil 3), MC2'nin Tm değeri 98 ve %G+C içeriği 70.0 (Tm) (Şekil 4), MC3'ün Tm değeri 88 ve %G+C içeriği 45.6 (Tm) (Şekil 5), MC4'ün Tm değeri 89 ve %G+C içeriği 48.9 (Tm) (Şekil 6) ve MC5'in Tm değeri 97 ve %G+C içeriği ise 67.5 (Tm) (Şekil 7)'dir.

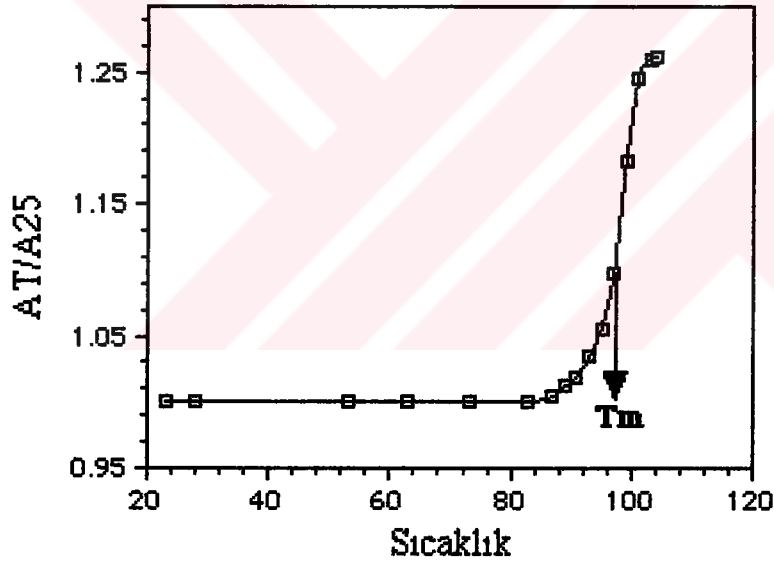
Tablo 8: İzolatların ve kontrol türlerin %G+C içerikleri

Çalışmada Kullanılan Kontrol Türler ve İzolatlar										
	B.m	MC1	B.b	MC2	B.p	MC3	P.r	MC4	B.c	MC5
%GC	32-39	43	66-70	70	41-51	45	39-42	48	31-61	67

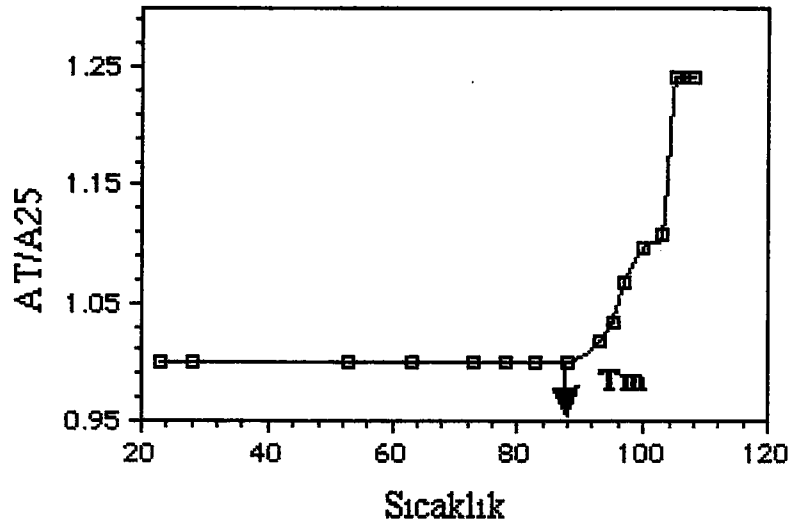
B.m; *B. mycoides* , B.b; *B. bronchiseptica*, B.p; *B. polymyxa*
P.r; *P. rustigianii*, B.c; *B. circulans*



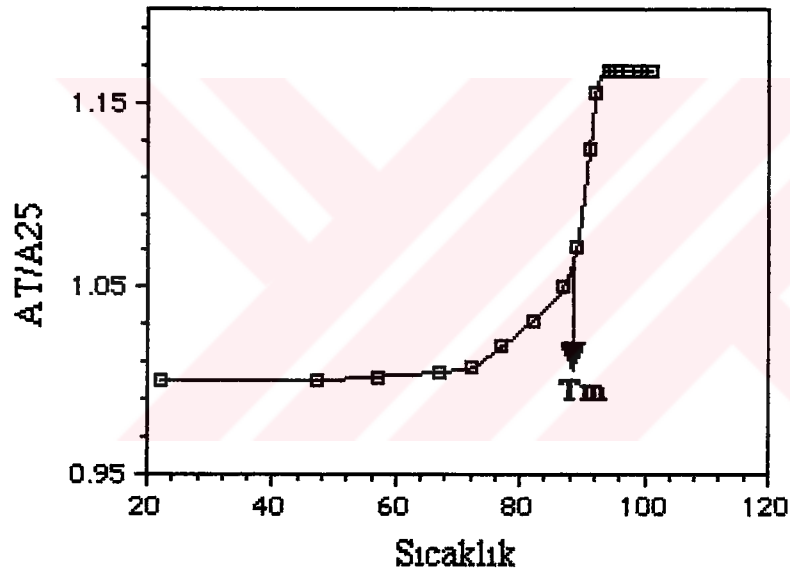
Şekil 3: MC1'in T_m değeri



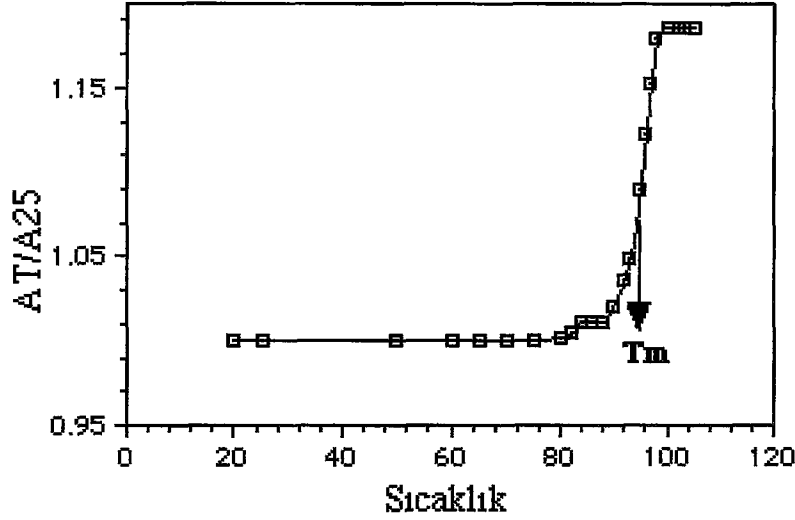
Şekil 4: MC2'nin T_m değeri



Şekil 5: MC3'ün Tm değeri



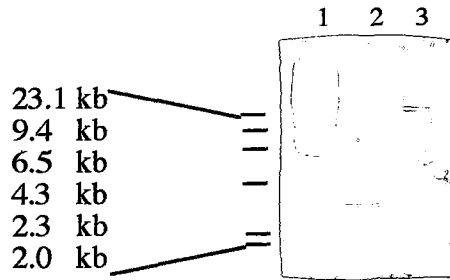
Şekil 6: MC4'ün Tm değeri



Şekil 7: MC5'in Tm değeri

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

Şekil 8'de görüldüğü gibi plazmit DNA'sı izolasyonu sonucunda, MC4'ün halka halinde yaklaşık 4500 bp ağırlığında bir plazmide sahip olduğu görülmektedir. Diğer izolatların ise hiçbir plazmide sahip olmadıkları gözlenmiştir.

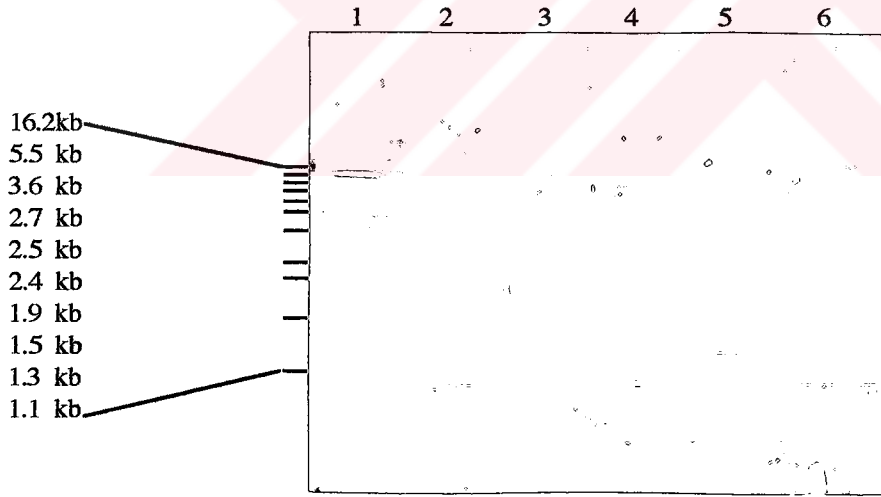


Şekil 8: MC4'ten saflaştırılan plazmit DNA'sının %0,7'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1; moleküler ağırlık standartı, 2; MC4'ten elde edilen plazmit, 3; MC4'ten elde edilen plazmit (*Pst* I ile kesilmiş)

EcoRI ve *PstI* restriksiyon enzimleriyle yapılan restriksiyon analizinde, MC4'ten elde edilen plazmidin bir bölgeden bu enzimler yardımıyla kesildiği ve moleküler ağırlığının yaklaşık 4500 bp olduğu gözlenmiştir.

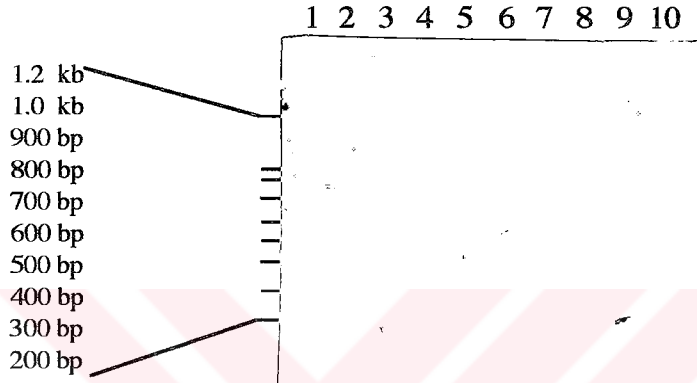
İzole edilen plazmit daha önceden hazırlanan *E.coli*'nin JM101 suşunun kompetent hücrelerine aktarıldı. Daha sonra kompetent hücre ve plazmit karışımı ampisilin içeren LB petrilere emdirildi. Bir gecelik inkübasyon sonucunda petri üzerinde ampisiline dirençli olan hücrelerin büyüdüğü görüldü. Böylece plazmit *E.coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu bakteride de replike olabildiği gözlemlendi.

İzolatların 16S rRNA genlerinin, PCR ile çoğaltılması ile 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 yaklaşık 1400 bp olduğu, elde edilen izolatlar ile yapılan sistematik çalışması sonucunda bunlarla aynı tür olduğu düşünülen *B. mycoides*, *B. bronchiseptica*, *B. polymyxa*, *P. rustigianii* ve *B. circulans* bakterilerinin hepsinin de yaklaşık 1400 bp civarında olduğu tespit edildi.



Şekil 9: İzolatlardan saflaştırılan genom DNA'sından PCR yöntemiyle çoğaltılan 16S rRNA geninin %1,3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. 1; moleküler ağırlık standartı, 2; MC1, 3; MC2, 4; MC3, 5; MC4, 6; MC5

Elde edilen 16SrRNA genlerinin *Hin*fI ile yapılan restriksiyon analizinde Şekil 10'da da görüldüğü gibi %2.5'lik agaroz jelde MC2 yaklaşık 600,350 ve 300 bp'lik 3 bant oluştururken, MC3, MC4 ve MC5 ise yaklaşık 700,300 ve 350 bp'lik 3 bant oluşturmaktadırlar. *Hin*fI ile yapılan restriksiyon analizinde, *B. bronchiseptica*, *B. polymyxa*, *P. rustigianii* bakterilerinin, eşleştirildikleri izolatlarla aynı polimorfizme sahip oldukları, *B. circulans*'ın ise eşleştirildiği izolattan biraz daha farklı polimorfizme sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil10: İzolatlardan ve kontrol türlerden PCR ile elde edilen 16S rRNA geninin *Hin*fI enzimi ile RFLP'sinin %2,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1; moleküler ağırlık standartı, 2; MC2'nin 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 3; MC3'ün 16 S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 4; *B. bronchiseptica*'nın 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 5; *B. polymyxa*'nın 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 6; MC4'ün 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 7; MC5'in 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 8; *P. rustigianii*'nin 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 9; *B. circulans*'ın 16S rRNA geninin *Hin*fI ile kesilmiş hali, 10; 16 S rRNA geni

3.5. İzolatların Total Protein Profili

Elde edilen 5 izolattan ve standart olarak kullanılan türlerden izole edilen çözünebilir proteinler, her kuyuya 50 μ g olacak şekilde %12'lik SDS-PAGE jeline yüklendi. Proteinlerin 15 mA'lık elektrik akımında yürütülmesi sonucunda, Şekil 11 ve 12'de de görüldüğü gibi izolatların, kontrol olarak kullanılan türlere benzer oldukları gözlemlendi.



Şekil 11: MC1 ve kontrol olarak kullanılan *B. mycoides*'ten saflaştırılan çözünebilir total hücre proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'den analizi. 1; MC1, 2; *B. mycoides*, 3; moleküler ağırlık standartı

Jelde elde edilen bantların birbirlerine benzerliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla aşağıda belirtilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre, türler arasındaki çeşitlilik (değişkenlik), benzerlik "S" olarak ifade edilerek;

$$S=2xN_{AB}/ N_A+N_B$$

formülüne göre hesaplama yapıldı. N_{AB} , A ve B türlerindeki ortak bantların toplamını, N_A ve N_B ise A ve B türlerindeki bantların herbirinin ayrı ayrı olarak toplamını ifade etmektedir. Jeldeki bantlardan sadece güçlü olanlar, net olarak görünürler var olarak sayıldı. Benzerlik ölçüsü, iki türde ortak olan yani paylaşılan bantlar olarak da ifade edilebilir (31).

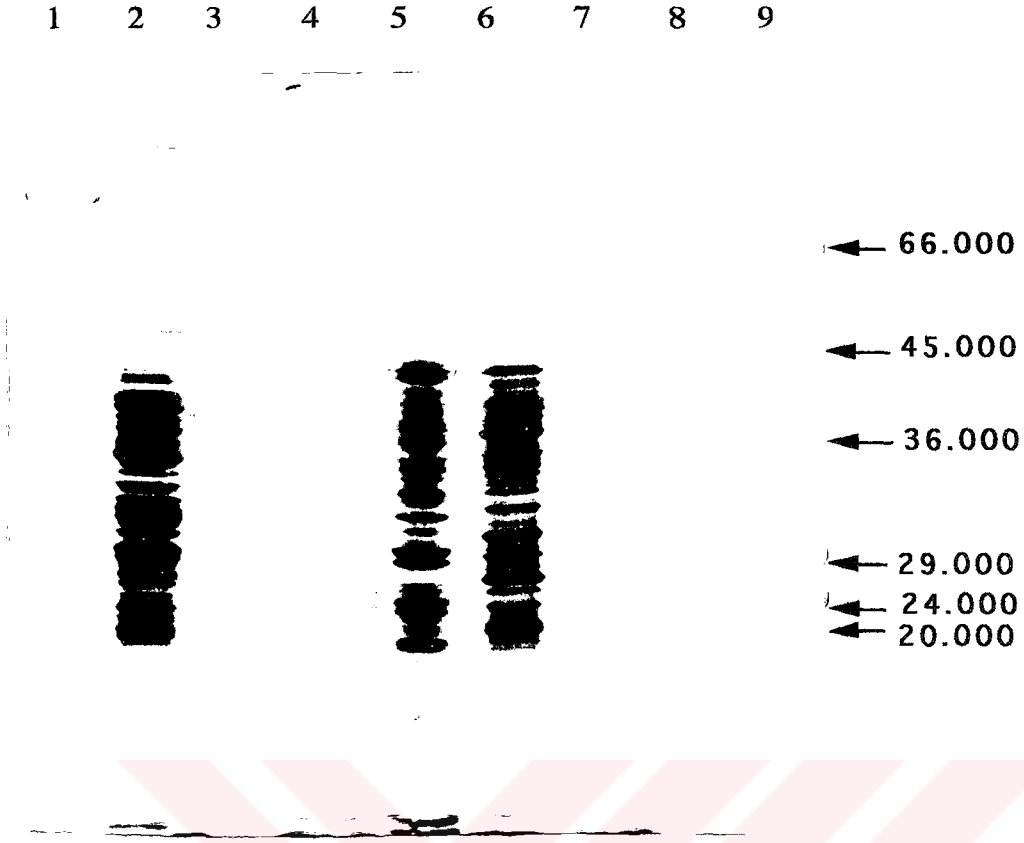
İki tür arasındaki genetik farklılık (D) ise;

$$D=1-S$$

formülüne göre hesaplandı. Genetik farklılıkları belirlemek için, incelenen bütün türler arasında pairwise (çiftler yoluyla) karşılaştırma yapan bilgisayar programı kullanılarak ortak bantların analizi yapıldı.

Genetik farklılık derecesi 0 (aynı,özdeş)'dan 100 (incelenen bütün kriterlerde farklı)'e doğru belirlenir. Buna göre birbirine çok benzeyen veya birbirinin aynı olan türler arasındaki genetik farklılık 0.00 iken, türler arasındaki farklılık arttıkça bu değer 100'e doğru ilerlemektedir (31).

Sonuç olarak, kontrol suşlar ile izolatlar arasındaki genetik farklılık değerleri şöyle belirlenmiştir: MC1 ile *B. mycoides* arasındaki genetik farklılık değeri 0,15 iken, MC2 ile *B. bronchiseptica* arasındaki 0,13, MC3 ile *B. polymyxa* arasındaki 0,12, MC4 ile *P. rustigianii* arasındaki 0,09 ve MC5 ile *B. circulans* arasındaki genetik farklılık değeri ise 0,18 olarak bulunmuştur. Buna göre, izolatlar ile kontrol türler arasındaki benzerliklerin yüzde olarak değerleri belirlenmiştir: MC1 ile *B. mycoides* arasında %85, MC2 ile *B. bronchiseptica* arasında %87, MC3 ile *B. polymyxa* arasında %88, MC4 ile *P. rustigianii* arasında %91 ve MC5 ile *B. circulans* arasında ise %82 oranında benzerlik tespit edilmiştir.



Şekil 12: MC2, MC3, MC4 ve MC5'ten ve kontrol türlerden saflaştırılan çözünebilir total hücre proteinlerinin %12'lik SDS-PAGE'den analizi. 1; MC2, 2; *B. bronchiseptica*, 3; MC3, 4; *B. polymyxa*, 5; MC4, 6; *P. rustigianii*, 7; MC5, 8; *B. circulans*, 9; moleküler ağırlık standartı

4. TARTIŞMA

Organizmaların sınıflandırılması için, canlıların iç yapılarının özelliği de dahil olmak üzere birçok karakter göz önünde bulundurulmaktadır. Modern biyolojik sistematik, türler arasındaki doğal akrabalık ilişkilerini açıklamak için çok çeşitli yöntemler kullanmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen genetik yöntemler uygulanarak yapılan çalışmalarla mikroorganizma sınıflandırılmasında önemli aşamalar kaydedilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, araştırma alanından izole edilen bakterilerin *Bacillus*, *Bordetella* ve *Providencia* cinslerine ait oldukları tespit edilmiştir.

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 (11,18).

Bordetella cinsi, Gram-negatif, aerobik, endospor oluşturmeyen, küçük kokkobasil şekilli bakterileri içermektedir. Memelilerde patojen ve parazit olduğu bilinmektedir (10).

Providencia cinsi, Gram-negatif, fakültatif anaerobik, endospor oluşturmeyen, çubuk şekilli ve flagella ile hareket edebilen bakteri grubunu içermektedir. İnsanda patojen olduğu bilinmektedir (12).

Araştırma alanından izole edilen bakteriler 20-45°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebildiğinden mezofilik bakteriler olarak adlandırılmıştır.

Elde edilen MC1, MC3 ve MC5'in endosporlu, fakültatif anaerobik, Gram-pozitif, basil morfolojisine sahip ve hareketli olduklarından *Bacillus* cinsi içerisine dahil edilmiştir. MC2, endosporsuz, aerobik, Gram negatif, kok morfolojisine sahip ve hareketli olması nedeni ile *Bordetella* cinsi içerisine, MC4 ise endosporsuz, fakültatif anaerobik, Gram negatif, basil morfolojisine sahip ve de hareketli olduğundan *Providencia* cinsine dahil edilmiştir.

İzolatların büyüme, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak yapılan karşılaştırmalar sonucunda, MC1'in *Bacillus mycoides*'e, MC2'nin *Bordetella bronchiseptica*'ya, MC3'ün *Bacillus polymyxa*'ya, MC4'ün *Providencia rustigianii*'ye ve MC5'in *Bacillus circulans*'a benzer olabileceği kanaatine varılmıştır.

neticesinde bu plazmide sahip olan izolatın ampisilin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, MC1'in de yalnızca ampisiline karşı dirençli olduğu diğer antibiyotiklere karşı ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatların ise hiçbir antibiyotik dirençliliğine sahip olmadıkları ortaya çıkarılmıştır.

Yapılan restriksiyon analizi sonucunda, MC4'ten elde edilen plazmidin, birer tane *Pst* I ve *Eco* RI restriksiyon enzimi kesme bölgesine sahip olduğu görüldü. Bu plazmit, *E.coli* JM101 suşuna aktarılmış ve bu bakteride de replike olabildiği gözlenmiştir.

Elde edilen bakterilerin bazı biyokimyasal ve üreme özellikleri bakımından farklı oldukları ve sahip oldukları özelliklere göre *Bacillus*, *Bordetella* ve *Providencia* cinslerine ait oldukları gözlemlendi. Ancak sadece biyokimyasal, üreme 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 (4). Bu amaçla, elde edilen izolatların içerdiği total proteinlerin profili ve 16S rRNA'nın RFLP'leri incelendi. Yapılan SDS-PAGE jel elektroforezi sonucunda elde edilen izolatların ve kontrol bakteri türlerinin protein profilleri karşılaştırılarak aralarındaki benzerliklerin yüzde olarak değerleri belirlenmiştir. Buna göre, MC1 ile *B. mycoides* arasında %85, MC2 ile *B. bronchiseptica* arasında %87, MC3 ile *B. polymyxa* arasında %88, MC4 ile *P. rustigianii* arasında %91 ve MC5 ile *B. circulans* arasında %82 oranında benzerlik tespit edilmiştir.

Bilindiği gibi aynı türün suşları DNA-DNA homolojisi açısından birbirlerine en az %70 oranında benzemektedirler. Cato ve ark (21) 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 ark 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 (21). 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 (21). Elde edilen protein profili sonuçları fizyolojik ve biyokimyasal sonuçları destekler niteliktedir.

Bakteriler arasında %G+C içeriği 25-75 oranında değişmektedir ve bu değer tür içerisinde genellikle sabittir. Ancak Cato ve ark %G+C içeriği değerinin tür içerisinde %14'e kadar değişebileceğini vurgulamaktadır. Yapılan %G+C içeriği ölçümleri neticesinde elde edilen izolatlardan MC1'in 43, MC2'in 70, MC3'in 45, MC4'ün 48 ve MC5'in 67 %G+C içeriklerine sahip oldukları gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ve kontrol türlerin %G+C oranları arasında karşılaştırma yapıldığında aralarında az da olsa bir farklılığın söz konusu olduğu görülmektedir. Ancak yukarıda da ifade edildiği gibi %G+C içeriği de tür içerisinde %14 kadar değişebildiğinden elde ettiğimiz sonuçların literatürler ile uyumlu olduğu görülmektedir.

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 (32). Ayrıca Stackebrandt ve Goebel (17), aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin dizileri arasındaki benzerliğin %97'den daha fazla olduğunu önermektedirler. Beffa ve ark (29) 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 izolatların ve bunların kontrol türlerinin de *E.coli*'ye benzer olarak 1400 bp uzunluğunda olduğu tespit edildi. Yapılan 16S rRNA gen amplifikasyonu sonucunda elde edilen 16S rRNA gen parçaları, *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, MC2'nin benzer olduğu *B. bronchiseptica* ile, MC3'ün *B. polymyxa* ile ve MC4'ün ise *P. rustigianii* ile aynı RFLP'ye sahip olduğu görülmektedir. Yapılan 16S rRNA geninin RFLP'si sonucunda, beklenmediği halde MC5'in benzer olduğu *B. circulans* türünden biraz farklı RFLP göstermesi, *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesme sonucunda, farklılığı meydana getiren kesme bölgelerinin yukarıda sözü edilen değişken bölgelerde olabileceğini düşündürmüştür (17). Bu nedenle, elde ettiğimiz izolatın adı geçen türün farklı suşu olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca daha önce de belirtildiği 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, bu farklılıklar türler arasındaki filogenetik ilişkiyi göstermekte olup, bu

ilişkilerin ortaya çıkarılması için, sadece bu bölgelerin nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılmasının yeterli olabileceği düşünülmektedir (17). Yapılan *Hinf* I RFLP'si sonucunda benzer oldukları *B. bronchiseptica*, *B. polymyxa* ve *P. rustigianii* türlerine tam benzerlik gösteren MC2, MC3 ve MC4'ün ise kesinlikle bu türlere ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bilinmeyen bir nedenden dolayı 16S rRNA geni PCR yardımıyla çoğaltılamayan *B. mycoides*'in 16S rRNA geninin RFLP'sinin çıkarılamaması nedeniyle, kendisine benzediği düşünülen MC1 ile karşılaştırma imkanı bulunamamıştır.

Yapılan bütün fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve genetiksel testler sonucunda elde edilen izolatların *Bacillus mycoides*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus polymyxa*, *Providencia rustigianii* ve *Bacillus circulans* türlerine ait suşlar olduğuna karar verilmiştir.



5. SONUÇLAR

- 1) Sonuç olarak bu çalışmada, Muş iline bağlı Çukurbağ Köyü'nden alınan gazlı sondaj suyundan bakteri izolasyonu yapıldı.
- 2) Yapılan kantitatif sayım sonucunda, suyun mililitresindeki bakteri sayısının 124 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*, *Bordetella* ve *Providencia* cinslerine ait türler olduğu ortaya çıkarıldı.
- 4) Elde edilen izolatların, benzer oldukları düşünülen türlere gerçekten ait olup olmadığının ortaya çıkarılması amacıyla, total protein profilleri ve 16S rRNA genlerinin RFLP'leri çıkarıldı. İzolatların ve kontrol olarak kullanılan türlerin total protein profillerinin ve 16S rRNA genlerinin *Hinf*I ile yapılan RFLP'lerinin karşılaştırılmaları sonucunda, MC2, MC3 ve MC4'ün sırasıyla *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus polymyxa* ve *Providencia rustigianii* ile tam bir benzerlik gösterdiği, MC5'in ise benzer olduğu düşünülen *Bacillus circulans* türünden biraz farklı bir restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmine sahip olduğu gözlemlendi.
- 5) Yapılan bütün fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve genetiksel testler sonucunda elde edilen izolatlardan MC1'in *Bacillus mycooides*, MC2'nin *Bordetella bronchiseptica*, MC3'ün *Bacillus polymyxa*, MC4'ün *Providencia rustigianii* ve MC5'in ise *Bacillus circulans* türlerine ait suşlar olduğuna karar verilmiştir.
- 6) Bu çalışma sonucunda, hem *Providencia rustigianii* hem de *E.coli* 'de replike olabilen, ampisilin ve streptomisine dirençli olan bir plazmit elde edilmiştir. Bu plazmit daha sonraki çalışmalarda materyal olarak kullanılabilir.

6. ÖNERİLER

Araştırma alanından izole edilen bakterilerden iki tanesinin *Bordetella* ve *Providencia* cinslerine ait oldukları tespit edilmiştir. Bu cinslere ait bakterilerin insanda ve memelilerde patojen ve parazit olması nedeniyle, araştırmada kullanılan suyun, insan ve hayvan sağlığı açısından zararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle suyun insan ve hayvanlar tarafından kullanılmaması önerilmektedir.

Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonları sonucunda, MC4'te 4500 bp'lik halka halinde bir plazmit bulunduğundan bu plazmit üzerinde bazı çalışmaların yapılması yararlı olacaktır. Bu amaçla, elde edilen plazmidin taşıdığı biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi, restriksiyon enzimi analizi ile plazmit RFLP'sinin yapılması düşünülmektedir. Böylece hem *Providencia rustigianii* ve hem de *E.coli* 'de replike olabilen ampisilin ve streptomisine dirençli olan bu plazmidin, ileride bir vektör olarak kullanılması mümkün olabilecektir.

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

7. KAYNAKLAR

1. Kızıroğlu, İ., Genel Biyoloji, Desen Yayınları, Ankara, 1994.
2. Arda, M., Temel Mikrobiyoloji, Birinci Baskı, Medisan Yayın Serisi, Ankara, 1997.
3. Bilgehan, H., Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Yedinci Baskı, Barış Yayınları, İzmir, 1994.
4. 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.
5. Brock, T.D., Madigan, M.T., Biology of Microorganisms, Prentice Hall, New Jersey, 1988.
6. Holt, J.G., Krieg, N.R, Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S. T., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
7. Cappuccino, J.G., Sherman, N., Microbiology, A Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
8. Beguin, P., Millet, J., Thermophiles, General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., New York, 1986.
9. Brock, T.D., Thermophiles, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
10. Holt, J.G, Krief, N.R, Sneath, P.H.A, Staley, J.T., Williams, S.T., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Baltimore, 1986.
11. Claus, D., Berkeley, R.C.W., 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.
12. Penner, J.L., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.

13. Benson, H.J., *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, 1984.
14. Canganella, F., Trovatelli, L.D., *Ecological and Physiological Studies on Thermophilic Bacilli from Sulfataric Hot Springs of Central Italy*, Journal of Basic Microbiol., 35, 1 (1995) 9-19.
15. Gray, M.W., Sankoff, D., 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.
16. Relman, D.A., Schmidt, T.M., MacDermott, R.P., Falkow, S., *Identification of The Uncultured Bacillus of Whipple's Disease*, N. Engl. Journal of Med., 327, (1992) 293-301.
17. Stackebrant, E., Goebel, B.M., *Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology*, International Journal of Systematic Bacteriology, 44, (1994) 846-849.
18. 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.
19. O'Farrel, P., *High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*, Journal of Biol. Chem., 250, (1975) 4007-4021.
20. Roberts, G.P., Leps, W.T., Silver, L.E., Brill, W.J., *Use of Two-Dimensional Electrophoresis to Identify and Classify *Rhizobium* strains*, Appl. Environ. Microbiol., 39, (1980) 414-422.
21. Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman, L.V., Moore, W.E.C., *Electroforetic Study of *Clostridium* Species*, J. Clin. Microbiol. 15, (1982) 688-702.
22. Holdeman, L.V., Cato, E.P., *Anaerobic Laboratory Manual*, Moore, W. E. C., Fouth Edition, Blacksburg, 1977.
23. Joshi, B., S. Walia, *PCR Amplification of Catechol 2,3-Dioxygenase Gene Sequences from Naturally Occurring Hydrocarbon*

Degrading Bacteria Isolated from Petroleum Hydrocarbon Contaminated Groundwater, FEMS Microbiol. Ecol., 19 (1996) 5-15.

24. Kiyohara, H., K. Nagao, K. Yana, Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-insoluble, Solid Hydrocarbons on Plates, Appl. Environ. Microbiol., 43 (1982) 454-457.

25. Mandel, M., Marmur, J., 1968. Use of Ultraviolet Light Temperature Profile For Determination of The Guanine+Cytosine Content of DNA. Meth, Enzymol., 12 B, 195-206.

26. Voskuil, M.I., Chambbiss, G.H., Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 4 (1993) 1138-1142.

27. Manitis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, NY., 1982.

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

29. Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., Aragno, M., Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), Applied and Environmental Microbiology, 62, (1996) 1723-1727.

30. Marion, M., A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, (1976) 248-254.

31. Wolf, K., Rijni, J., Rapid Detection of Genetic Variability in *Chrysanthemum* Using Random Primers, Heredity, 71, 335-341 (1993).

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

8. ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Samsun'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Samsun'da tamamladıktan sonra 1992-1993 öğretim yılında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1996 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Rize'nin Güneysu ilçesinde öğretmenlik yapmaktadır.

