

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALOFİLİK ARKEA VE BAKTERİA İDENTİFİKASYONUNDA FT-IR(FOURIER TRANSFORM-İNFRARED SPEKTROSKOPİSİ) KULLANIMI

GÜLŞAH ALBAYRAK

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Kıymet GÜVEN

2010, 83 sayfa

Bu çalışmada halofilik prokaryotların FT-IR(Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi) ile identifikasyonu amaçlanmıştır. Farklı besiyerleri kullanılarak 12 adet halofilik bakterinin FT-IR ile analizi yapılmıştır. Bu mikroorganizmalardan 8 tanesi Arkea domaini, 4 tanesi ise Bakteria domaini üyesidir. Ayrıca İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilen 6 Bakteria ve 9 Arkea domain üyesi bakterininde FT-IR profilleri çıkarılmıştır. FT-IR analizi sonrası elde edilen spektrumlar SPSS istatistik programı kullanılarak Hiyerarşik Küme Analizi yöntemi yardımıyla karşılaştırılmış ve incelenen örneklerin Arkea ve Bakteria domain olarak iki ayrı küme oluşturdukları gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan Bakteria domain üyeleri; *Chromahalobacter salexigens*, *Halomonas elongata*, *Pseudomonas halophila*, *Salinibacter ruber*'in bir kümede, Arkea domaini üyelerinden *Haloferax mediterranei*, *Halococcus dombrowskii*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula argentinensis*, *Halorubrum xinjiangense*, *Haloarcula mukohatei*, *Haloferax alexandrines*'un ise diğer bir kümede toplandığı gözlenmiştir

Anahtar kelimeler: FTIR, Halofilik Arkea/Bakteria, İdentifikasyon, SPSS

ABSTRACT**MSc. Thesis****USING FOURIER TRANSFORM-INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR)
IN IDENTIFICATION OF HALOPHILIC ARCHAEA AND BACTERIA****GÜLŞAH ALBAYRAK****Anadolu University Graduate School of Sciences****Biotechnology Department****Supervisor: Prof.Dr. Kıymet GÜVEN****2010, 83 pages**

In this study, identification of halophilic procaryotes by using FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) was aimed. Twelve different halophilic microorganisms were analyzed with FT-IR by using different media. Eight species from this microorganisms belong to arkea domain and four of them belong to bacteria domain. Also 6 Bacteria and 9 Arkea species FT-IR profiles were taken which were isolated from İzmir Çamaltı Saltern. The spectra obtained after FT-IR analyses was compared using SPSS statistics programme; Hierarchical Cluster Analysis, and two cluster was obtained contains two different groups of organisms Arkea and Bacteria. It was observes that Bacteria domain members *Chromahalobacter salexigens*, *Halomonas elongata*, *Pseudomonas halophila*, *Salinibacter ruber* congregated in one cluster and the Arkea members *Haloferax mediterranei*, *Halococcus dombrowskii*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula argentinensis*, *Halorubrum xinjiangense*, *Haloarcula mukohatei*, *Haloferax alexandrines* congregated in another cluster.

Key words: FTIR, Halophilic Archaea/Bacteria, Identification, SPSS

1.GİRİŞ

Halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik açıdan dikkat çeken organizma grubudur. Tuz miktarının yüksek olduğu ortamlara adaptasyonlarıyla ekstrem organizmalar grubundadırlar. Aşırı derecede halofilik bakteriler, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan bir çok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmelerine yol açmaktadır. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin tanımlanması ve hücre yapılarının detaylı bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Halofilik prokaryotların identifikasyonunda kullanılan mevcut yöntemler Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA-DNA Hibridizasyonu, Yağ Asiti Metil Esterlerinin Analizi gibi oldukça fazla zaman gerektiren yöntemlerdir ve bu yöntemlerin kullanılması oldukça maliyetlidir. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) cihazının bakterilerin identifikasyonda kullanılması ise diğer geleneksel olarak kullanılan yöntemlere kıyasla daha basit, daha ucuz ve çabuk sonuç verebilen bir yöntem olması nedeniyle önemlidir. Bu çalışmada FT-IR ile halofilik prokaryotların Arkea (Archaea) / Bakteria (Bacteria) domain düzeyinde ayırımı hedeflenmiştir ve bu cihazın halofilik organizmaların identifikasyonunda kullanılması ilk defa denenmiştir.

1.1. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Yöntemler

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve identifikasyonunda kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik yöntemler olarak ikiye ayrılırlar.

1.2. Fenotipik Yöntemler

Bir bakterinin belirlenebilen özellikleri türler arasındaki farklılıkları ortaya koymada kullanılan pek çok özelliği vermektedir. Tipik olarak, yeni bir türü tanımlarken ve ayrıca bir bakteriyi identifiye etmek için bu özelliklerin birçoğu ilgili strain ya da strainler için belirlenir. Elde edilen sonuçlar daha önceden elde edilmiş bilinen organizmanın sonuçları ile karşılaştırılır. Kullanılan spesifik özellikler organizmanın çeşidine bağlıdır ve test için seçilen bu özellikler, daha önceden elde edilen güvenilir bilgiler aracılığı ile belirlenir (Güven 2009).

Bunun yanında, sıvı besiyerinde ürerken zar yapıp yapmadığı, eğer zar varsa zarın yapısı (ince, kalın), tortu meydana gelmesi, üremenin tüp içinde homojen olup olmadığı gibi özellikler, katı besiyerinde meydana gelen koloninin düz, konveks, tırtıllı, mat, parlak, düğmeli, pürüzlü olması gibi özellikler, pigmentasyon, zon oluşumu, gelişme sıcaklık sınırlarının saptanması da identifikasyonda en çok kullanılan karakteristikler arasındadır (Halkman ve Tunail 2010).

1.2.1. Morfolojik Özellikler

Morfolojik ya da yapısal özellikler, taksonomistlere organizmaları sınıflandırmak için yardımcı olmuştur. Yüksek yapılı organizmalar genellikle anatomik detaylarına göre sınıflandırılırlar. Fakat birçok mikroorganizma yapısal

özelliklerine göre sınıflandırılması için oldukça basit yapıdadır. Metabolik ya da fizyolojik özellikleri farklı olabilen organizmalar, bir mikroskopta aynı görünebilirler. Aslında yüzlerce bakteri türü, küçük basil ya da küçük kok şeklindedir. Hücre morfolojisi filogenetik ilişkiler hakkında bize az bilgi verir. Ancak morfolojik özellikler bakteriye identifikasyonunda hala kullanılan özelliklerdir (Güven 2009). Fenotipik özellikler Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Taksonomik değere sahip bazı fenotipik özellikler Kaynak:Genel Mikrobiyoloji (Güven 2009)

| Temel kategori | Özellikler |
|-------------------------|--|
| Morfoloji | Koloni morfolojisi, Gram reaksiyonu, hücre büyüklüğü ve şekli, flagella varlığı, spor oluşturup oluşturmadığı, inklüzyon cisimciklerinin varlığı |
| Hareket | Hareketsiz, kayma hareketi, flagellar hareket, gaz vezikülleri sayesinde hareket, kümeleşme hareketi |
| Metabolizma | Enerji dönüşüm mekanizması (fototrof, kemoorganotrof, kemolitotrof), bazı karbon, azot ve sülfür bileşiklerinin kullanımı, şekerlerin fermantasyonu, azot fiksasyonu, kültürel şartlar (gelişme faktörü gereksinimi, oksijen gereksinimi, pH vs) |
| Fizyoloji | Gelişim için gerekli olan sıcaklık, pH ve tuz aralığı, oksijen gereksinimi (aerobik, fakültatif anaerobik), oksidaz ya da katalaz varlığı, ekstraselüler enzimlerin üretimi |
| Hücre kimyası | Yağ asitleri, polar lipitler, solunum kinonları |
| Diğer özellikler | Pigmentler, lüminesans, antibiyotik duyarlılığı, serotip |

1.2.2. Diferansiyel Boyama

Bakteri identifikasyonunda kullanılan ilk adımlardan biri diferansiyel boyamadır. Diferansiyel boyama birden fazla boya kullanılarak yapılan

mikroskopik incelemedir. Bakterilerin çoğu ya Gram-negatif ya da Gram pozitifdir. Diğer difernsiyel boyamalar, asit-fast boyama gibi, daha sınırlı bir mikroorganizma grubu için yararlıdır. Bu boyama yöntemleri hücre duvarlarının kimyasal bileşimine dayalıdır ve bu nedenle hücre duvarı içermeyen bakteri ya da farklı duvarlar içeren Arkea'ların identifikasyonu için yararlı değildir (Güven 2009).

1.2.3. Biyokimyasal Testler

Başta karbonhidratlar olmak üzere çeşitli besin maddelerini kullanabilme özelliği, belirli enzimleri meydana getirebilme, bazı maddeleri oluşturabilme özelliklerinin belirlenmesi ile identifikasyon yapılmaktadır (Halkman ve Tunail). Bakterileri identifiye etmek için gerekli olan zaman, hızlı identifikasyon yöntemleri ya da seçici ve farklı ortamların kullanımı ile mümkün olduğu kadar azaltılabilir. Bilindiği gibi seçici ortamlar istenilen organizmanın gelişimini destekleyip , rekabetçi organizmanın gelişimini baskılayan içerikler içermektedir. Mayalar, diğer funguslar ve bakteriler için hızlı biyokimyasal sistemler geliştirilmiştir. Biyokimyasal testlerin bir sınırlaması mutasyonlar ve plazmit aktarımıdır. Bunlar farklı özellikte strainlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bir organizma çok sayıda test kullanılmadıkça doğru bir şekilde tanımlanamayabilir. API, VITEK gibi otomatik biyokimyasal test sistemleri hızlı identifikasyon sağlayan test sistemlerine örnektir (Güven 2009).

1.2.4. Serolojik Testler

Seroloji, serum ve serumda meydana gelen immün cevap çalışmalarını içeren bir bilimdir. Mikroorganizmalar antijeniktir yani hayvan vücuduna girdiklerinde antikor oluşumunu sağlarlar. Antikorlar kanda dolaşan proteinlerdir

ve bakterilerle (antijen) oldukça spesifik bir şekilde birleşirler. Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılan antikör solüsyonları ticari olarak mevcuttur. Serolojik testler sadece mikrobiyal türler arasında değil ayrıca tür içerisindeki strainler arasındaki farklılığı da ortaya koyar. Farklı antijene sahip strainler serotip, serovar olarak adlandırılır. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testleri aynı anda çok çukurlu mikrotitrasyon petrilerinde gerçekleştirilir ve pek çok hastalık taramasında örneğin, AIDS hastalığı etmeni virüse (HIV) karşı antikör varlığını belirlemede kullanılır. Bir diğer serolojik test, Western blotting, hasta kan serumundaki antikörleri tanımlama için veya ELISA testlerini doğrulamak amacıyla özellikle HIV enfeksiyonlarında kullanılır (Güven 2009).

1.2.5. Yağ Asiti Metil Esterlerinin Analizi (FAME)

Hücrelerin sitoplazmik membranlarındaki ve dış membranlarındaki lipitlerde bulunan yağ asit tiplerinin ve oranlarının karakterizasyonudur. Patojenlerin ve diğer zararlı bakterilerin teşhisinin yapıldığı, klinik tanı, halk sağlığı, gıda ve suları inceleyen laboratuvarlarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Prokaryotlardaki yağ asiti içerikleri oldukça çeşitlilik gösterir, bu değişiklikler yağ asitinin zincir uzunluğu, çift bağ, halka yapısı, dallanmış zincirler veya hidroksil gruplar içerip içermemesi gibi farklılıkları kapsar. Bu nedenle yağ asiti profili genellikle belirli bir bakteri türünü teşhis edebilir. FAME bazı dezavantajlara sahiptir. Bir organizmanın yağ asiti profili sıcaklık, büyüme fazı, geliştirilen besiyerine göre değişiklik gösterdiğinden, FAME analizleri özellikle sıkı standardizasyonlar gerektirir. Bu sebeple; tutarlı sonuçlar almak için, veri tabanında aynı koşullarda geliştirilmiş organizmaların yağ asiti profilleri ile karşılaştırmak istenilen organizmayı belirli bir besiyerinde ve sıcaklıkta geliştirmek şarttır. Pek çok mikroorganizma için bu mümkün

olmadığından, FAME analizleri sadece belirli koşullarda geliştirilebilen organizmalar ile sınırlıdır.

1.3. Genotipik Yöntemler

1.3.1. DNA-DNA Hibridizasyonu

GC (Guanin-Sitozin) baz yüzdesi bir türün genomik DNA'sında mevcut olan her bir nükleotidin yüzdesini verir ancak o nükleotidlerin dizisi hakkında kesin bir bilgi vermez. Diziler önemlidir, çünkü iki organizmanın DNA'sında çok sayıda benzer nükleotid dizisinin olması, muhtemelen oldukça benzer genler içerdikleri anlamına gelir. Bu iki DNA, birbiri ile hibridize edildiğinde, gen dizilerinde büyük oranda benzerlik beklenir. Genomik hibridizasyon, iki DNA arasındaki dizi benzerliğinin derecesini ölçer ve rRNA dizisinin ayırım sağlayamadığı durumlarda çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde kullanılır. DNA-DNA hibridizasyonu, iki organizmanın genlerindeki küçük farklılıkları ortaya çıkarmakta kullanılan hassas bir yöntemdir ve yakın akraba olan organizmaları ayırt etmede kullanılır (Çökmüş 2010).

1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction = PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu bir DNA molekülünün seçilen bir bölgesinin seçici çoğaltımı ile sonuçlanır. Bölgenin sınırlarındaki diziler bilindiği sürece herhangi bir DNA molekülünün, herhangi bir bölgesi seçilebilir. Bir PCR'ı yapmak için sınır dizileri bilinmelidir; DNA molekülüne, çift sarmalın her bir sarmalına bir tane olmak üzere, iki kısa oligonükleotid hibritleşmelidir. DNA sentezi reaksiyonu için primer olarak kullanılan bu oligonükleotidler, çoğaltılacak

bölgeyi sınırlar (Bardakçı ve ark. 2009). PCR günümüzde çok yaygın olarak kullanılmakta ve tercih edilmektedir. Bu teknik ile klonlamaya gerek kalmaksızın hedef DNA'nın in vitro ortamda enzim yardımı ile çoğaltılması sağlanır. PCR ile 3-5 saatte yaklaşık 20,000 baza kadar olan spesifik genlerin 300 milyon kadar kopyası amplifikasyon sonucu sentezlenmektedir. Bir fosilden veya faili meçhul sanık tespitinde bir kan lekesinden gen klonlaması veya DNA dizi analizi için yeterli miktarda DNA bulunmaz. Az miktardaki doku hatta tek bir hücreden elde edilen DNA miktarını artırabilmek için PCR kullanılmaktadır. Ayrıca virüs tarafından henüz yeni enfekte olmuş kan veya lenf içerisindeki etmen PCR ile teşhis edilebilir. PCR, genomik DNA'da dizisi bilinen veya dizisi henüz tespit edilmemiş olarak klonlanan yabancı DNA'nın çoğaltılmasını ve bunun dizi analizini tespit etmeye yarayan önemli bir tekniktir. Günümüzde oldukça önemli olan insan genom projesi bu teknik sayesinde tamamlanmıştır (Dilsiz 2009).

1.3.3. DNA Parmak İzi (DNA fingerprinting)

Bu teknik, temelde bireylere özgü olan hiperdeğişken bölgeler (HVR) olarak bilinen polimorfik bölgelerin veya değişken sayıda sıralı tekrar bölgelerinin (VNTR) tespiti şeklinde özetlenebilir. DNA dizisi tek yumurta ikizleri dışında bireyden bireye farklılık gösterir. Bireylerin aynı kromozom ve lokuslarında görülebilen nükleotid farklılıkları polimorfizm olarak isimlendirilir. DNA'daki bu farklılıkların incelenmesine DNA parmak izi tekniği adı verilir. İnsanlar arasındaki DNA dizi benzerliği yaklaşık %99.9 oranındadır. %0.1 gibi bir farklılıktan yararlanarak her bireye özgü DNA parmak izi restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra oluşan bant farklılıkları elektroforez yöntemi ile tespit edilmektedir. Jel üzerinde ayrılan DNA bantları membrana aktarıldıktan sonra radyoaktif olarak etiketlenilmiş proplar içeren alkali bir ortama konulur. Bu propların uyumlu oldukları bölgeler ile hibritleşmesi ile farklılıklar tespit edilir.

Southern tekniği olarak bilinen bu yöntemde kaynak DNA'nın taze ve fazla miktarda bulunması gerektiğinden bunun yerine son zamanlarda PCR yönteminden yararlanılmaktadır (Dilsiz 2009).

1.3.4. Ribotiplendirme

Ribozomal RNA temeline dayanan filogenetik analizlerden elde edilen bilginin bakteriyel identifikasyon amacıyla kullanılması ribotiplendirme olarak adlandırılır. Ribotiplendirmede karşılaştırmalı dizi analizi yöntemlerinden farklı olarak dizileme yapılmaz. Bunun yerine bir organizmanın DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan kendine özgü deseni ölçer ve bu parçalar ayrılp bir ribozomal RNA probe ile incelenir. İki organizmanın ribozomal RNA'ları arasındaki farklılıklar, özel restriksiyon enzimi kesim bölgelerinin varlığını veya yokluğunu belirlediğinden belirli bir bakterie türünün restriksiyon deseni de sadece o tre özgüdür. Aslında ribotiplendirme çok tanımlayıcı olduğundan "moleküler ayak izi" olarak adlandırılır, nk neredeyse tüm organizmalar için eşsiz bir seri bant ortaya çıkar.

Pratikte ribotiplendirmeye bir koloninin veya sıvı kültürün DNA'sı ile başlanır. PCR kullanarak 16S rRNA ve onunla ilgili moleküllerin genleri çoğaltılır, bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile muamele edilir, elektroforezle ayrılır ve sonra problanır. Jelde görülen DNA parçalarının oluşturduğu desenler sayısallaştırılıp, bir veri tabanında mevcut referans organizmaların desenleri ile karşılaştırma yapmak için bilgisayar ortamı kullanılır. Ribotiplendirme, hem hızlı hem de spesifik bir yöntem olduğundan bakteriyel identifikasyonda kullanılır. Bu sebeple, ribotiplendirme klinik tanı, gıda, su ve içeceklerin mikrobiyal analizi gibi pek çok uygulama alanına sahiptir (kmř 2010).

1.4. Filogenetik ilişkiler

Türler arası filogenetik ilişkiler bazı moleküllerin dizilerinin karşılaştırılmasıyla ortaya çıkarılabilir. Özellikle ribozomal RNA'lar olmak üzere ribozomları oluşturan makromoleküller, evrimsel ilişkileri saptamak için mükemmel araçlardır. Bütün hücrelerde ribozom bulunduğu için bu moleküller; prokaryotik ve ökaryotik bütün canlıların filogenetik ağacının oluşturulmasında kullanılmıştır. Ribozomal RNA'lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S ve 23S olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü vardır (Tablo 1.2.). Ökaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük olan 18S molekülü üzerine odaklanmıştır (Tablo 1.2.). 16S ve 18S rRNA 'ları ribozomon küçük alt biriminin bir parçası olduklarından, SSU (küçük alt birim) dizilemesi kısaltması, 16S veya 18S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir (Çökmüş 2010).

Tablo 1.2. Prokaryotlarda ve ökaryotlarda rRNA büyüklükleri

| | Prokaryotlarda | Ökaryotlarda |
|--|--|---|
| rRNA'nın Alt Üniteleri | 5S, 23S, 16S | 5S, 5,8S, 28S, 18S |
| Küçük Alt Ünite | 16S | 18S |
| Küçük alt ünitenin Büyüklüğü (baz sayısı) | 1500 nükleotid | 1900 nükleotid |
| Diğer alt ünitelerin Büyüklüğü | 5S: 120 nükleotid 23S: 2904 nükleotid | 5S: 120 nükleotid 5,8S: 160 nükleotid 28S: 4718 nükleotid |

Carl Woese ve arkadaşları çalışmalarında evrensel filogenetik bir araç olarak rRNA küçük alt ünitesinin yararlılığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar ile mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı ortaya koyabilecek yeni bir prokaryotik sistematığın önerilmesi sağlanmıştır. Böylece 2003 yılında İsveç Kraliyet Bilim Akademisi tarafından, biyolojide bilimsel başarının en yüksek ölçütü olarak görülen Crafoord ödülüne layık görülmüştür (Güven 2009).

Biyologlar daha önce yaşayan organizmaları 5 farklı aleme ayırmışlardı; Bitkiler, Hayvanlar, Fungi, Protista ve Bakteria. DNA dizileme temelli filogenetik analizler bu ayrımın beş farklı evrimsel kökene dayanmadığını ortaya koydu. Yeryüzünde hücresel düzeyde hayat 3 farklı tip hücreden evrimleşti. Bu 3 farklı birimin her birine domain adını aldı. Bu domainler: Bakteria, Arkea ve Eukarya (Ökaryotlar) dır. Domainlerin ortak atasal bir organizmadan veya Dünyadaki yaşamın başlangıcında organizma topluluklarından ayrılarak oluştuğu düşünülmektedir. Bu domainlerden ikisi; Bakteria ve Arkea nukleuslarının bir zarla çevrili olmadığı hücreler topluluğundan oluşurlar. Böyle hücrelere prokaryotik hücreler adı verilir. Diğer grubu oluşturan Ökaryotlar; Bakteria dışındaki tüm orjinal beş alemini içine alır. Bakteria, Arkea ve Eukarya terimleri yaşamın 3 domainini ifade eder. Domain en yüksek biyolojik taksondur. Bunun yanında; Bitkiler, Hayvanlar, Fungi ve Protista, Eukarya domainine ait alemlerdir (Madigan ve ark. 2009).

1.5. Domainlerin Özellikleri ve Domainler Arasındaki Farklar

1.5.1. Hücre duvarları

Peptidoglikan (muramik asit) genellikle tüm bakterilerin hücre duvarında bulunmaktadır. Ökaryotlar ve arkebakteriler peptidoglikana sahip değildir. Selüloz veya kitinden oluşan hücre duvarı bazı ökaryotlarda bulunmaktadır.

Arkebakterilerde pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein veya glikoproteinden oluşan hücre duvarı tipleri bulunabilmektedir. Mikrobiyal hücre duvarları çeşitlilik göstermektedir ve Bakteria'yı Arkea'dan ayıran en önemli özellik peptidoglikanın varlığı ya da yokluğudur (Tablo 1.3.).

1.5.2. Lipidler

Arkea'yı Bakteria'dan ayıran başka bir özellik te membran lipidlerinin yapısıdır. Bakteria ve Ökarya membran lipitleri, yağ asitleri içinde ester bağı ile bağlı gliserolden ibarettir. Yağ asitlerinin yapısı çok değişken olabilmektedir ancak önemli olan gliserole bağlı ester bağının tanımlayıcı olmasıdır. Örneğin Arkea üyeleri lipidleri eter bağı moleküllerden oluşmaktadır.

Ester bağı lipitlerde yağ asitleri düz bir zincir halinde iken Arkea'da yağ asitlerinin yerinde gliserole eter bağı ile bağlı fitanil ya da bifitanil tipte dallanmış hidrokarbonlar bulunmaktadır.

1.5.3. RNA Polimeraz

Tüm canlılarda transkripsiyon DNA bağımlı RNA polimerazlar tarafından yapılmaktadır. DNA kalıp görevini görürken oluşan ürün de RNA'dır. Bakteri hücrelerinin RNA polimerazları tek bir çeşittir ve kuaterner yapıdadır. Bu klasik RNA polimeraz α , β , β' ve α' adlı 4 polipeptidin aktif polimeraz içinde 2:1:1:1 oranlarında kombinasyonundan oluşmaktadır. Arkea RNA polimerazları ise Bakteria'ya göre daha komplekstir ve bunlar 8 veya daha fazla polipeptid içermeleriyle Ökaryotlara benzerler. Ökaryotların temel polimerazları 3 tanedir ve 10-12 polipeptid içermektedirler.

1.5.4. Protein Sentezinin Özellikleri

3 domainin protein sentezleme mekanizmaları, rRNA dizilimlerindeki ve protein sentezleme faktörlerindeki farklılıklardan dolayı birbirinden ayrılmaktadır. Arkea ve Bakteria ribozomları aynı büyüklüktedir. Buna rağmen Arkea'da protein sentesi daha çok ökaryotlarınkine benzer (Güven 2009).

Tablo 1.3. Bakteria, Arkea ve Eukarya arasındaki ayırıcı temel özelliklerin özeti (Brock 2009)

| Özellikler | Bakteria | Arkea | Eukarya |
|---|------------------|------------------|-----------------------|
| Morfolojik ve Genetik | | | |
| Prokaryotik hücre yapısı | Evet | Evet | Hayır |
| Kovalent şekilde kapalı ve halkasal DNA'nın varlığı | Evet | Evet | Hayır |
| Histon proteinlerinin varlığı | Hayır | Evet | Evet |
| Membranla çevrili çekirdek | Yok | Yok | Var |
| Hücre duvarı | Muramik asit var | Muramik asit yok | Muramik asit yok |
| Membran lipitleri | Ester bağlı | Eter bağlı | Ester bağlı |
| Ribozomlar | 70S | 70S | 80S |
| Başlangıç tRNA'sı | Formilmetiyonin | Metiyonin | Metiyonin |
| Fizyolojik/Özel Yapılar | | | |
| Metanogenez | Hayır | Evet | Hayır |
| Nitrifikasyon | Evet | Hayır | Hayır |
| Denitrifikasyon | Evet | Evet | Hayır |
| Azot fiksasyonu | Evet | Evet | Hayır |
| Klorofilli Fotosentez | Evet | Hayır | Evet(kloroplastlarda) |
| Rodopsinli enerji metabolizması | Evet | Evet | Hayır |
| Gaz kesecikleri | Evet | Evet | Hayır |

Moleküler filogeniler bütün hücreler arasında evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmıştır. RNA-temelli filogeniler mikrobiyolojinin pek çok alt disiplinini etkileyen yeni araçlar oluşturmuşlardır. Bunlara, özellikle mikrobiyal sınıflandırma, mikrobiyal ekoloji ve klinik tanılar dahildir (Çökmüş 2010).

Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu şu an oldukça rutin hale gelmiştir. Yeni bulunan diziler, Ribozomal Veri Tabanı Projesi (RDP)' deki veya GenBank (Amerika), DDBS (Japonya) ve EMBL (Almanya) gibi diğer genetik veri tabanlarındaki mevcut dizilerle karşılaştırılabilir. Daha sonra ağaç oluşturan bir algoritma kullanarak bu bilgileri en iyi şekilde ifade eden filogenetik bir ağaç çizilebilir (Çökmüş 2010).

1.6. Farklı Domainlerdeki Gen Analizleri

Karşılaştırmalı genomikte farklı gen ve gen ailelerinin karşılaştırılması temel görevdir. Pek çok farklı mikroorganizmanın kromozomlarının dizileme çalışmaları tamamlanmıştır ancak karşılaştırma sonuçları şaşırtıcıdır. Arkea'daki DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyondan sorumlu genler Eukarya'ya; Bakteria grubundan daha çok benzemektedir. Ancak yine şaşırtıcı bir şekilde Arkea'daki metabolik fonksiyonların düzenlenmesinden sorumlu genler ise Eukarya'ya değil, Bakteria'ya daha çok benzemektedir (Madigan ve ark. 2009).

1.7. Halofilik Bakteriler

Tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu doğal habitatlardaki ozmotik etkiler oldukça fazla ilgi çekmektedir. Deniz suyu yaklaşık %3 oranında NaCl ve az miktarlarda da olsa diğer mineral ve elementleri içermektedir. Denizde bulunan mikroorganizmalar, deniz suyunun su aktivitesinde optimum gelişme

göstermelerine ek olarak, özel olarak sodyum iyonlarına da gereksinim duyarlar. Bu tür organizmalar halofiller olarak isimlendirilirler. Halofillerin gelişimi için belirli bir miktar NaCl'ye ihtiyaç vardır, ancak optimum miktar organizmalar arasında değişiklik gösterir. Örneğin düşük (%1-6) ve orta (%7-15) düzeyde NaCl'ye ihtiyaç duyan halofiller sırasıyla zayıf halofil ve ılımlı halofil olarak adlandırılırlar. Çok tuzlu çevrelerde gelişme yeteneğinde olan organizmalar ekstrem halofiller olarak adlandırılırlar. Bu organizmalar optimum gelişme için, türlere bağlı olarak %15-30 oranında NaCl gereksinirler (Çökmüş 2010).

Halofilik mikroorganizmalar optimum olarak 0.2 M NaCl'nin üzerindeki tuz konsantrasyonlarında gelişebilen ve bazılarının ise 5M NaCl de bile gelişebildikleri gözlemlenen organizma grubu olarak tanımlanır. Bu ekstremofillere; tuz gölleri, tuzlu topraklar, soğuk tuzlu ortamlar, alkalın tuzlu habitatlar, tuzlanmış balık, et ve diğer gıdalarda rastlanılabilir. Halofilik mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılması genellikle 16S rDNA dizi analizi ve diğer kemotaksonomik kriterlere göre yapılır. Halofiller aşırı tuzlu ortamlarda yaşayabilmek için pek çok mekanizma geliştirmişlerdir. Kurumadan kaçınmak için geliştirilen en yaygın metod ise gliserol, glisin betain ve amino asit gibi organik çözünen maddeleri su kaybını önlemek için kullanmalarındır. Ayrıca Halobakteriler, ışıkla çalışan klor pompası olan 'halorodopsin' adı verilen molekülü hücre içi iyon konsantrasyonunu ayarlamak için kullanırlar. Orta Doğuda bulunan Ölü Deniz ve Utah'da bulunan Büyük Tuz gölü şimdiye kadar en çok çalışılan iki aşırı tuzlu ortamlardır (Thaler 2005).

1.7.1. Halofilik Arkea

Haloarkea adı da verilen bu grup; tuzun yüksek olduğu tuz gölü, bolca tuzlanmış gıdalar, etler ve balıklar gibi yapay tuzlu ortamlarda yaşayan prokaryotik organizmalardır. Halofilik arkea Gram negatiftir ve hücreler ikiye

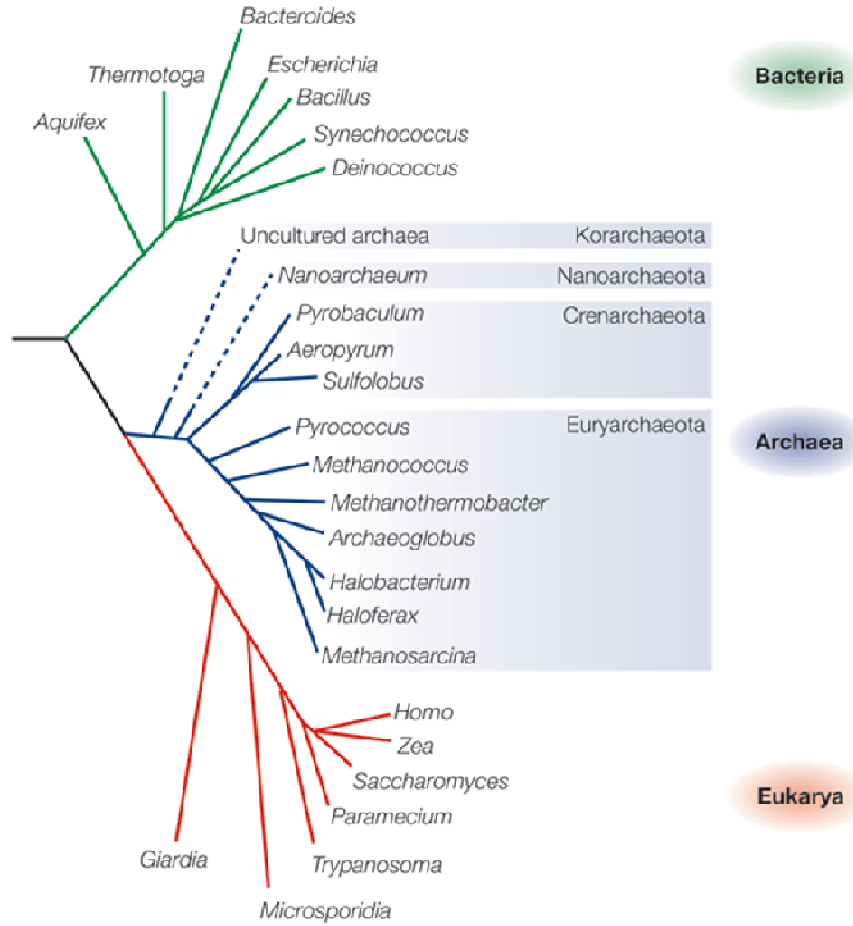
bölünerek üremesini gerçekleştirir. Dinlenme evresi ve spor oluşturma gözlenmez. Pek çok halobakteria hareketsizdir sadece bir kaç suşları taşıdıkları kamçı ve gaz vezikülü gibi yapılarla zayıf bir hareket gösterir. *Halobacterium* ve *Halococcus* cinsleri; toplam hücresel DNA miktarının %25-30 kadarını içeren büyük plazmitler taşımaları sıradışıdır. Bu plazmitlerdeki GC oranı %57-60 'dır ve kromozomal DNA'dan belirgin olarak farklılık gösterir (kromozomal DNA %66-68 oranında GC içerir). Ekstrem halofillerin plazmitleri küçük kromozom yapılarına rağmen doğal olarak bulunan bilinen en büyük plazmitlerdir (Madigan ve ark. 2009).

Ekstrem halofilik Arkea türlerinin büyük bir kısmı zorunlu aerob'dur. Halobakterilerin çoğu enerji kaynağı olarak amino asitleri veya organik asitleri kullanırlar ve optimal üremeleri için başlıca vitaminler olmak üzere pek çok üreme faktörüne ihtiyaç duyarlar. Birkaç *Halobacterium* türünün karbohidratları okside ettiği bilinmektedir ancak bu çok nadir görülen bir özelliktir. *Halobacterium*'da a, b ve c tipi sitokrom içeren elektron transport zincirleri bulunmaktadır ve membran aracılı kemiozmotik olaylar sonucu açığa çıkan bir proton motive güç ile aerobik üreme aşamasında enerji elde edilmektedir. Bazı halofilik Arkea anaerobik üreyebilmektedirler. Bazı türlerde şeker fermantasyonuna bağlı anaerobik solunum yapıldığı gösterilmiştir (Çökmüş 2010).

1.7.2. Halofilik Bakteria

Halofiller bakteriyal domain içinde tüm filumlar içerisinde yayılmışlardır. Halofilik bakteriler fizyolojik özelliklerine göre çok farklılık gösterirler: Aerobik ve anaerobik kemoototroflar, fotoototrofik ve fotoheterotrofik türler olduğu kadar kemolitotrofik türler de vardır. Hipersalin ortamlardan izole edilmiş bakterilerin çok azı %15'den fazla tuzlulukta gelişebilmektedir. Bunlar

arasında anaerobik halofillerden *Halanaerobiales* ve *Halorhodospira* (anoksijenik fotosentez yapabilen halofilik alkalofil) üyeleri, *Actinopolyspora* (doymuş tuz konsantrasyonlarında gelişebilen aktinomiset) ve *Salinibacter* (aerobik, heterotrofik, pigmentli) bulunmaktadır. Halofilik bakteria üyeleri; halofilik arkea üyeleri kadar iyi çalışılmamıştır (Oren 2002).



Şekil 1.1.Arkea, Bakteria ve Eukarya Domainleri Kaynak: www.nature.com

Ekstrem Halofiller

Bazı ekstrem halofilik türler Tablo 1.4. de görülmektedir.

Tablo 1.4. Bazı Ekstrem Halofilik Arkea Cinsleri (Madigan ve ark. 2009)

| Cins | Morfoloji | DNA(%molGC) | Habitat |
|-------------------------|---------------|-------------|--|
| <i>Halobacterium</i> | Çubuk | 66-71 | Tuzlanmış balık,deri,aşırı tuzlu göller,tuzl |
| <i>Halorubrum</i> | Çubuk | 62-71 | Ölü Deniz, tuzlalar |
| <i>Halobaculum</i> | Çubuk | 70 | Ölü Deniz |
| <i>Haloferax</i> | Düz disk | 60-66 | Ölü Deniz, tuzlalar |
| <i>Haloarcula</i> | Düzensiz disk | 63-65 | Tuz havuzları, Ölü Vadi, deniz tuzlaları |
| <i>Halococcus</i> | Kok | 59-66 | Tuzlanmış balık, tuzlalar |
| <i>Halogeometricum</i> | Çubuk | 59-60 | Solar tuzlalar |
| <i>Haloterrigena</i> | Çubuk, oval | 59-60 | Tuzlu toprak |
| Haloalkalifiller | | | |
| <i>Natronobacterium</i> | Çubuk | 65 | Yüksek derecede tuzlu soda gölleri |
| <i>Natrinema</i> | Çubuk | 70 | Tuzlanmış balık, deri |
| <i>Natrialba</i> | Çubuk | 60-63 | Soda gölleri, kıyı kumu |
| <i>Natronomonas</i> | Çubuk | 61-64 | Soda gölleri |
| <i>Natrococcus</i> | Kok | 63-64 | Soda gölleri |
| <i>Natronorubrum</i> | Düz hücreler | 59-60 | Soda gölleri |

1.8. Halofilik Bakterilerin Biyoteknolojik Önemleri

Halofilik mikroorganizmalar çok yüksek oranda tuz içeren ortamlarda yaşayabilirler bu yüzden ekstremofiller grubuna girerler. Bu ekstremofilik mikroorganizmalar, halen pek çok biyoteknolojik sürecin sürdürülebilmesi için kullanılmaktadırlar. Örneğin halobakteria' lar bakteriyorodopsin üretiminde kullanılırlar. Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik olarak kullanıldığı pek çok alan vardır. Bu alanları genel olarak özetlemek gerekirse, çeşitli polimerlerin üretimi (polisakkaritler), enzimlerin üretimi, uyumlu çözünür maddelerin üretimi, yağ gerikazanımının artırılması, kanser teşhisi, ilaç görüntüleme, atıkların ve toksik bileşiklerin biyodegradasyonunda kullanımlarıdır (Ventosa ve Nieto 1995).

1.8.1. Polimerik Maddelerin Üretimi

Eksopolisakkaritlerin, lipozomların, lektinlerin ve biyoplastiklerin üretimi halofilik organizmalardan elde edilen biyoteknolojik öneme sahip biyomateryallerdir. Ekstrem halofillerden olan *Haloferax mediterranei* hücre dışı polimerik madde olan β -hidroksibutirat (PHB) ve β -hidroksibutirat'ın kopolimeri olan poly- β -hidroksialkonat (PHA) içerebilirler. Poly- β -hidroksialkonat içerikleri tuzluluğa bağlı olarak kuru ağırlıklarının %19-38'kadar olabilmektedir (Margesin ve Schinner 2001; Oren 2002).

Poly- β -hidroksialkonat biyolojik parçalanabilir plastiklerin üretiminde kullanılır. Böyle termoplastikler (biyolojik polyesterler) polypropilenlere benzer olarak yüksek direnç ve düşük erime sıcaklığı gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren 2002).

1.8.2. Gıda Biyoteknolojisi

Halotolerant mikroorganizmalar tuz varlığında meydana gelen pek çok fermantasyon süreci sırasında çok önemli rol oynarlar. Bu organizmalar ürünlere özgü tat ve aromanın oluşumunu sağlayan fermantasyon aşamalarında görev alırlar. Gıda ve kozmetik maddelerinde, multivitamin preparatlarında kullanılan β -Karoten gibi maddelerin üretiminde görev alırlar (Margesin ve Schinner 2001).

Besinlerden izole edilen *Micrococcus varians*, salçadan izole edilen *Vibrio costicola* gibi çok sayıda halofilik bakteriler vardır. Pek çok çalışma besinleri kontamine edenleri araştırmak üzere yapılmaktadır. Ayrıca tat vericiler olarak bilinen ticari ürünlerde üretilmektedir. Mesela Tayland'da "nam pla" denilen fermente edilmiş balık sosu geleneksel olarak iki parça balık ve bir parça deniz tuzu eklenerek yapılır. Karışım konsantre tuzlu su ile kaplanır ve yaklaşık bir yıl fermente olması için bırakılır. *Halobacterium* ve *Halococcus* olarak tanımlanmış olan kırmızı halofilik Arkea'lar yaklaşık üç hafta sonra maksimum yoğunluklarına ulaşırlar ve fermantasyon periyodu boyunca bu durumlarını sürdürürler. Halobakterial proteazlar bu süreçte muhtemelen rol oynamaktadırlar. Arkea metabolizmasınınca oluşan ürünlerin bu sosun aromasına katkı yaptığı düşünülmektedir (Oren 2002).

1.8.3. Enzim Üretimi

Arkeal enzimler, yüksek tuzda görev yaptıkları ve organik çözücülere karşı dirençli oldukları için biyoteknolojik işlemlerde kullanılırlar. Enzimler örneğin; amilaz, gelatinaz, lipaz, DNaz, sellülaz, β -galaktozidaz, katalaz ve kazeinazlar farklı alanlarda kullanılabilenlerdir. Tekstil ve deterjan endüstrisinde kullanılan enzimler enzim endüstrisinin % 65'ini oluşturmaktadır. Endüstri temelli mikrobiyal enzimlerin büyük bir çoğunluğu bakterial proteazlardır ve deterjan

katkısı olarak kullanılır. Pek çok deterjan proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzimleri içerir. Bu enzimler düşük sıcaklıkta enerji tasarrufu sağlarlar. Lipazlar çamaşır ve bulaşık deterjanlarında katı ve sıvı yağları temizleme kapasitesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir (Oren 2002).

Ektoin'ler *Halomonas elongata* tarafından üretilen bir maddedir ve enzim düzenleyici olarak kullanılır. Enzimin raf ömrünü ve enzim hazırlama işlemini artırır. Nemlendirme özelliğini arttırmak için cilt kremlerinde kullanılır (Oren 2002).

1.8.4. Kanser Teşhisi

Halobacterium salinarium 84- kDa proteini üretir. Bu protein kanser hastalarında üretilen C- myconcogene karşı üretilen antibadileri keşfetmek için kullanılır. Bu genetik mühendisliğinde *E.coli* içinde üretilen insan myc proteininden daha pozitif sonuçlar vermektedir (Oren 2002).

1.8.5. Petrol Eldesi

Haloferax mediterranei hücre dışı polisakkarit üretir. Bu salgı kalınlaştırıcı ve jel maddesi olarak viskoziteyi stabilize eder. Bu polisakkarit pH, sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençlidir ve bu nedenle petrol kuyularından petrol çıkarma işlemini iyileştirmek için kullanılabilir (Oren 2002).

1.8.6. Çevre Biyoteknolojisi

Halofillerin tuz varlığında hidrokarbonları oksitlemesi, petrol ürünleriyle kontamine olan tuzlu ekosistemlerin biyolojik iyileştirmesi için yararlıdır. Başarılı biyoremediyasyon örneklerine deniz, Arktik ve Antartik ortamlarda

rastlanmaktadır. Petrol biyodegradasyonu ve yüksek tuzluluk arasında sanılan ters ilişkinin aksine (tuzluluğun %20'den fazla olduğu ortamlarda) yeni bulunan bir halo-termotolerant türü olan *Streptomyces albaxialis*'in ham petrol ve petrol ürünlerini %30 oranındaki tuz varlığında bile ayrıştırabildiği görülmüştür (Margesin ve Schinner 2001).

Alkali endüstriyel sular veya tuzlu sulardan biyolojik fosfatın uzaklaştırılması için halofilik bakterilerin kullanılması mümkündür. Biyolojik fosfatı çekmesi için mikroorganizmaların kullanılması önerilmektedir (Garcia ve ark. 2005). *Halomonas sp.*'nin tuzlu fenolik atık suların temizlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Aromatik bileşiklerle kontamine olmuş tuzcul çevrelerde halofilik bakterilerin katabolik rolünü Garcia ve ark., (2005) araştırmışlardır. Hipersalin Oklahoma büyük tuz düzlüklerinde benzen ve toluenin aerobik parçalanırlılığı test edilmiş ve halofilik mikroorganizmaların parçalamadaki rolü gösterilmiştir (Nicholson ve Fathepure, 2005). Lefebvre ve ark. (2005) deri işleme atık suyunun biyolojik olarak temizlenmesi için halofilik mikroorganizmaları önermişlerdir.

1.8.7. Alternatif Enerji

Hidrojen; kolaylıkla elektrik enerjisine dönüştürülebilmesi ve kolaylıkla yanabilmesi nedeniyle geleceğin enerji kaynağı olarak görülmektedir. Fotosentetik bakteriler; H₂ üretimindeki avantajları çeşitli biyolojik kaynaktaki organik maddelerin ışık yardımıyla dönüştürülmesinde kullanılabilmeleridir. Fotosentetik bakteri içeren bir halofilik bakteri topluluğunun % 3 NaCl ve ışık varlığında ham nişastayı direk olarak H₂ üretimini gerçekleştirebildikleri görülmüştür. Halofilik kültür sistemleri, basit bir deniz suyu besiyerinde üretilerek biyokütleden H₂ üretimi için ekonomik bir yöntemdir (Margesin ve Schinner 2001).

1.8.8. Tarım

Buz-çekirdekleşme aktivitesi (Ice-nucleation activity-INA) yapay buz ve kar üretimi için enerji tasarrufu sağladığı için biyoteknolojik olarak önemli bir avantaj sağlar. Buz-çekirdekleşme aktivitesi suyun 0 °C'nin daha altındaki sıcaklıklarda (-7 °C ve -5 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda) donma yeteneğidir. Bu özellik gıda endüstrisinde; dondurma üretiminde ve tat kaybı olmaksızın etkin buz konsantrasyonunu sağlamak için kullanılır. Patojenik olmayan bakterilerden; buz çekirdekleşme aktivitesinden sorumlu genin transferi ve ekspresyonu ekonomik açıdan ilgi çekici olabilir. Fitopatojenik *Pseudomonas syringae*'den izole edilen buz-çekirdekleşme geni *inaZ* başarılı bir şekilde halofilik bakterilere transfer edilmiştir (Margesin ve Schinner 2001).

Tuzlu toprakların tarıma elverişli hale getirilmesi için olası bir strateji de halofilik organizmalardaki tuza dayanıklılığın ekonomik değeri olan tarım ürünlerine aktarılmasıdır (Margesin ve Schinner 2001).

1.9. İnfrared Spektroskopisi (IR)

İnfrared spektrofotometreleri numuneden geçen ışın frekanslarını analiz ederek bir spektrum haline getiren cihazdır. Frekans veya dalga boyu analizi, cihazda bulunan bir monokromatör aracılığıyla yapılır. İnfrared spektrofotometreleri başlıca dörde ayrılır:

- 1-Kalitatif analizler için (yapı tayini) için geliştirilen greytingli cihazlar. Bunlara dispersif cihazlar da denir.
- 2-Kalitatif ve kantitatif analizler için geliştirilen Fourier dönüşümlü, çok amaçlı cihazlar
- 3-Katıların analizleri için geliştirilen reflektans IR fotometreleri.

4-Atmosferdeki organik maddelerin tayini için geliştirilen dispersif olmayan cihazlar

İnfrared cihazları tek ışın demetli veya çift ışın demetlidir. Çift ışın demetli cihazlar, iyi uygulandığı zaman, havada bulunan gazlardan özellikle de CO₂ ve H₂O dan (O₂ ve N₂ den değil) gelen zemin absorpsiyonlarını sıfıra yaklaştırır (Gündüz 2005).

IR maddenin infrared ışınlarını absorblaması temeline dayanır. Işığın absorblanmasının ölçüldüğü yöntemdir. IR ışını; dalga boyları (λ) 800 nm – 400.000 nm arasında olan bölgeye IR bölgesi denir. Dalga boyları yerine daha çok dalga sayısı kullanılır.

IR'de genellikle 400 cm⁻¹ – 4.000 cm⁻¹ arasındaki bölge taranmaktadır. Bu geniş aralık 3 bölümde incelenmektedir.

- 1) 2500 cm⁻¹ -4000 cm⁻¹ yakın IR
- 2) 4000 cm⁻¹ – 650 cm⁻¹ orta IR
- 3) 650 cm⁻¹ – 25 cm⁻¹ uzak IR bölge denir.

IR ışınlarının enerjileri, moleküllerde titreşim enerji düzeyleri arasındaki farklara karşılık gelmektedir. IR ışınının absorblanmasıyla molekülde titreşim enerji düzeyleri arasında bir geçiş gerçekleşir. Titreşim enerji düzeyleri moleküldeki titreşim hareketi sonucu ortaya çıkan enerji düzeyidir. Moleküldeki atomların birbirlerine yaklaşp, uzaklaşmaları (bağ uzunluğunun artıp azalması) ya da bağ açılarının değişmesi ile ortaya çıkan hareketlere titreşim hareketleri denir. Bir molekülde genel olarak 3 tür hareket vardır. Bunlar öteleme, dönme, titreşim hareketleridir. Molekülün 3 boyutlu hareketi; yer değiştirmesi öteleme, molekülün x, y, z eksenleri boyunca yaptığı dönme hareketidir. n atomlu molekülün uzayda belli bir yöne olan hareketini tanımlamak için x, y, z koordinatları boyunca oluşturulan vektörel bileşenler kullanılabilir. n atomlu bir molekülde oluşturulacak vektörel bileşenlerin sayısı 3n tane vektörel bileşen kullanmak gerekmektedir (Yıldız ve Genç 1993).

IR spektroskopisi daha çok nitel analiz yani yapı tayini amacıyla kullanılır. Çünkü bir maddenin IR spektrumu o maddenin en karakteristik özelliklerinden biridir. Sadece optik izomerlerin IR spektrumları birbirinin aynıdır. Herhangi bir reaksiyonun izlenmesinde de (reaksiyonun olup, olmadığını, verimlerin hesaplanması için) IR spektrumu kullanılabilir. IR Spektroskopisi nicel analizlerde de kullanılabilir. Nicel analiz, absorpsiyonun Beer-Lambert kanununa uygun olmasından yararlanılarak yapılır. IR spektrumlarında düzey eksen absorbansı değil, % geçirgenliği gösterir. Bu nedenle analiz için seçilen pikin zemin çizgisine karşılık gelen yüzde geçirgenlik değeri ile pikin maksimuma karşılık gelen yüzde geçirgenlik değerinin logaritmik farkları alınır ve nicel analiz için o bileşik için karakteristik alan ve spektrumda şiddetli olarak gözlenen bir pik seçilir.

Bu yöntem nicel analizde kullanılabilmesine rağmen çok fazla tercih edilmez. Bunun sebepleri;

- 1- Monokromator çıkış aralığı geniş olduğu için Beer-Lambert kanunundan sapmalar fazladır.
- 2- Spektrum daha karmaşıktır, bu durum pikin zemin çizgisinin belirlenmesinin zorluğunu doğuracaktır.
- 3- Bu yöntemde hücre genişliği belirsizliğe sebep olabilir (Lambert ve ark.1987).

1.10. IR Cihazının Başlıca Parçaları

1.10.1. Numune Kapları

İnfrared cihazında kullanılan numune kapları UV ve görünür alan cihazında kullanılanlardan çok farklıdır.

1.10.2. Işın Demeti Kesicileri

İnfrared cihazlarına, kaynaktan gelen ışın demetlerini modüle etmek için bir ışın demeti yolu kesicisi kullanılır. Bu alet saniyede 5-10 devir yapan bir yarım aynadır. Böyle bir alet detektör sisteminin kaçak ışınların, esas ışınlardan ayırmasına yardım eder (infrared ışınları bir çok kaynaktan ışınım sonucu gelebilir). Devri düşük kesicilerle daha iyi sinyaller alınır.

1.10.3. Işık Demeti Şiddetini Ayarlayıcılar

İnfrared cihazlarında referans maddesinden geçen ışık demetinin şiddeti, numuneden geçen ışın demetinin şiddetine eşit yapılır. Bunun için dişleri testereye benzeyen bir tarak kullanılır. Referans ve numuneden geçen ışık demetleri şiddetlerinin farkına göre, özel bir motorla (senkronize motorla) hareket ettirilir (demet şiddetleri birbirine eşit yapılır). Ayrıca bu motor yazıcısını döndüren ikinci bir motorla uyumlu olarak çalışır. Buna göre, monokromatorun prizma veya optik ağından çıkan λ_1 dalga boyundaki ışın demetine göre, üzerinde spektrum kağıdı bulunan tambur döndürülür ve kağıttaki λ_1 dalga boyu, yazıcının önüne getirilir. λ_1 dalga boyundan sonraki dalga boylarında bir absorpsiyon varsa birinci motor buna uygun olarak hareket eder ve tarağı aşağıya indirerek ışın demetlerinin eşit olmasını sağlar. Bu arada tambur üzerindeki kağıda yazan uç da, tarakla birlikte aşağıya iner. Absorpsiyon olmadığı zaman tarak ve iğne aynı zamanda yukarı çıkar. Monokromator dispersiyon cihazı, spektrum kağıdı tamburu, yazıcı uç ve demet kesici tarak aynı zamanda ve birbirleriyle uyumlu olarak çalışırlar.

1.10.4. Monokromatorlar

IR monokromatorlarında mercekler bulunmaz. Onun yerine çok sayıda ayna kullanılır. Bunlar, parlak yüzeyli toplayıcı aynalardır. İnfrared spektroskopisinde hem prizmalar hem de optik ağlar kullanılır. Prizma çeşitli maddelerden yapılır. Bu maddeler ve kullanılma alanları şöyledir:

-Kuvars prizmalar $0,8-3 \mu\text{m}$ ($12500-3300 \text{ cm}^{-1}$) arasında kullanılır. Ama dispersiyonu kötüdür. $4 \mu\text{m}$ ' den sonra şiddetle absorplama yapar.

-Sodyum klorür prizmaları $5-16 \mu\text{m}$ arasında iyi, $2,5-5 \mu\text{m}$ arasında ise daha iyi sonuç verir. $20 \mu\text{m}$ den sonra şiddetle absorpsiyon yapmaya başlarlar.

-Kalsiyum bromür prizmaları $2,4-7,5 \mu\text{m}$ arasında kullanılır

-Potasyum bromür prizmaları $15-40 \mu\text{m}$ ($675-250 \text{ cm}^{-1}$) arasında uzak infrared bölgesinde kullanılır.

-Sezyum bromür prizmaları $10-50 \mu\text{m}$ arasında kullanılır.

-Lityum florür prizmaları $1-5 \mu\text{m}$ ($10000-2000 \text{ cm}^{-1}$) yakın infrared alanında kullanılır.

Prizma maddelerinin çoğu nem çekici olduklarından ve nemden zarar gördüklerinden çok iyi korunmaları gerekir. Optik ağlar üzeri parlak alüminyum levhasıyla kaplı cam veya plastikten yapılır. Böyle ağlara yansıtıcı ağlar da denir (Gündüz 2005).

1.11. IR Spektroskopisinde Kullanılan Çözeltiler ve Başlıca Numune Hazırlama Teknikleri

Infrared spektroskopisi için hazırlanan numune; katı, sıvı, çözelti ve gaz halinde olabilir. İncelenen numunenin yapısına bağlı olarak örnek hazırlama yöntemleri değişir. Bütün fazlarda, örnek kaplarınının KBr, NaCl gibi alkol halojenürlerden IR ışınını geçiren malzemelerden yapılmış olması gerekir. Bunlar

nem çekici maddelerdir. Bu yüzden kuru ortamda çalışılmalıdır (Lambert ve ark. 1987).

1.12. Katıların IR Spektrumunun Alınması

Katıların spektrumu katı halde veya çözelti haline getirilerek alınır. Madde katı haldeyken, dimerleşme ve moleküller arası hidrojen bağları verebilir. Çözelti halindeyken ise çözücü molekülleriyle çeşitli şekillerde etkileşebilir. Eğer her iki halde de etkileşme yoksa iki halin spektrumları birbirinin aynı olur. Bu nedenle bir maddenin katı ve çözelti hallerinin spektrumlarının alınması, yapısı hakkında daha yararlı bilgiler verebilir.

Bir maddenin katı halinin spektrumu genellikle Nujol (sıvı parafin), heksaklorobütadien veya potasyum bromür içinde alınır. Bu amaçla madde iyice toz haline getirilir. Işın yansımaları ve dağılmasını önlemek amacıyla maddenin parçacıklarının boyutları kullanılan ışınların dalga boyundan daha küçük olmalıdır. Maddenin gerçek spektrumunu ortaya çıkarmak için alınan spektrumundan, bu spektrumda kullanılan yardımcı maddenin (Nujol gibi) spektrumu çıkarılır (Gündüz 2005).

Katı numunelerde; 2 çeşit örnek hazırlama tekniği kullanılabilir. Tablet hazırlama tekniği; bu teknikte bir mg'lık (5-10 mg) incelenecek katı numune 50-100 mg KBr ile karıştırılır. Bu karışım agot havanda öğütülerek tanecik boyutu küçültülür ve 10 ton gibi yüksek basınç ve basınç altında sıkıştırılarak tablet haline getirilir (Lambert ve ark.1987).

Ortam olarak kullanılan KBr'nin avantaj sağlayan yönleri şöyledir:

- 1-KBr; IR alanında absorpsiyon yapmaz.
- 2-KBr ile yapılan numune diskleri uzun süre muhafaza edilebilir.
- 3-Maddenin konsantrasyonu istendiği gibi ayarlanabilir.

Ancak, KBr'nin iyi olmayan yönleri de vardır. Bunlarıda başlıca şöyle özetlemek mümkündür:

1-Disk yapma sırasında maddenin simetri özellikleri değişebilir.

2-KBr nem çekici özellikte olduğundan, dikkat edilmesi gerekir. Eser oranda absorbe edilen su OH bölgesinde pik verir ve spektrumu karıştırır (Gündüz 2005).

1.12.1. Disk Haline Getirme Tekniği

Numuneyi disk haline getirme tekniğinde; analiz edilmek istenen maddeden yaklaşık 1mg. alınıp agat bir havanda iyice toz haline getirilir. Bunun üzerine yaklaşık 100mg. potasyum bromür konulur ve yine iyice ezilerek ince, homojen bir karışım yapılır. Bu karışımdan uygun miktarda alınarak preste ince şeffaf disk haline getirilir. Disk yapılırken daha yüksek basınçlarda daha iyi disk olacağı düşüncesine kapılmamalıdır. Çünkü, gereğinden fazla olan basınç diskte yıldız şeklinde çatlamalara yol açar. Diskin yapıldığı kısmın havası alınır, içinde hava kabarcıkları da kalmaz. Numuneyi disk haline getirmede dikkat edilecek en önemli nokta, disk yapılacak parçacıkların büyüklüklerinin, kullanılan ışınların dalga boylarından büyük olmamasıdır. Parçacıklar, kullanılan ışınların dalga boylarından daha büyük olursa, ışının büyük bir kısmı etrafa yayılır yani saçılma olur (Gündüz 2005).

1.12.2. Süspansiyon Haline Getirme Tekniği

Süspansiyon haline getirme tekniğinde 3-5 mg. kadar numune agat bir havanda iyice ezilir. Üzerine nujol denilen saf parafinden 1-2 damla konulur ve yine iyice karıştırılır. Bu şekilde hazırlanmış olan süspansiyondan bir küçük damla NaCl veya KBr diskinin üzerine akıtılır. Üzerine aynı maddeden ikinci bir

disk kapatılarak süspansiyonun diskler arasında düzgün bir şekilde yayılması sağlanır. Bu işlem yapılırken elle disklerin sadece yan kenarlarından tutulur, hiç bir zaman ışın demetlerinin geçtiği yüzeylere elle dokunulmamalıdır. Disklerin çapı genellikle 1-2 cm. , kalınlıkları da 0.2-0.4 cm. kadardır. Diskleri temizlemek için genellikle susuz polar olmayan çözücüler kullanılır. Diskler temizlenir temizlenmez ince ve yumuşak bir kağıtla kurutulur. Aksi halde diskler üzerinde su toplanır ve diski çözer (suda çözünmeyen diskler hariç). Diskler kurutulduktan sonra bir desikatörde muhafaza edilir. Gerek süspansiyon, gerekse potasyum bromür diskleri özel olarak yapılmış metalik çerçeveye yerleştirilerek spektrum alınır. Diskler kapiller olayı ile birbirlerine tutunurlar (Gündüz 2005).

1.12.3. Çözelti Haline Getirme Tekniği

Bir maddenin spektrumunu almak için kullanılan yollardan biri de, onu uygun bir çözücüde çözelti haline getirmektir. Bunun için maddenin oldukça derişik bir çözeltisi hazırlanır (%0,1-10 gibi). Dikkat edilmesi gereken nokta; kullanılan çözelti, numunenin koyulacağı pencereyi çözebilecek yapıda olmamalıdır (Gündüz 2005).

Çözelti hazırlanacaksa, çözücü seçimi önemlidir. Çözücünün IR ışınlarını absorblamayan bir çözücü olması gerekir. Bu çözücüler proton içermeyen ve polar olmayan çözücülerdir. Örneğin CCl_4 , CS_2 IR de çözücü olarak kullanılabilir (Tablo 1.5.). Fakat tüm IR ışınlarını geçiren tek çözücü bulmak mümkün değildir. Bu yüzden spektrumun farklı bölgeleri için farklı çözücüler kullanarak spektrumları kaydetmek gerekir. Daha sonra da her bir spektrumdan elde edilen bilgiler toplanarak molekülün yapısı aydınlatılmaya çalışılır.

Diğer teknik; mineral yağlar içerisinde asılı hale getirme tekniği, incelenecek katı numune nujal gibi bir mineral yağla karıştırılarak katı taneciklerin yağı içerisinde dağılmasını sağlanır ve bu karışım sıvılar için

kullanılan örnek kabına konularak spektrum kaydedilir. Fakat burada kullanılan mineral yağında IR ışınlarını absorblayabileceği dikkate alınmalı ve yağa ait IR pikleri fark alınarak spektrumdan çıkarılmalıdır.

Bazı boyalar, polimerler, yapışkanlar gibi viskozitesi yüksek maddelerin IR spektrumlarının kaydedilmesi için IR ışınlarının kırılma indisi yüksek bir malzeme içinde tam yansıma ile ilerlemesinden yararlanır. Burada incelenecek örnek kırılma indisi yüksek malzeme ile dıştan temas halindedir.

Burada IR ışınları kırılma indisi yüksek malzeme içinde tam yansıma ile ilerlerken yansımanın olduğu her bir ana yüzeyde dıştaki örnekle etkileşir ve IR ışınları absorblanır. Böylece maddenin IR spektrumu kaydedilebilir. Bu yöntem iç yansıma spektroskopisi (IRS) veya azalan tam yansıma spektroskopisi (ATR) denir (Gündüz 2005).

1.13. Sıvıların IR spektrumları

Numune sıvı halde ve uygun bir çözücüsü de bulunamamışsa, bir disk üzerine küçük bir damla alınır ve aynı cinsten iki disk arasında çok ince (genellikle 0,01 mm. kadar) bir film haline getirilir. Sıvı fazdaki numunelerde 2 durum vardır. Saf sıvı haldeki numune ya da çözelti halindeki numune olabilir. Saf sıvılar için kalınlığı yaklaşık 0,02 mm, çözeltiler için 0,5 mm kalınlığındaki örnek kapları kullanılır (Gündüz 2005; Lambert ve ark.1987).

1.14. Gazların IR spektrumları

Düşük sıcaklıkta kaynayan maddelerin ve gazların spektrumları özel olarak yapılmış vakumlu numune kaplarında alınır. Uzun silindir biçimindeki örnek kapları kullanılır. Bu kap içinde ışının örnekle etkileştiği yolu arttırmak için ışını yansıtarak ilerleten aynalar kullanılır. Gazlarda ışın demetinin geçtiği yoldaki

absorplatici tanecikler çok az olduğundan, ışın demetinin yolu aynalarla metrelerce uzatılır (Gündüz 2005; Lambert ve ark.1987).

Tablo 1.5.Bazı çözücülerin IR geçirgen (en az %75) oldukları aralıklar (Gündüz 2005)

| Çözücü | IR geçirgen oldukları aralık |
|-------------------|---|
| Karbondioksit | 5000-1300 cm^{-1} (1mm) |
| Karbondisülfür | 1300-625 cm^{-1} (1mm) |
| Kloroform | 3000-1300 cm^{-1} (1mm) |
| Sikloheksan | 2700-1600 ve 850-700 cm^{-1} (1mm) |
| Benzen | 3000-2000 ve 1000-780 cm^{-1} (1mm) |
| Dioksan | 810-700 cm^{-1} (1mm) |
| İsopropanol | 3200-1540 cm^{-1} (1mm) |
| Metil siklopentan | 2800-1480 cm^{-1} ve 1350-980 cm^{-1} (1mm) |
| Tetrakloroetilen | 3600-1370 cm^{-1} (1mm) |
| Su | 2930-1750 ve 1580-930 cm^{-1} (0,01mm) |
| Aseton | 2900-1800 ve 1080-910 cm^{-1} (0,1mm) |

1.15. İnfared Spektroskopisinin Bakteri Hücrelerinin Yapısını İncelemede Avantajları

Son yıllarda mikrobiyolojik analizlerde yeni, hassas ve artan kesinlikte teknikleri ortaya çıkmıştır. Bu teknikler: Moleküler spektroskopiler FTIR, MS,

GC, HPLC' dir. Bu gelişmeler; mikrobiyolojideki moleküler genetik tekniklerin ilerlemesi ile yaşanmıştır. Bakteriler az sayıda morfolojik şekilde olmalarına rağmen (kok, çubuk, spiral, küre) kimyasal içerik ve yapıları çok çeşitlidir. Prokaryotik bakterilerin sitoplazmik yapıları hayvanlar, bitkiler, mayalar ve funguslardan oldukça basit olmasına rağmen plazma zarının dış tarafı çok kompleks ve farklı yapılardan oluşur. Orta infrared bölgede $4000-1000\text{ cm}^{-1}$ arası görülen absorpsiyon bantları moleküldeki fonksiyonel grup ve bağlara aittir. 1400 cm^{-1} den düşük dalga boylarındaki IR absorpsiyon bantları molekül yapısındaki özel bir grup atomdan değil molekülün iskeletsel titreşimlerinden kaynaklanır. Pek çok biyolojik molekülün orta bölge spektrumu daha önce elde edilen veri tabanları ve literatürler sayesinde bilinmektedir ve bilinmeyen saf bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Mantsch 1996).

1.16. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR)

İnfrared spektroskopisi biyolojik moleküllerin çalışılmasında güçlü bir teknik olarak görülmektedir ve bu yöntemin biyolojik problemlerin çözülmesindeki kullanımı, İnfrared spektroskopisinin bir çeşidi olan FT-IR'nin de bulunmasıyla giderek artmıştır. İnfrared spektroskopisinin en büyük avantajlarından birisi de her örneğin, her aşamada çalışılmasına olanak sağlamasıdır. Sıvı, katı, gaz, toz, fiber pek çok yüzey uygun preparasyon metodu uygulanarak incelenebilmektedir. Proteinler, peptidler, lipitler, biyomembranlar, karbonhidratlar, farmasötikler, gıda maddeleri, bitki ve hayvan dokuları başarılı bir şekilde infrared spektroskopisiyle analiz edilebilmektedir (Stuart 1997).

Proteinlerin ve polipeptidlerin yapılarının anlaşılması için spektroskopi kullanımı 1950'lere dayanmaktadır. 1970'lerde araştırmacılar bu tekniği protein yapı dinamiklerini daha iyi anlamak için hidrojen dötaryum değişimini gözlemlenmekte kullanmışlardır. IR spektroskopisi daha sonraki yıllarda nükleik

asit, lipit ve karbonhidratların incelenmesinde de kullanılmıştır (Beekes ve ark. 2007).

Lipidler, proteinler, peptidler, biyomembranlar, nükleik asitler, hayvan dokuları, mikrobiyal hücreler, bitkiler ve klinik numuneler infrared spektroskopisiyle başarılı bir şekilde çalışılmıştır. Mikroskopik yöntemler diğer çok yönlü analitik yöntemlerle birleştirildiği zaman kompleks örneklerin mikron boyutlarında incelenmesine olanak sağlamaktadır (Stuart 1997).

Bir örneğin IR spektrumu; örneğin içinden geçen yoğun IR radyasyonuyla elde edilmektedir. Spektrumdaki karakteristik dalgalar, yoğunluk ve bant genişlikleri; moleküllerdeki fonksiyonel grupların belirlenmesinde ve biyolojik moleküllerdeki farklı yapıların belirlenmesinde kullanılmaktadır. IR spektroskopisi proteinlerin yapısal özelliklerinden bilgi elde edilmesinde kullanılan ilkin analitik metodlardan birdir. 1950'lerin başlarında IR spektrumundaki polipeptid ve ikincil yapılarının oluşturduğu spesifik bantların yerleriyle aralarında bir bağlantı olduğu görülmüştür (Beekes ve ark. 2007).

1.16.1. FT-IR'nin Mikrobiyolojide Kullanımı

-Hücresinin kimyasal yapısı ve hücre bileşenleri: Bakteriler sınırlı sayıda morfolojik formda olabilmelerine rağmen kimyasal yapı ve bileşenleri çok çeşitlidir. Prokaryotlar (Bakteriler); Hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve fungiden (ökaryotlar) daha basit yapıda olsalar da plazma membranlarının dışında oldukça karmaşık ve farklı yapıları içerirler. Bu grupların hücrelerinin kimyasal yapısı ve hücre bileşenlerini incelemede FT-IR büyük avantaj sağlar.

-Bakterilerdeki taksonomik çalışmalar: Prokaryotların taksonomisi; bakterilerin ayırımını, sınıflandırılmasını ve identifikasyonunu içerir. Taksonomide kullanılan klasik yöntemler; mikroskopik ve renklendirme tekniklerine ek olarak; katabolik

reaksiyonları inceleme, besin maddelerinin kullanımı, ürettikleri metabolitler ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarıdır.

Bakteriyal çeşitlilik her zaman biyokimyasal çeşitlilik demektir. Bu da FT-IR spektroskopisinin taksonomik çalışmalar için çok değerli bir teknik olduğunu ortaya koyar çünkü FT-IR spektrumu, hücrenin sahip olduğu biyokimyasal kompozisyon hakkında bilgi verir. Bakteriyal FT-IR spektrumlarının karmaşık olması nedeniyle elde edilen veriler, Ana Bileşenler Çözümlemesi (Principal Component Analysis= PCA), faktör analiz teknikleri, kümeleme analizi, yapay nöral ağlar ve çeşitli veritabanı arama algoritmalarıyla birlikte daha anlaşılabilir sonuçlar vermektedir. FT-IR spektroskopisiyle bakterilerin cins, tür ve hatta suş seviyesinde bile ayırımları yapılabilmektedir.

-Belirli hücre bileşenlerinin belirlenmesi ve identifikasyonu: Şarbon hastalığı etmeni *Bacillus anthracis*'de virulensin gerçekleşmesine neden olan poliglutamik asit kapsülü bulunmaktadır. Bu kapsülün varlığı FT-IR spektroskopisi ile belirlenebilmektedir. Ayrıca endosporların oluşumu, β poli-hidroksibütirat ve glukojen benzeri depo maddelerinin belirlenmesinde de kullanılabilir.

FT-IR tüm bunlara ek olarak ilaç-hücre etkileşimlerinin izlenmesinde, biyofilm yapılarının analizinde, ve canlı bakterilerin membranlarının analizinde de kullanılabilir (Mantsch 1996). Ayrıca enfeksiyonlardan sorumlu mikroorganizmaların identifikasyonunda da hızlı bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Stuart 2004). Biyolojik FT-IR spektrumunun bant frekansları Tablo 1.6. ve Tablo 1.7. de gösterilmektedir.

Biyolojik FT-IR Spektrumunun Bant Frekansları

Tablo 1.6. Biyolojik FT-IR analizi bant frekansları (Beekes ve ark. 2007, Garip ve ark. 2007)

| Frekans (cm ⁻¹) | Karşılık geldiği molekül yapıları |
|-----------------------------|---|
| ~3500 | Hidroksil gruplarında O–H gerilimi |
| ~3200 | Proteinlerin N–H gerilimi |
| ~3307 | Polisakkarit ve proteinlerde N–H ve O–H titreşimi |
| 2959 | Yağ asitlerindeki metil gruplarında asimetric CH ₃ titreşimi |
| 2934 | CH ₂ gruplarında C–H titreşimi |
| 2927 | Yağ asitlerinde metilen gruplarında asimetric CH ₂ titreşimi |
| 2876 | Yağ asitlerindeki metil gruplarında simetric CH ₃ titreşimi |
| 2857 | Yağ asitlerinde metilen gruplarında simetric CH ₂ titreşimi |
| 1741-1715 | Esterlerde, karbonik ve nükleik asitlerde C=O titreşimi |
| ~1655 | α -Heliks yapısına ait Amid 1 |
| ~1637 | Amid 1 |
| 1548 | Amid 2 |
| 1515 | Tirozin bandı |
| 1468 | CH ₂ 'de C–H deformasyonu |
| ~1400 | COO ⁻ 'da simetric C=O titreşimi |
| 1310-1240 | Proteinlerde Amid 3 band bileşenleri |
| 1250-1220 | Fosfodiesterlerde P=O titreşimi |
| 1200-900 | C–O–P, P–O–P karbonhidratlarında C–O–C, C–O |
| 1085 | PO ₂ ⁻ 'de P=O titreşimi |
| 900-600 | Parmak izi bölgesi |

Tablo 1.7. FT-IR biyolojik bant frekansları (Schmitt ve Flemming 1998)

| | Wavenumber [cm ⁻¹] | Bant Girişimleri |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| 1 Yağ asiti Bölgesi | 3400 | OH of water |
| | 2956 | CH ₃ asym. stretch |
| | 2920 | CH ₂ asym. stretch |
| | 2870 | CH ₃ sym. stretch |
| | 2850 | CH ₂ sym. stretch |
| 2 Protein Bölgesi | 1745/1735 | >C=O stretch, Ester, fatty acids |
| | 1705 | >C=O stretch, Ester, carboxylic groups |
| | 1652-1648 | Amide I, (C=O) different conformation |
| | 1550-1548 | Amide II, N-H, C-N and structure of proteins |
| 3 Karışık Bölge | 1460-1454 | C-H bend. from CH ₂ |
| | 1400-1398 | C-O bend. from carboxylate ions |
| | 1303 | Amide II (C-N) |
| | 1240 | P=O from phosphate |
| | 1222 | P-O |
| | 1114 | C-O-P, P-O-P |
| | 1085 | ring vibrations |
| 4 Polisakkarit Bölgesi | 1052 | C-O, C-O-C from polysaccharides |

Orjinal bir biyofiziksel metod olan FT-IR; biyokimya ve ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrobiyolojideki güncel uygulamalar ve prion çalışmalarındaki sonuçlar bu tekniğin hızlı ilerleyişinin bir kanıtıdır. FT-IR spektroskopisi; mikroorganizmaların tanımlanmasında, klinik tıpta ve biyoterörizmin önlenmesinde kullanılan çok güçlü bir tekniktir. Sadece bunlarla sınırlı olmamakla birlikte pek çok farklı kullanım alanı vardır (Tablo 1.8.). Patolojik prion proteininin yapısal özelliklerini açıklamada, sinir dokusu ve kanda prionların neden olduğu moleküler değişiklikleri açıklamada kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarla yapılan ağır metal biyosorpsiyonunda; hücre yüzeyindeki ağır metal tutma bölgelerinin saptanmasında da kullanılabilir (Preisner ve ark. 2007).

Tablo 1.8. Literatürdeki Mikrobiyolojik FT-IR Çalışmaları (Garip ve ark. 2009)

| Çalışılan Mikroorganizmalar | Yıl | Referans | Makalenin Orjinal Adı |
|--|------|---------------------|---|
| <i>Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium, Legionella</i> species ve <i>Escherichia coli</i> | 1990 | Helm ve ark. | Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy |
| <i>Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus thuringiensis</i> | 1998 | Beattie ve ark. | Discrimination among <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> and some other species of the genus <i>Bacillus</i> by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy |
| <i>Candida albicans</i> | 2000 | Orsini ve ark. | FT-IR microspectroscopy for microbiological studies |
| <i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida</i> , ve <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 2001 | Filip ve ark. | An attempt to differentiate <i>Pseudomonas</i> spp. And other soil bacteria by FT-IR spectroscopy |
| <i>Enterococcus</i> türleri (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> ve <i>E. hirae</i>) | 2003 | Guibet ve ark. | Discrimination and classification of <i>Enterococci</i> by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114, <i>L. innocua</i> ATCC 51742, <i>L. innocua</i> ATCC 33090, ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 | 2004 | Lin ve ark. | Discrimination of Intact and Injured <i>Listeria monocytogenes</i> by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis |
| <i>Streptococcus crista, Strep. salivarius</i> ve <i>Strep. Rattus</i> | 2004 | Van der Mei ve ark. | Grouping of oral streptococcal species using fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 2004 | Filip ve ark. | FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated <i>Bacillus subtilis</i> |
| <i>Lactobacillus, L. sakei, L. plantarum, L. curvatus</i> ve <i>L. paracasei</i> | 2004 | Oust ve ark. | FT-IR spectroscopy for identification of closely related <i>lactobacilli</i> |

| Tablo 1.8. (Devam) Literatürdeki Mikrobiyolojik FT-IR Çalışmaları (Garip ve ark. 2009) | | | |
|--|------|--------------------|---|
| <i>Acinetobacter</i> türleri | 2004 | Winder ve ark. | The rapid identification of <i>Acinetobacter</i> species using Fourier transform infrared spectroscopy |
| <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , ve <i>Candida kefyr</i> | 2005 | Essendoubi ve ark. | Rapid identification of <i>Candida</i> species by FT-IR microspectroscopy |
| <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> ve <i>Listeria spp.</i> | 2006 | Al-Holy ve ark. | Classification of foodborne pathogens by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and pattern recognition techniques |
| <i>Campylobacter coli</i> ve <i>Campylobacter jejuni</i> . | 2006 | Mouwen ve ark. | Artificial neural network based identification of <i>Campylobacter</i> species by Fourier transform infrared spectroscopy |
| <i>S.arlettae</i> , <i>S.capitis</i> , <i>S.caprae</i> , <i>S.carnosus</i> , <i>S.epidermis</i> , <i>S.equorum</i> , <i>S.felis</i> , <i>S.gallinarum</i> , <i>S.lentus</i> , <i>S.intermedius</i> , <i>S.pasteuri</i> , <i>S.pulvereri</i> | 2006 | Lamprell ve ark. | Discrimination of <i>Staphylococcus aureus</i> strains from different species of <i>Staphylococcus</i> using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Citrobacter koseri</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , ve <i>Enterococcus faecium</i> | 2006 | Sandt ve ark. | FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens |
| <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> ve <i>Streptococcus</i> türleri | 2007 | Dziuba ve ark. | Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis |
| <i>Listeria monocytogenes</i> örnekleri | 2007 | Oust ve ark. | FT-IR microspectroscopy: apromising method for the rapid Identification of <i>Listeria</i> species |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2007 | Amiali ve ark. | Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate <i>S. A</i> |

| Tablo 1.8. (Devam) Literatürdeki Mikrobiyolojik FT-IR Çalışmaları (Garip ve ark. 2009) | | | |
|--|------|----------------------|--|
| <i>Listeria innocua</i> FH, <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> ve <i>Pseudomonas putida</i> | 2008 | Alexandrakis ve ark. | Detection and identification of bacteria in an isolated system with Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> ve <i>Staphylococcus aureus/epidermidis</i> | 2008 | Preisner ve ark. | Uncertainty assessment in FT-IR spectroscopy based bacteria classification models |
| <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> | 2009 | Forrester ve ark. | Chemometric analysis of multiple species of <i>Bacillus</i> bacterial endospores using infrared spectroscopy: Discrimination to the strain level |

1.16.2. FT-IR Bulgularının İstatistiksel Analizi

FT-IR ile yapılan analizlerin spektrumlarının karşılaştırılmasında pek çok farklı istatistiksel yaklaşım uygulanmaktadır. Literatüre baktığımızda geçmişte pek çok araştırmacının FT-IR spektrumlarının istatistiksel analizi için farklı yöntemler kullandıkları görülmektedir. Lin ve arkadaşları (2004) *Listeria* türlerinin identifikasyonunda Ana Bileşenler Çözümlemesi (Principal Component Analysis= PCA) kullanmışlardır. Çalışmalarda kullanılan diğer istatistiksel yöntemler ise Hiyerarşik Kümeleme Analizi (Hierarchical Cluster Analysis=HCA), Kısmi En Küçük Kareler Regresyon Yöntemi (Partial Least Square Regression=PLSR), Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) tekniği, Kanonik Varyete Analizi (Canonical Variate Analysis=CVA), farklı zamanlarda alınan spektrumların kaydedilmesi ve bunların ortalamasının alınarak analiz edilmesi, İnfrared spektroskopisi cihazının spektrumu kendi programı aracılığı ile düzeltilmesi gibi farklı teknikler kullanılarak yapılmıştır (Burgula ve ark. 2007).

FT-IR analiz sonuçlarının bir istatistiksel yöntemle birleştirilerek değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunun için kullanılan istatistiksel yöntemler

olarak Multivaryete İstatistik Analizi (Multivariate Statistical Analysis=MSA), Faktör analizi, Yapay Nöral Ağlar (Artificial Neural Networks=ANN), Hiyerarşik Kümeleme Analizi (Hierarchical Cluster Analysis=HCA) örnek olarak gösterilebilir (Beekes ve ark. 2007).

1.16.3. FT-IR Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları

Modern FTIR cihazlarının kullanımı çok kolay, hızlı, çok hassas ve yüksek bir verimlilikle çalışıyor olmasıdır. FTIR'nin eski versiyonlarına göre dalga boyunun çok daha net okunabildiği, geniş olmayan yani daha kesin pikler elde edilebilmektedir. Bütün bu avantajlarının yanında FTIR'nin bazı yetersizlikleri de var. Bunlar:

- FT-IR; atomları ve tek atomlu iyonları, elementleri, helyum ve argon gibi inert gazları saptayamamaktadır.
- FT-IR; N₂ ve O₂ gibi çift atomlu molekülleri saptayamaz (Bu bazı durumlarda; analiz için vakuma yapmaya gerek kalmadığı için bir avantaj olarak görülebilir).
- Besin maddesi içeren biyolojik numuneler çok kompleks karışımlardır bu yüzden FTIR spektrumları karmaşıktır; üst üste çakışan pikler ve sinyal maskelenmesi gibi durumlar görülebilir.
- Pek çok biyolojik örnek; yüksek bir absorpsiyon bandına sahip ve diğer önemli sinyalleri örtebilecek su içerir. Pek çok örnek hazırlama prosedürleri suyun etkisini en aza indirmeyi gerektirir.
- Çoğu FTIR cihazı tek ışık demetli cihazlar oldukları için; deneyler sırasında çevredeki her hangi bir değişiklik (Karbondiyoksit ve subuharı) spektrumda şüphelere neden olmaktadır.

FT-IR spektrumu analiz etmek için kullanılan çok değişkenli istatistiksel metodlarda, mikrobiyal hücrelerin FTIR absorpsiyon spektrumunun spesifikliği

yüksek parmak izi bölgelerine sahip olduğu görülmüştür. FTIR tür altı kategorilerde bile mikrobiyal karakterizasyonu sağlamıştır. Bunun yanında FTIR metodları güvenilir identifikasyon teknikleri olduğunu da kanıtlamıştır. FTIR spektroskopisi hızlı bir metod olmasının yanı sıra mikroorganizmaların bütün gelişim fazlarında çalışma olanağı verdiği için de antibiyotik duyarlılığı, mikrobiyal metabolizma ve diğer ilaçlarla olan etkileşimlerin çalışılmasına da olanak verir. Klinik mikrobiyoloji çalışmalarında önemli bir potansiyele sahiptir (Sandt ve ark. 2006).

FT-IR; biyokimya ve ilaç çalışmalarında çok amaçlı bir araştırma aracı haline gelmiştir. Mikrobiyolojideki güncel uygulamalar ve prion çalışmalarındaki sonuçlar da bu tekniğin ilerleyişinin güçlü bir kanıtıdır. FT-IR spektroskopisi; mikroorganizmaların tanımlanmasında, klinik tıpta ve biyoterörizmin önlenmesinde kullanılan çok güçlü bir tekniktir. Sadece bunlarla sınırlı olmamakla birlikte pek çok farklı kullanım alanı vardır: Patojik prion proteininin yapısal özelliklerini açıklamada, sinir dokusu ve kanda prionların neden olduğu moleküler değişiklikleri açıklamada kullanılmaktadır (Burgula ve ark. 2007).



Şekil 1.2. Analizde Kullanılan FT-IR Cihazı



Şekil 1.3. FT-IR cihazında numune konulan kısım



Şekil 1.4. Hidrolik Pres Cihazı

2.MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Halofilik Bakteriler

Bu çalışmada toplam 28 adet prokaryotik mikroorganizma kullanılmıştır. Bunlardan 12 tanesi referans kültürler olup; 16 tanesi ise İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilen kültürlerdir. Kültürler ve temin edildikleri yerler Tablo 2.1. 'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan bakteriler ve temin edildikleri yerler

| Arkea | Kaynak | Bacteria | Kaynak |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| <i>Haloferox mediterranei</i> | Josefa Anton, Spain | <i>Halomonas elongata</i> | Josefa Anton, Spain |
| <i>Haloferox alexandrinus</i> | M.Burcin Mutlu, Turkey | <i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 | Josefa Anton, Spain |
| <i>Haloarcula hispanica</i> | Michael Dyall-Smith, Australia | <i>Chromahalobacter salexigens</i> | Josefa Anton, Spain |
| <i>Haloarcula mukohatei</i> | M.Burcin Mutlu, Turkey | <i>Salinibacter ruber</i> | Josefa Anton, Spain |
| <i>Haloarcula marismortui</i> | M.Burcin Mutlu, Turkey | | |
| <i>Haloarcula argentinensis</i> | M.Burcin Mutlu, Turkey | | |
| <i>Halococcus dombrowskii</i> | Helga Stan-Lotter, Austria | | |
| <i>Halorubrum xinjiangense</i> | M.Burcin Mutlu, Turkey | | |

Çalışmada ayrıca Çamaltı Tuzlasından izole edilmiş olan halofilik bakterilerin de karşılaştırılması yapılmıştır.

Daha önce Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmiş Olan Halofilik Bakteriler

Tablo 2.2.. Çamaltı Tuzlasından İzole Edilen Halofilik Bakteri Örnekleri

| Bakteria | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| C12 | C15 | C18 | C19 | C21 | C22 |

| Arkea | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|
| C23 | C24 | C27 | C29 | C37 |
| C43 | C46 | C50 | C51 | C52 |

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.3. %30 luk Tuzlu Su Çözeltisi

| | |
|---|-------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 35 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O..... | 30 g |
| NaBr..... | 0.8 g |
| HNaCO ₃ | 0.2 g |
| KCl..... | 7 g |
| CaCl ₂ | 0.5 g |
| NaCl..... | 240 g |

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.4. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

| | |
|---------------------------------|--------|
| %30'luk tuzlu su çözeltisi..... | 767 ml |
| Saf su..... | 200 ml |
| Pepton..... | 5 g |
| Yeast Ekstrakt..... | 1 g |

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.5. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l)

| | |
|---|----------|
| NaBr..... | 0.65 g |
| HNaCO ₃ | 0.167 g |
| KCl..... | 5.0 g |
| CaCl ₂ | 0.723 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 49.492 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O..... | 34.567 g |
| NaCl..... | 195 g |
| Yeast Ekstrakt | 1-5 g |

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

2.1.6. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l)

| | |
|---|---------|
| NaBr..... | 0.78 g |
| HNaCO ₃ | 0.2 g |
| KCl..... | 6.0 g |
| CaCl ₂ | 0.868 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 59.39 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O..... | 41.48 g |
| NaCl..... | 234 g |

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

2.1.7. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri

| | |
|---|----------|
| NaBr..... | 0.65 g |
| HNaCO ₃ | 0.167 g |
| KCl..... | 5.0 g |
| CaCl ₂ | 0.723 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 49.492 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O..... | 34.567 g |
| NaCl..... | 195 g |
| Yeast Ekstrakt | 1-5 g |
| Agar agar..... | 15g/lt |

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

2.1.8. %30 Deniz Suyu (SW) (g/l) Katı Besiyeri

| | |
|---|---------|
| NaBr..... | 0.78 g |
| HNaCO ₃ | 0.2 g |
| KCl..... | 6.0 g |
| CaCl ₂ | 0.868 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 59.39 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O..... | 41.48 g |
| NaCl..... | 234 g |
| Agar..... | 15 g/lt |

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

2.1.9. %23 MGM Katı Besiyeri

| | |
|---------------------------------|--------|
| %30'luk tuzlu su çözeltisi..... | 767 ml |
| Saf su..... | 200 ml |
| Pepton..... | 5 g |
| Yeast Ekstrakt..... | 1 g |
| Agar agar..... | 15g |

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.2. METOD

2.2.1. Bakterilerin oğaltılması

-80°C'deki %15'lik gliserol ortamında saklanan mikroorganizmalar; %23'lük Modifiye Geliştirme Medium (MGM) sıvı ortamına alınarak canlandırılmaları sağlanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde 150 rpm. de 3-4 gün geliştirildikten sonra katı % 23 MGM ortamına aktararak, petrilere 37 °C 'de bir hafta inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen organizmalardan, bir öze dolusu örnek steril ependorflara alınmıştır. Ependorftaki örneklerin tümü kapakları açık bir şekilde 24 saat bir desikatörde bırakılarak örneklerin içerisindeki suyun uçurulması hedeflenmiştir. Aynı işlem; farklı besiyerlerinin FT-IR profillerine etkisini incelemek amacıyla Sea Water katı besiyerinde tekrarlanmıştır.

2.2.2. Bakterilerin Tablet Haline Getirilmesi

24 saat desikatörde bırakılan içlerindeki su uçurulan örnekler spatül yardımıyla agot havana alınarak (10-60 µg biyomas analiz için yeterlidir), toz haline getirilmiş ve daha sonra üzerine bir miktar KBr (Potassium Bromide for Infrared Spectroscopy-İnfrared Spektroskopisi için KBr/ BDH Spectrosol) eklenerek havanda toz haline getirme işlemine devam edilmiştir. Bu karışım hidrolik presleme makinası yardımıyla yaklaşık 200 atmosfer basınç altında tablet haline getirilmiştir.

2.2.3. Bakterilerin FT-IR Analizi

Elde edilen tabletler Perkin Elmer 100 Series FT-IR 'de incelenmiş ve elde edilen spektrumlar kaydedilmiştir. Çalışmanın tekrar edilebilirliğini incelemek

için her bir mikroorganizma türü 3 ayrı tablet olarak basılmış ve her birinden elde edilen spektrumlar kaydedilmiştir. Hem Sea water katı hem de %23 MGM katı ortamında da geliştirilen mikroorganizmaların FT-IR profilleri kaydedilmiştir.

2.2.4. Bakterilerin FT-IR Profillerinin İstatistiksel Analizi

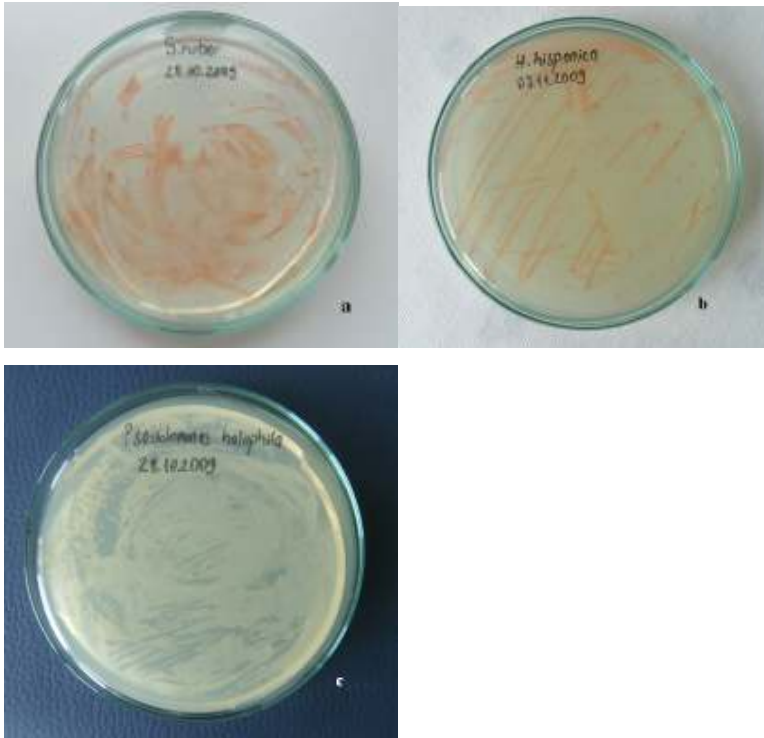
Mikroorganizmaların FT-IR analizlerinin tamamlanıp, profillerinin çıkarılmasının ardından elde edilen spektrumlar FT-IR Perkin Elmer 100 Series İnfrared Spektroskopisinin programı, Essential FT-IR programı ve ACD Labs 10 programı yardımıyla okunmuştur. Spektrumlardaki piklerin sayısal değerleri SPSS 15 analiz programı kullanılarak Anadolu Üniversitesi İstatistik Bölümünden Doç. Dr. Berna YAZICI yardımıyla analiz edilmiştir. SPSS 15 programı kullanılarak Hiyerarşik küme (Hierarchical cluster analyses) analizi yapılmıştır ve aynı program yardımıyla dendogram elde edilmiştir. İkinci bir dendogram çizim programı olarak da Clustan 8 Graphics programı kullanılmıştır ve ikinci bir dendogram elde edilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Bakterilerin oğaltılması

%23 MGM ve %25 Sea Water katı besiyerlerinde geliştirilen referans ve Çamaltı izolatu 28 adet test mikroorganizması 37 °C de 1 hafta inkübasyondan sonra krem, kırmızı, pembe gibi değişik renklerde koloniler oluşturmuştur (Şekil 3.1.)

Referans Kùltürler



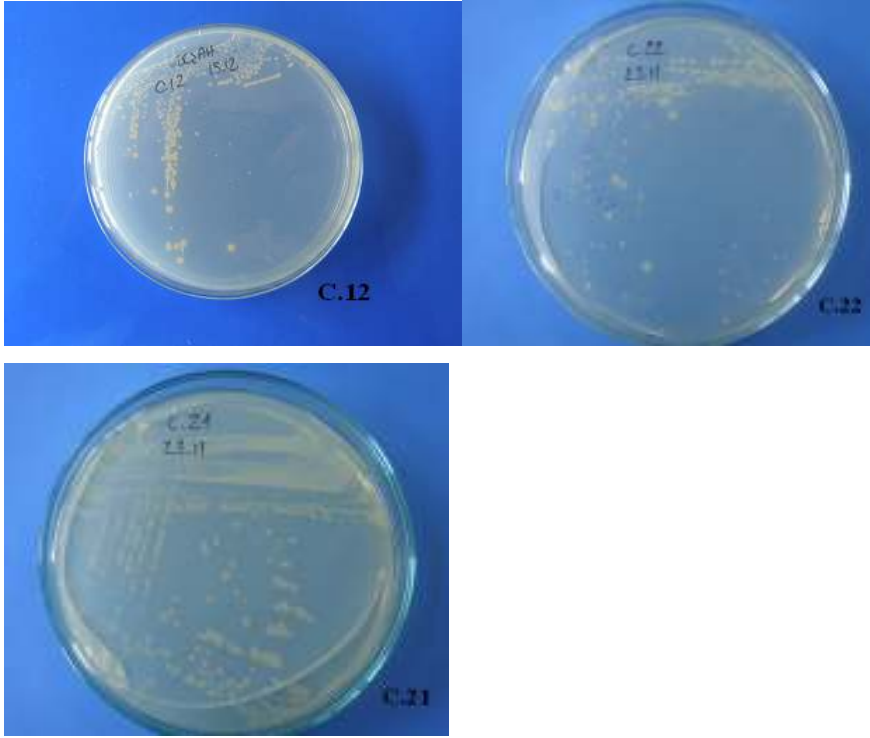
Şekil 3.1. Farklı pigmentasyona sahip referans bakterilerin Sea Water agar üzerindeki görüntüleri

a: *Salinibacter ruber*

b: *Haloarcula hispanica*

c: *Pseudomonas halophila*

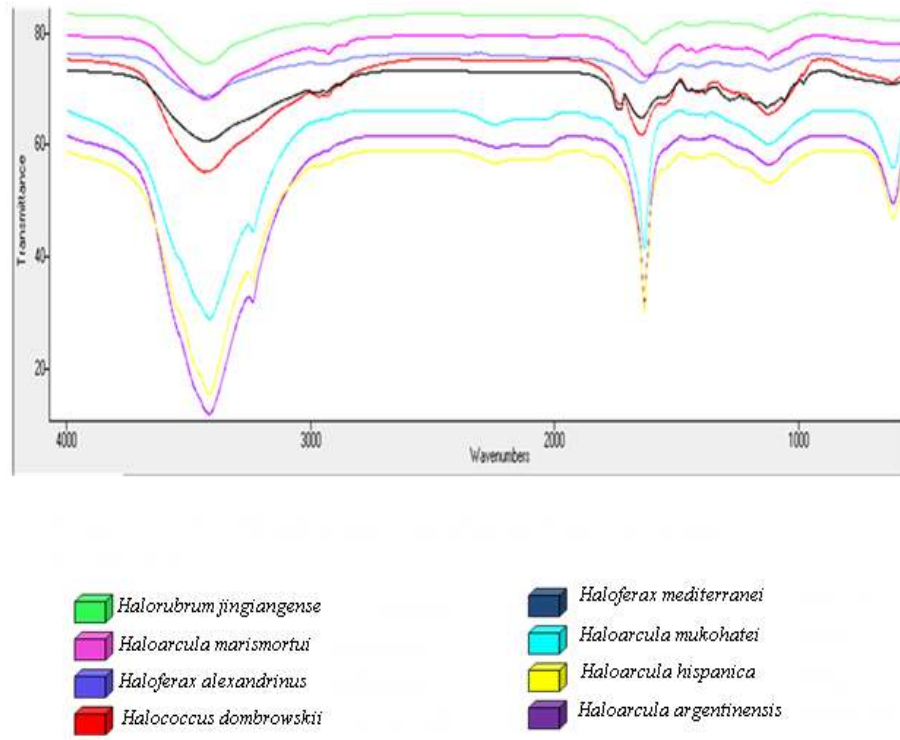
Çamaltı İzolatları



Şekil 3.2. Farklı pigmentasyona sahip izolatların Sea Water agar üzerindeki görüntüleri

3.2. Çalışmada Kullanılan Arkea Üyesi Bakterilerin FT-IR Profilleri

Çalışmada kullanılan referans örneklerden Arkea'ya ait olan bakterilerin FT-IR profilleri aynı şekile konularak karşılaştırılmaları sağlanmıştır. Şekil 3.3.'de görüldüğü gibi tüm bakterilerin FT-IR profilleri birbiri ile örtüşmektedir ve birbirinden farklılık göstermemektedir.



Şekil 3.3. Kullanılan referans Arkea üyelerinin spektrumlarının karşılaştırılması (Sea-Water besiyeri kullanılmıştır).

3.3. Çalışmada Kullanılan Bakteria Üyesi Bakterilerin FT-IR Profilleri

Çalışmada kullanılan referans örneklerden Bakteria'ya ait olan bakterilerin FT-IR profilleri aynı şekilde konularak karşılaştırılmaları sağlanmıştır. Şekil 3.4.'de görüldüğü gibi tüm bakterilerin FT-IR profilleri birbirine benzerlik göstermektedir.



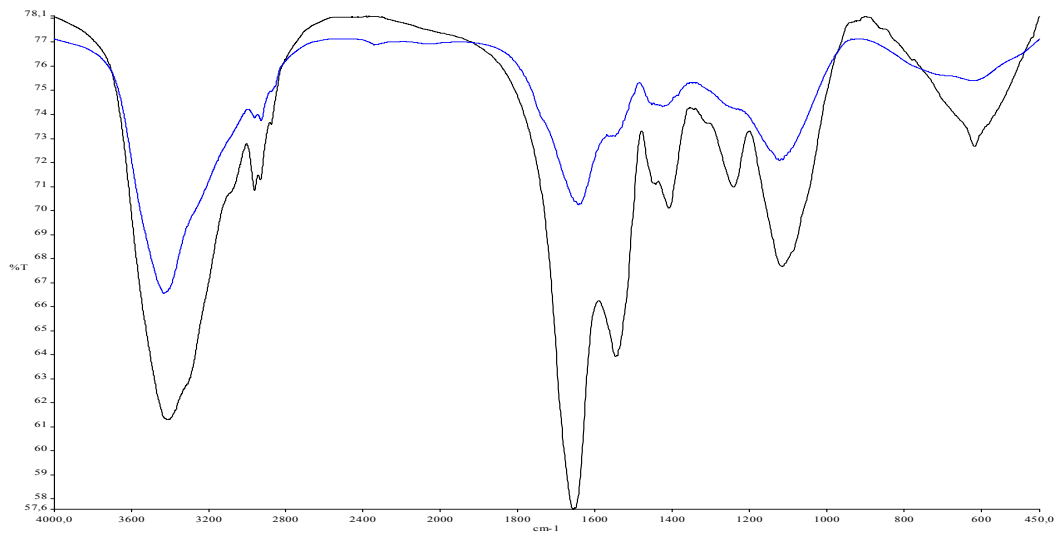
Şekil 3.4. Kullanılan referans Bakteri'lerin spektrumlarının karşılaştırılması (■: *S. ruber*, ■: *P. halophila*, ■: *H. elongata*, ■: *C. salexigens*)

3.4. Farklı Besiyeri Kullanımının Bakterilerin FT-IR Profillerine Etkisi

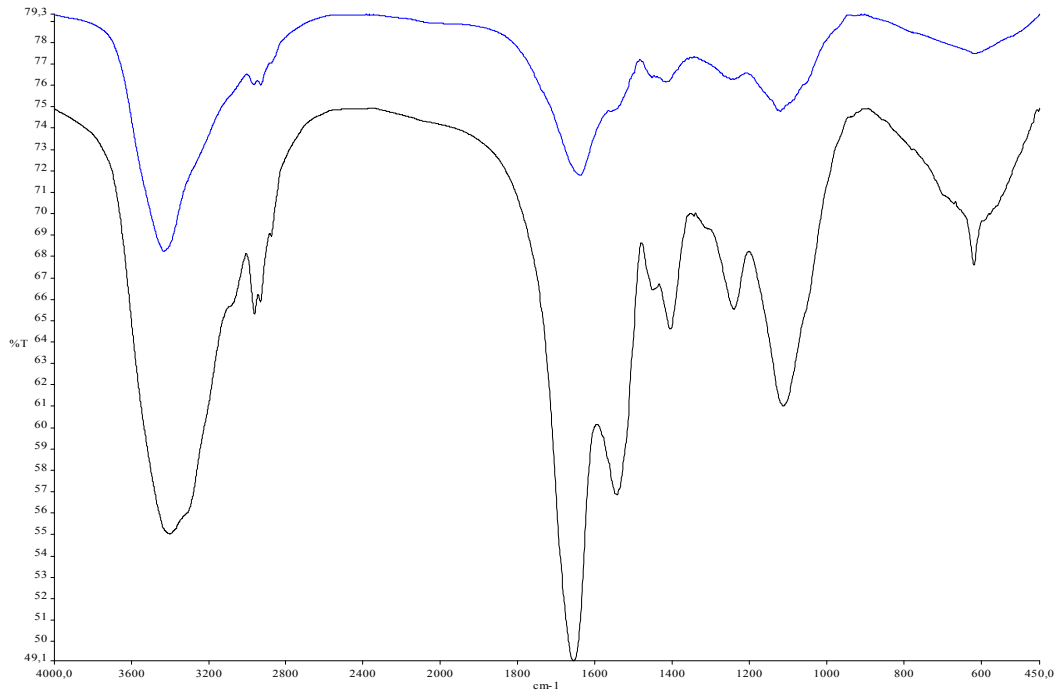
Farklı besiyerlerinin FT-IR profiline etkisini incelemek amacıyla %25 Sea Water ve %23 MGM katı besiyerinde üretilen mikroorganizmaların FT-IR profilleri karşılaştırılmıştır.

3.4.1. Farklı Besiyerleri Kullanılarak Üretilen Arkea Üyesi Halofilik Bakterilerin FT-IR Profillerinin Karşılaştırılması

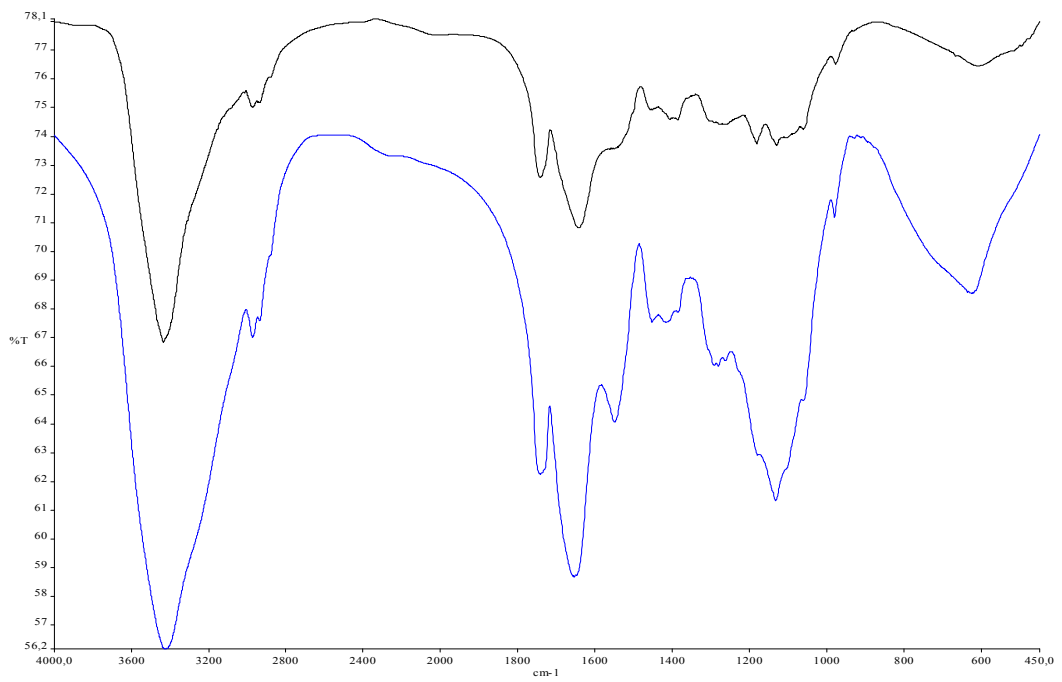
Arkea grubu bakterilerin farklı besiyerlerindeki FT-IR profilleri karşılaştırıldığında; profillerin örtüştüğü açıkça görülmektedir. Aynı tür mikroorganizmaların farklı % T değerine sahip olmaları, tablet için kullanılan biyomas miktarının farklı olmasından ileri gelmektedir (Gündüz 2005). Profillerin geneline bakıldığında aynı dalga boylarında pik verdikleri görülmektedir. Aynı tür mikroorganizma oldukları halde farklı besiyerlerinde, farklılık gösteren dalga boyları şekiller üzerinde işaretlenerek gerekli açıklamalar yapılmıştır.



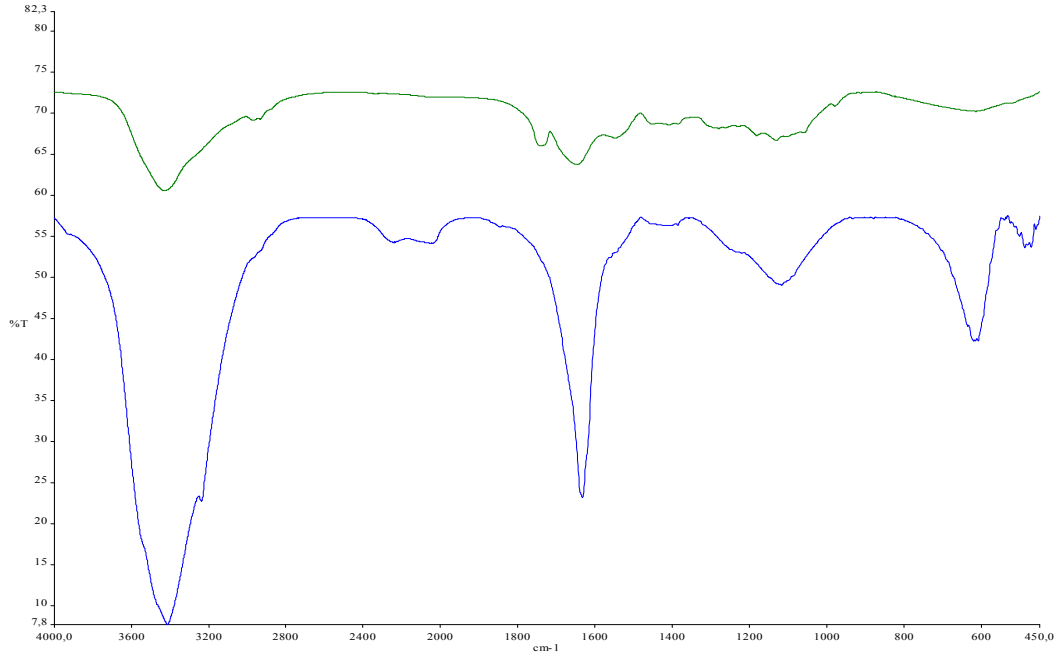
Şekil 3.5. *H.alexandrinus* (■:MGM-Modifiye Geliştirme Medium, ■ Deniz Suyu-Sea Water)



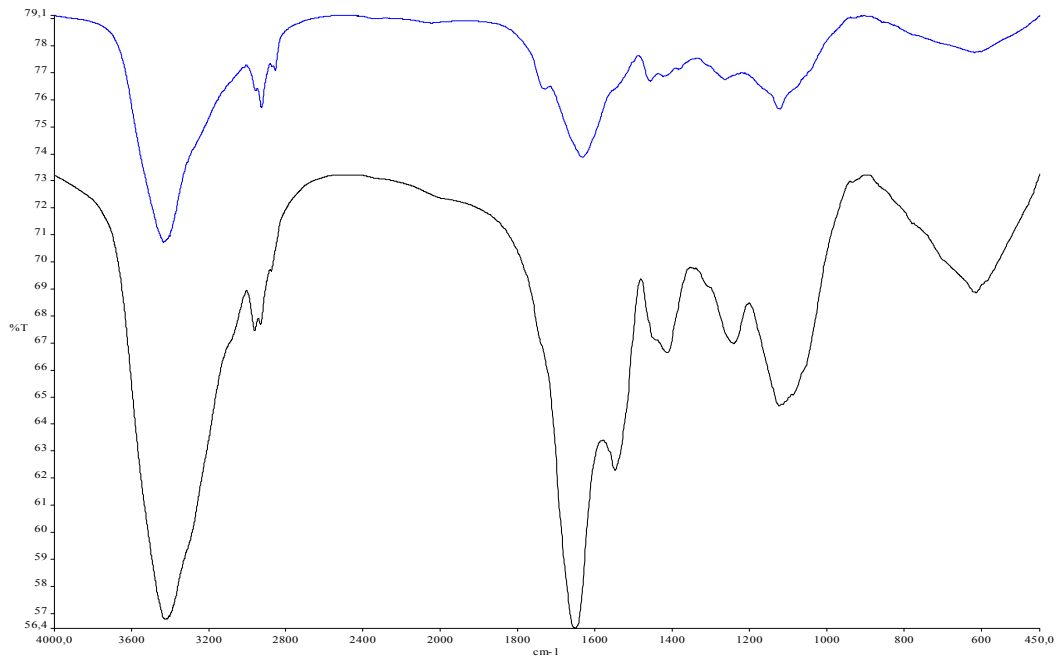
Şekil 3.6. *H. argentinensis*: ■ MGM; ■ Deniz Suyu-Sea Water



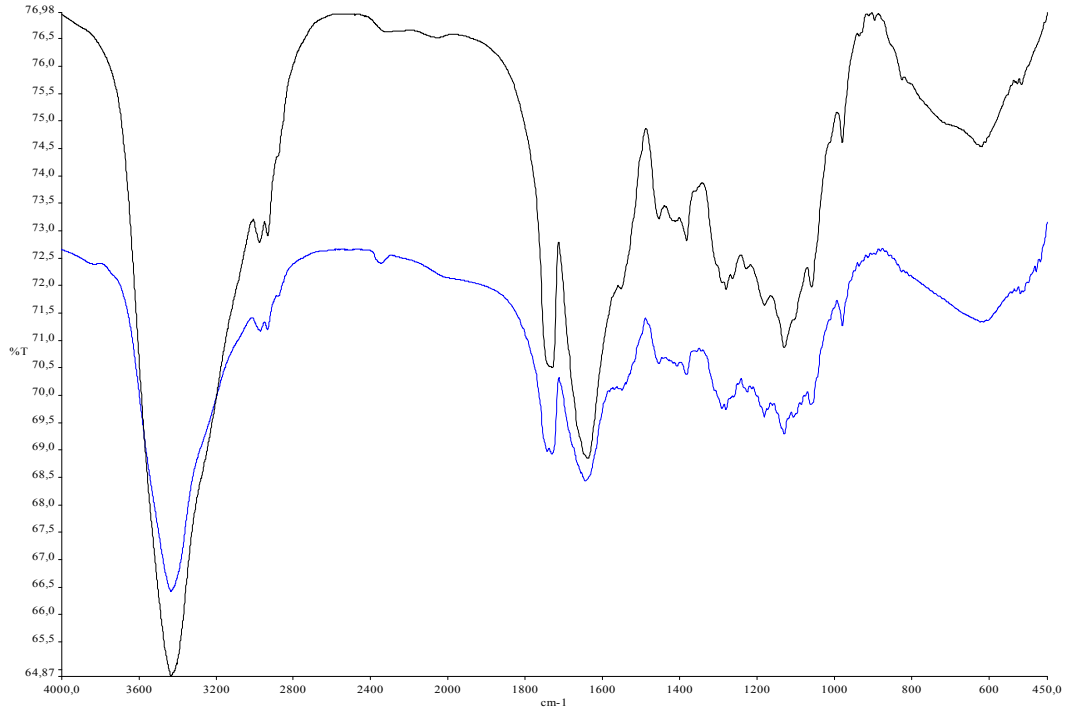
Şekil 3.7. *H. dombrowski*: ■ MGM; ■ Deniz Suyu



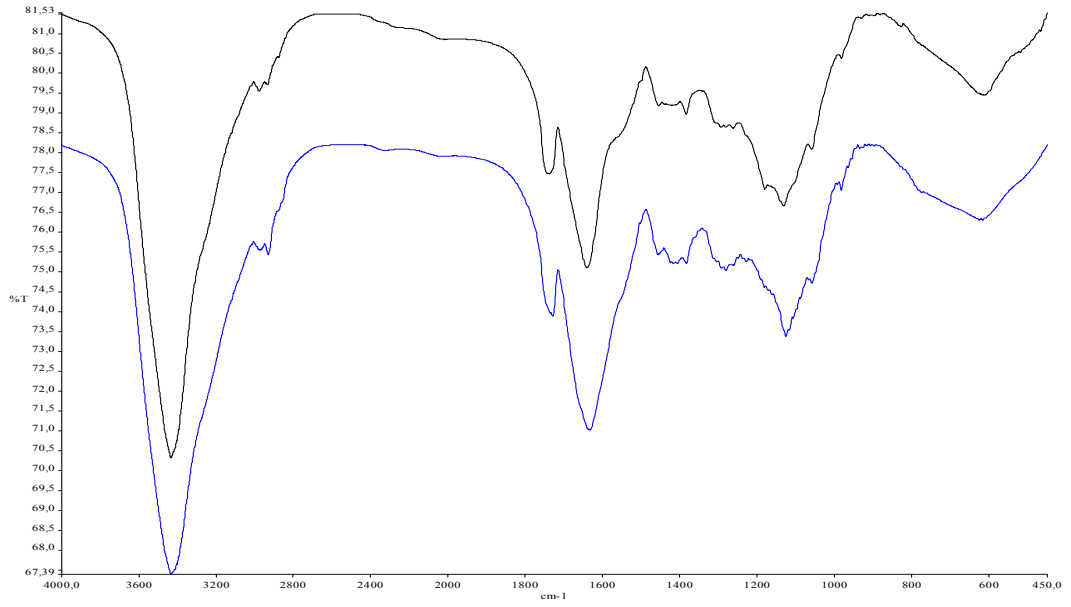
Şekil 3.8. *H. hispanica*: :  MGM;  Deniz Suyu



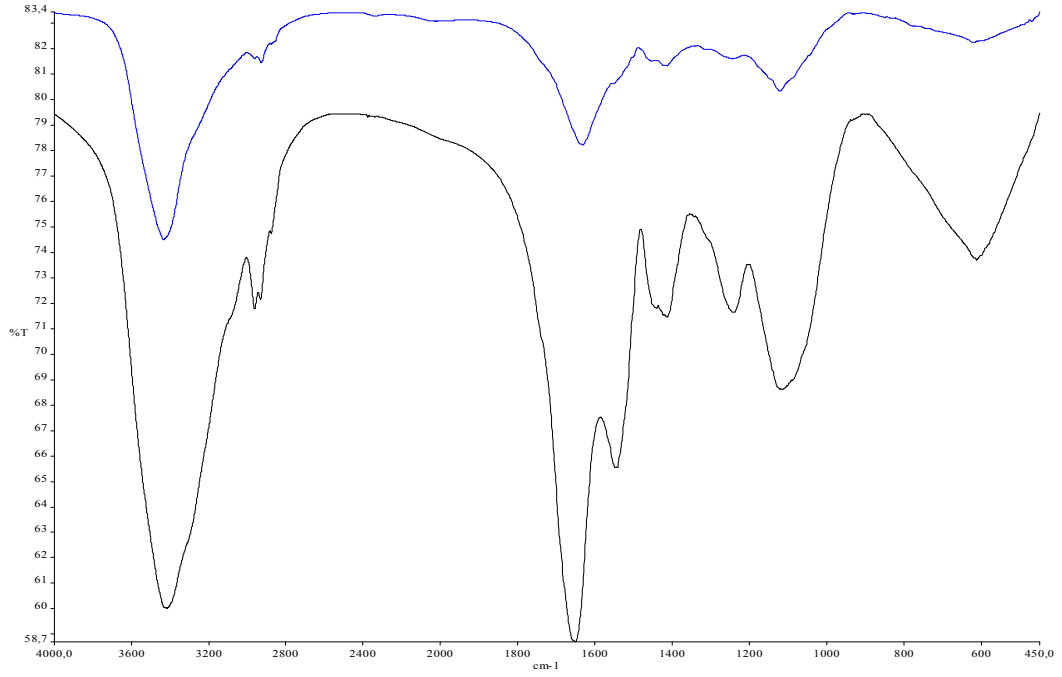
Şekil 3.9. *H. marismortui*:  :MGM;  : Deniz Suyu



Şekil 3.10. *H. mediterranei*: ■ MGM ; ■ Deniz Suyu

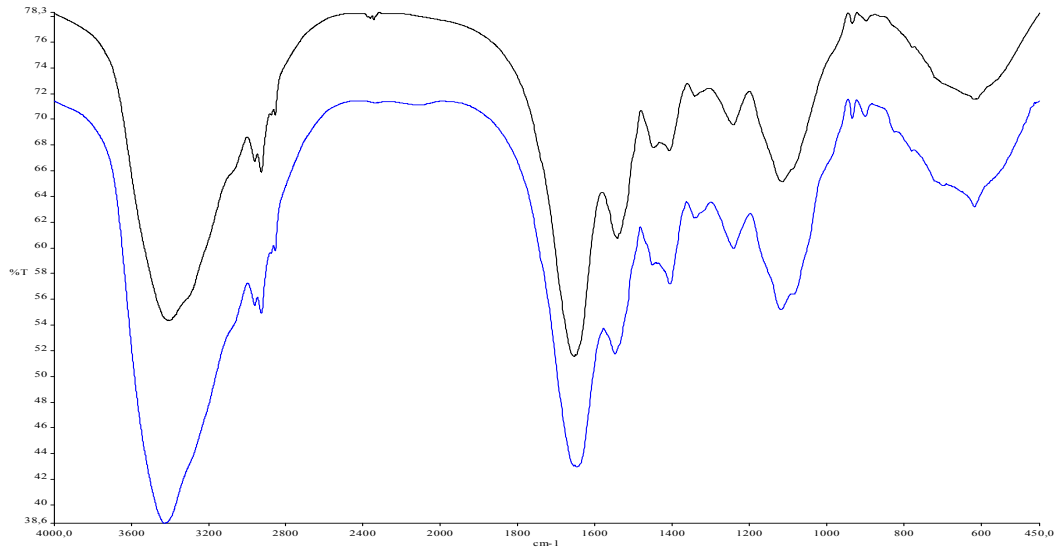


Şekil 3.11. *H. mukohatei*: ■ :MGM; ■ Deniz Suyu

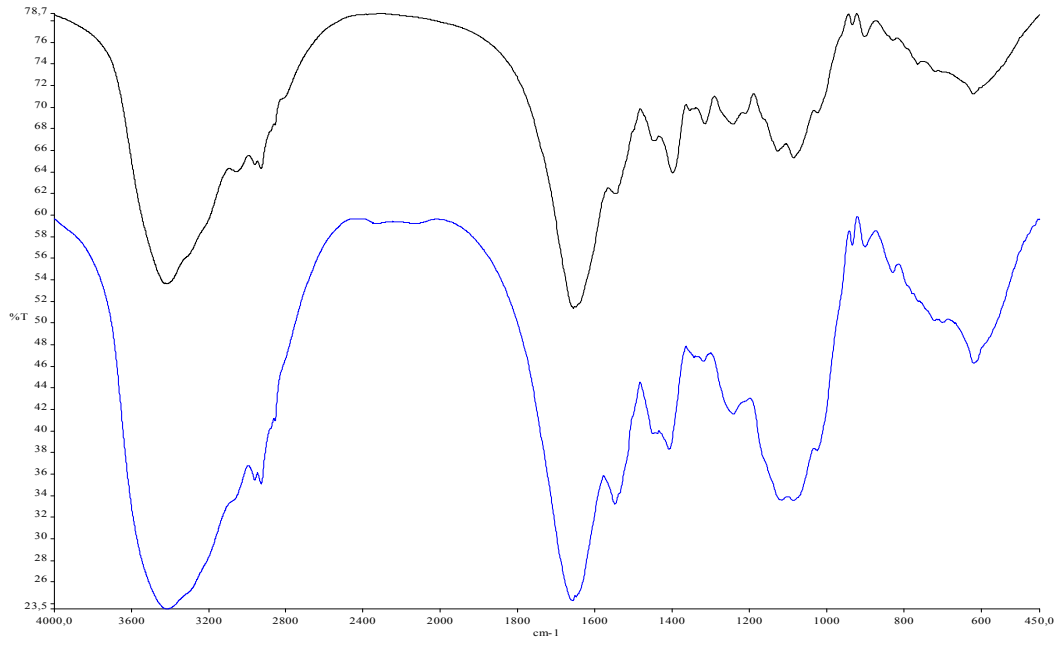


Şekil 3.12. *H.xinjiangense*: :MGM; : Deniz Suyu

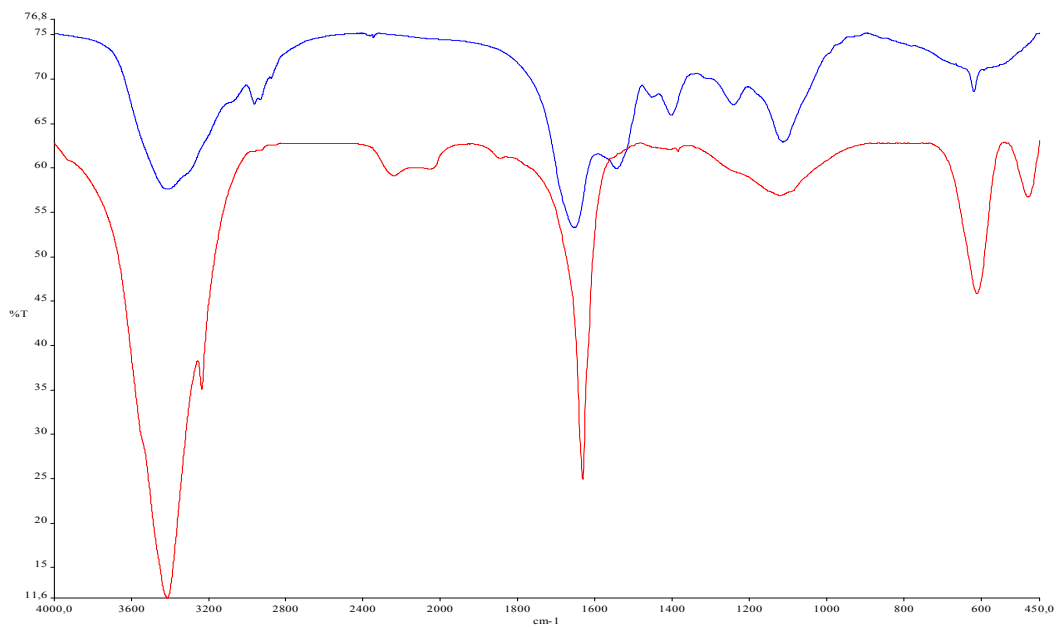
3.4.2. Farklı Besiyerlerinde Üretilen Bakteria Üyesi Halofilik Bakterilerin FT-IR Profillerinin Karşılaştırılması



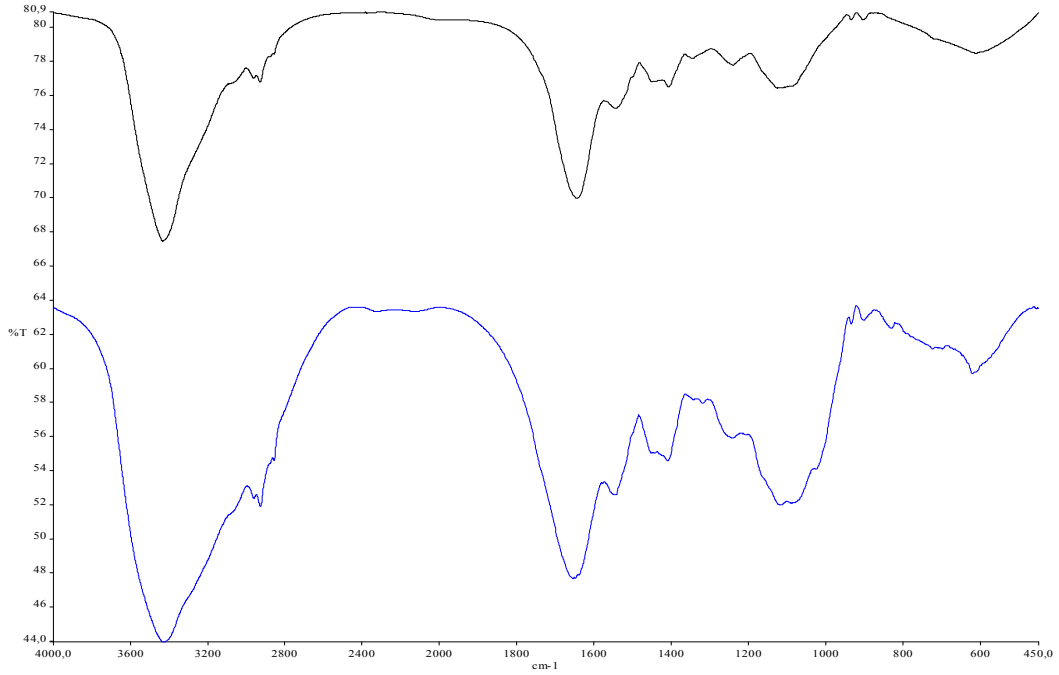
Şekil 3.13. *C.salexigens*: MGM; : Deniz Suyu



Şekil 3.14. *H. elongata*: MGM ; Deniz Suyu



Şekil 3.15. *S. ruber*: :MGM; Deniz Suyu



Şekil 3.16. *P. halophila*: ■ MGM; ■ Deniz Suyu

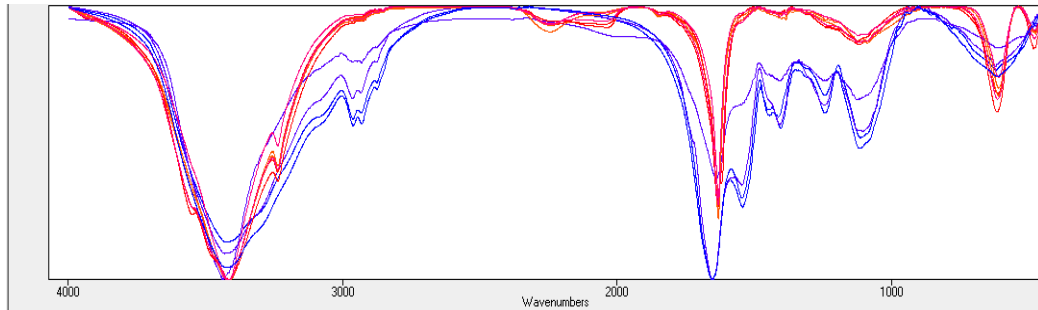
Farklı besiyeri kullanımının FT-IR profillerini genel olarak etkilemediği görülüyor. Pikler genel olarak aynı bölgelerde gelmişler, ancak % T değerleri aynı mikroorganizma kullanımında değişkenlik göstermektedir. Bu değişme FT-IR profilleri alınmak üzere tablet hazırlama sırasında farklı miktarlarda mikroorganizma kullanılmasından ileri gelmektedir.

3.5. Çamaltı'ndan izole edilen halofilik bakterilerin FT-IR profillerinin karşılaştırılması

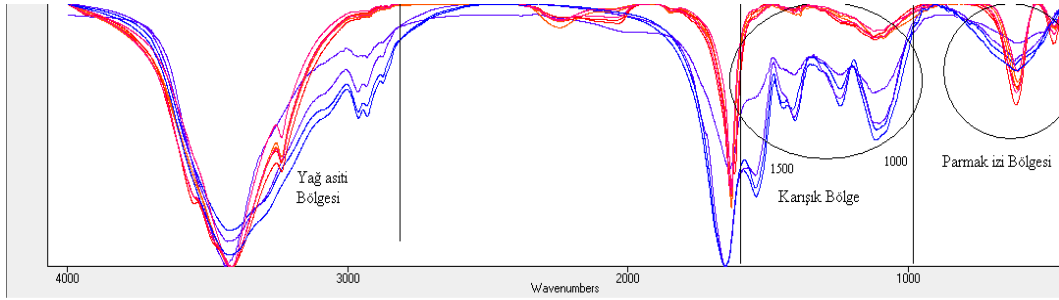
Çamaltı tuzlasından izole edilen halofilik bakterilerin genel FT-IR profillerini gözlemek amacıyla tüm mikroorganizmalar aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Arkea ve Bakteria'ya ait örneklerin birbirinden farklı iki genel profil oluşturdukları gözlenmektedir (Şekil 3.17.)

Tablo 3.1. 4 genel FT-IR spektrum bölgesi

| | Wavenumber [cm ⁻¹] | Bant Girişimleri |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|
| 1 Yağ asiti Bölgesi | 3400 | OH of water |
| | 2956 | CH ₃ asym. stretch |
| | 2920 | CH ₂ asym. stretch |
| | 2870 | CH ₃ sym. stretch |
| | 2850 | CH ₂ sym. stretch |
| | 1745/1735 | >C=O stretch, Ester, fatty acids |
| 2 Protein Bölgesi | 1705 | >C=O stretch, Ester, carboxylic groups |
| | 1652-1648 | Amide I, (C=O) different conformation |
| | 1550-1548 | Amide II, N-H, C-N and structure of proteins |
| | 1460-1454 | C-H bend. from CH ₂ |
| 3 Karışık Bölge | 1400-1398 | C-O bend. from carboxylate ions |
| | 1303 | Amide II (C-N) |
| | 1240 | P=O from phosphate |
| | 1222 | P-O |
| | 1114 | C-O-P, P-O-P |
| | 1085 | ring vibrations |
| 4 Polisakkarit Bölgesi | 1052 | C-O, C-O-C from polysaccharides |



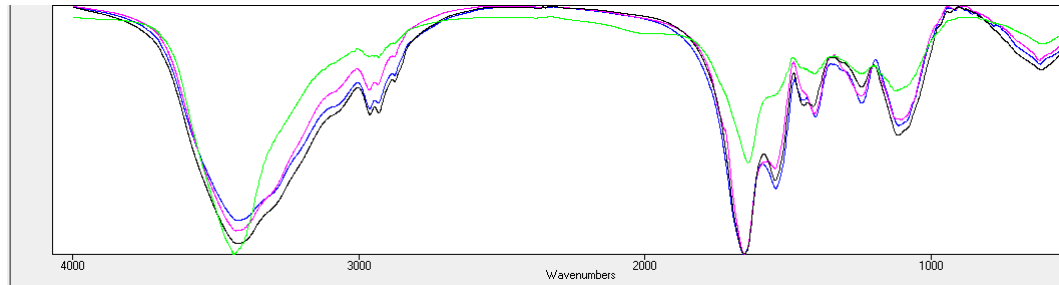
Şekil 3.17.Çamaltı İzolatlarının FT-IR profilleri(Kırmızı rengin yoğun olduğu bölgede bakteria, mavi rengin yoğun olduğu bölgede ise arkea domainine ait bakterilerin yoğunlaştığı görülmektedir (Sea-Water besiyeri kullanılmıştır).



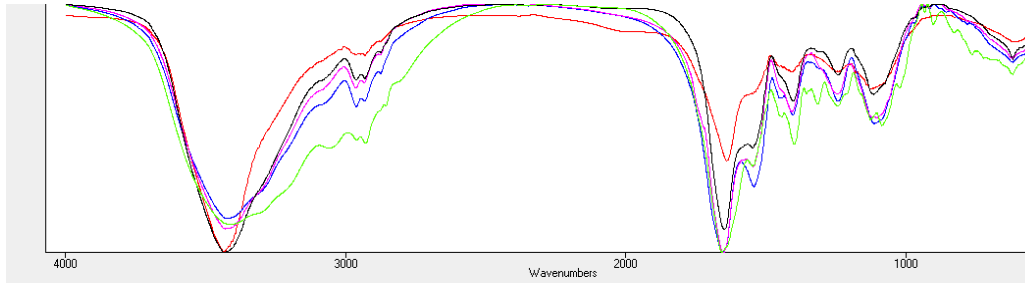
Tablo 3.17.'yi bölgelere ayırdığımızda Çamaltı izolatlarından Arkea ve Bakteria arasında farklılık gösteren bölgeler yağ asiti bölgesi ve özellikle 1500-1000 cm^{-1} aralıklarındaki karışık bölgede görülmektedir. 900-600 cm^{-1} bölgesinde parmak izi bölgesi olarak bilinmektedir ve her mikroorganizmanın kendine özgü bölgesi olduğu için buradaki farklılıklarda göze çarpmaktadır.

3.5.1. Çamaltı İzolatlarının FT-IR profillerinin karşılaştırılması

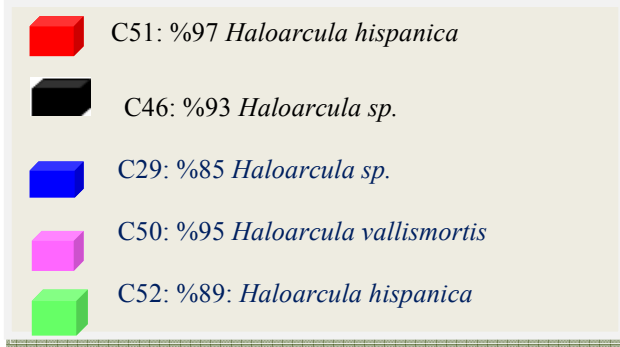
Çamaltından izole edilen mikroorganizmalar Sea Water katı besiyerinde üretilerek karşılaştırmaları yapılmıştır.



Şekil 3.18 ■ *Haloarcula hispanica* (C51) ■ *Haloarcula sp.* (C29)
■ *Halorubrum sp.* (C23) ■ *Haloarcula vallismortis* (C50)

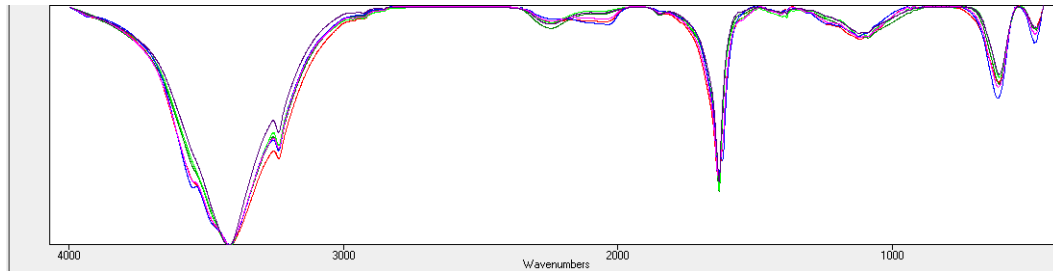


Şekil 3.19. Dizi Analizi Sonuçlarına Göre *Haloarcula sp.* Çıkan izolatlar



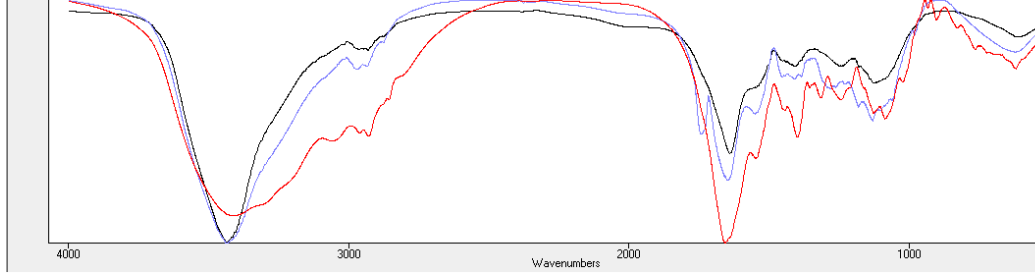
3.5.2. Çamaltı İzolatlarından Bakteria domainine ait olan bakterilerin karşılaştırılması

Çamaltı izolatlarından Bakteria domainine ait olanlar (C12, C15, C18, C19, C21, C22) örneklerinin FT-IR profilleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.20. Çamaltı izolatlarından Bakteria domainine ait olanlar (C12, C15, C18, C19, C21, C22)

3.5.3. Çamaltı izolatlarından *Haloarcula hispanica* türlerinin karşılaştırılması

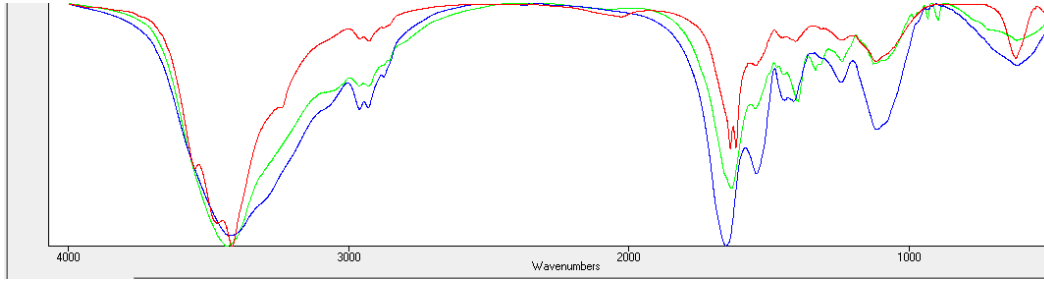


Şekil 3.21. Çamaltı *Haloarcula hispanica* izolatlarıyla, referans *Haloarcula hispanica*'nın karşılaştırılması

- Çamaltı İzolatu C51: %97 *Haloarcula hispanica*
- Michael Dyall-Smith, Avustralya'den temin edilen *Haloarcula hispanica*
- Çamaltı İzolatu C52: %89 *Haloarcula hispanica* (aynı tip besiyerinde geliştirilmişlerdir)

3.5.4. Çamaltı İzolatlarından *Halorubrum sp.*'lerin karşılaştırılması

Çamaltı İzolatlarından dizi analizi sonuçlarına göre %89, %94 ve %89 gibi değişen oranlarda *Halorubrum sp.* oldukları belli olan C24, C37 ve C43 bakterilerinin karşılaştırılması yapılmıştır ve FT-IR profillerinin genel olarak birbirine benzediği görülmüştür (Şekil 3.22.).

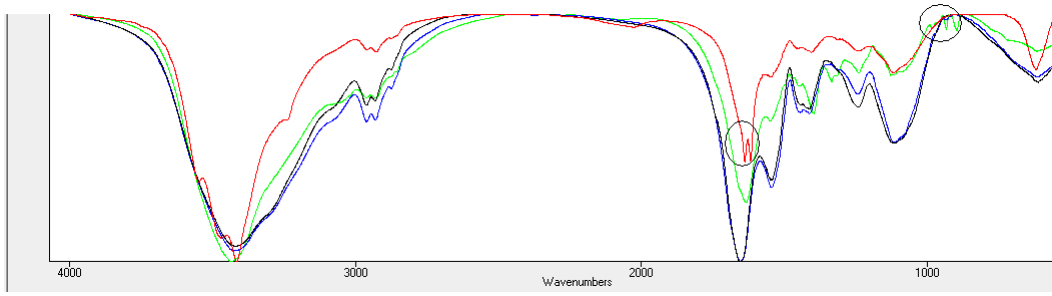


Şekil 3.22. Çamaltı *Halorubrum sp.* İzolatlarının karşılaştırılması

- C24 DİZİ ANALİZİ SONUCU: %89 *Halorubrum sp.*
- C37 %94 *Halorubrum sp.*
- C23: %89 *Halorubrum sp.*

3.5.5. Çamaltı İzolatı ve Referans *Halorubrum sp.* Örneklerinin Karşılaştırılması

Çamaltı İzolatlarından dizi analizi sonuçlarına göre %89, %94 ve %89 gibi değişen oranlarda *Halorubrum sp.* oldukları belli olan C24, C37 ve C43 bakterileri ile referans *Halorubrum xinjiangense*'nin karşılaştırılması yapılmıştır ve FT-IR profilleri arasında cins seviyesinde incelendiğinde farklılık görülen bölgeler işaretlenmiştir (Şekil 3.23.).

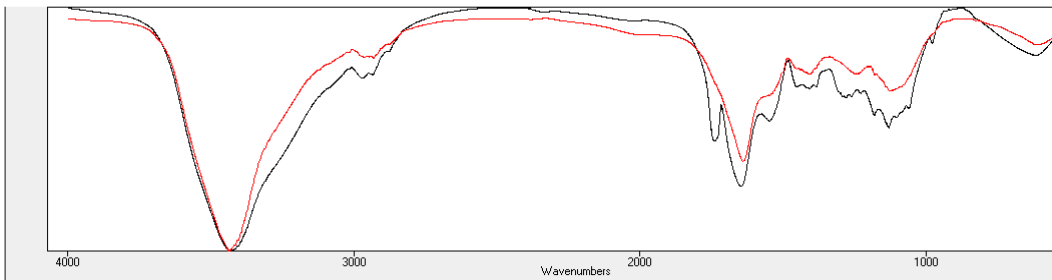


Şekil 3.23.Çamaltı izolat ve referans *Halorubrum sp.* Örneklerinin karşılaştırılması

- C24 DİZİ ANALİZİ SONUCU: %89 *Halorubrum sp.*
- C37 %94 *Halorubrum sp.*
- C23: %89 *Halorubrum sp.*
- M .Burcin Mutlu, Türkiye’ dan alınan *Halorubrum xinjiangense*

3.5.6. Çamaltı İzolatı ve Referans *H.hispanica* Örneklerinin Karşılaştırılması

Çamaltı izolatı olan ve dizi analizi sonucuna göre %97 oranında *Haloarcula hispanica* olduğu bilinen C51 numaralı izolat ve referans *Haloarcula hispanica*’nın karşılaştırılması yapılmıştır (Şekil 3.24.).

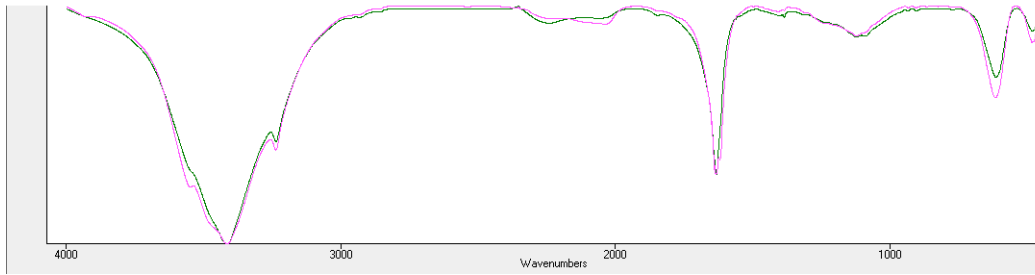


Şekil 3.24. Çamaltı izolatı *H.hispanica* ve referans *H. hispanica* karşılaştırılması

- Michael Dyall-Smith, Australia’den temin edilen *Haloarcula hispanica*
- Çamaltı İzolatı C51 dizi analizi sonucu %97 *Haloarcula hispanica*

3.5.7. Aynı türe ait oldukları bilinen Çamaltı izolalarının karşılaştırılması

Dizi analizi ile ne oldukları belirlenemeyen ancak aynı tür oldukları bilinen C18 ve C19 numaralı izolaların FT-IR profilleri karşılaştırılmıştır. Profillerin birbiriyle tamamen örtüşükleri görülmektedir (Şekil 3.25.).



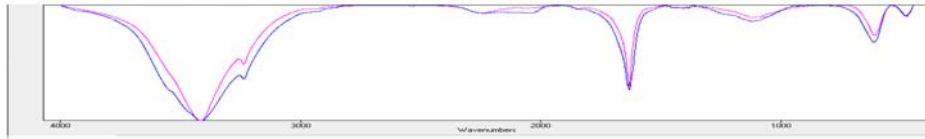
Şekil 3.25. Dizi analiziyle belirlenemeyen ancak aynı oldukları bilinen çamaltı izolaları

C18: 


C19: 


3.5.8. Çamaltı izolatlarından *Halobacillus sp.* Örneklerinin karşılaştırılması

Çamaltı izolatlarından dizi analizi sonucu *Halobacillus sp.* oldukları bilinen C12 ve C22 nolu izolalar karşılaştırılmıştır. FT-IR profillerinin örtüşüğü gözlenmiştir (Şekil 3.26.).

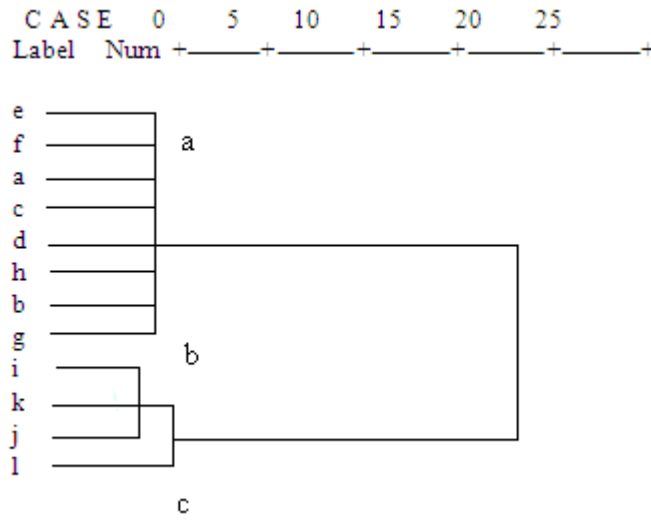


Şekil 3.26. Çamaltı izolatlarından C12 ve C22'nin karşılaştırılması

 C12 dizi analizi sonucu: *Halobacillus sp.*

 C22 dizi analizi sonucu: *Halobacillus sp.*

3.6. Halofilik Bakterilerin Hiyerarşik Küme Analizi (HCA)



Şekil 3.27. Referans halofilik bakterilerin HCA analizi

a: *Haloarcula argentinensis*

b: *Haloarcula mukohatei*

c: *Haloarcula hispanica*

d: *Haloferax alexandrinus*

e: *Haloarcula marismortui*

f: *Halorubrum xinjiangense*

g: *Halococcus dombrowskii*

h: *Haloferax mediterranei*

i: *Chromahalobacter salexigens*

j: *Halomonas elongata*

k: *Pseudomonas halophila*

l: *Salinibacter ruber*

Aynı sayısal veriler kullanılarak bir de Clustan Graphics 8 programıyla dendogram elde edilmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2.Spektrumlara göre yapılan küme analizi

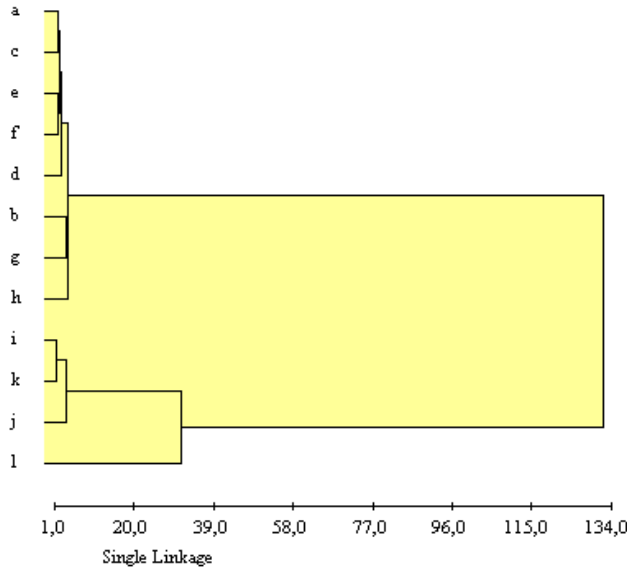
| İlk Küme | İkinci Küme | Uzaklık Değerleri |
|----------|-------------|-------------------|
| i | k | 1,213 |
| e | f | 1,613 |
| a | c | 1,794 |
| a | e | 2,111 |
| a | d | 2,468 |
| b | g | 3,709 |
| i | j | 3,851 |
| b | h | 4,031 |
| a | b | 4,071 |
| i | l | 31,346 |
| a | i | 132,206 |

Yapılan küme analizi sonuçlarına göre; a, c, e, f, d, b, g, h (*Haloarcula argentinensis*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum xinjiangense*, *Haloferax alexandrinus*, *Haloarcula mukohatei*, *Haloferax mediterranei*) bir kümede; i, k, j, l (*Chromahalobacter salexigens*, *Pseudomonas halophila*, *Halomonas elongata*, *Salinibacter ruber*) ise diğer bir kümede toplanmıştır.

İlk küme iki alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grubu a, c, e, f, d ve ikinci alt grubu ise b, g, ve h oluşturmaktadır.

İkinci küme de kendi içinde iki alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grubu i, k ve j oluştururken ikinci alt grupta bulunmaktadır.

Yapılan uzaklık analizi sonuçlarına göre; a ve i arasındaki uzaklık en fazladır(132,206), (a:*Haloarcula argentinensis*, i: *Chromahalobacter salexigens*). Aralarındaki uzaklık en az olan, yani birbirine en yakın olan (31,346) ikili ise; i ve k olmuştur (i: *Chromahalobacter salexigens*, k: *Pseudomonas halophila*). Yani birbirine en yakın türler *Chromahalobacter salexigens* ve *Pseudomonas halophila* olarak ortaya çıkmıştır. Sonuçlar ayrıca Clustan Graphics 8 ile farklı bir dendogramda da gösterilmiştir (Şekil 3.28.).



Şekil 3.28. Referans halofilik bakterilerin dendogramı (Clustan graphics 8 programı ile çizilmiştir)

a: *Haloarcula argentinensis*

g: *Halococcus dombrowskii*

b: *Haloarcula mukohatei*

h: *Haloferax mediterranei*

c: *Haloarcula hispanica*

i: *Chromahalobacter salexigens*

d: *Haloferax alexandrines*

j: *Halomonas elongata*

e: *Haloarcula marismortui*

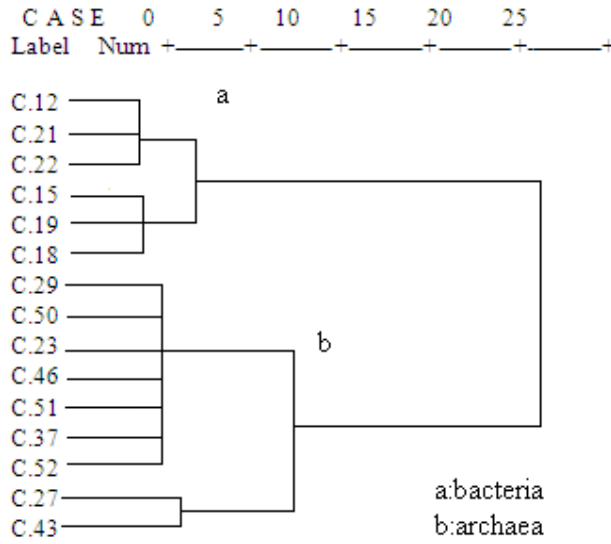
k: *Pseudomonas halophila*

f: *Halorubrum xinjiangense*

l: *Salinibacter ruber*

3.7. İzmir Çamaltı Tuzlası İzolatlarının Hiyerarşik Küme Analizi

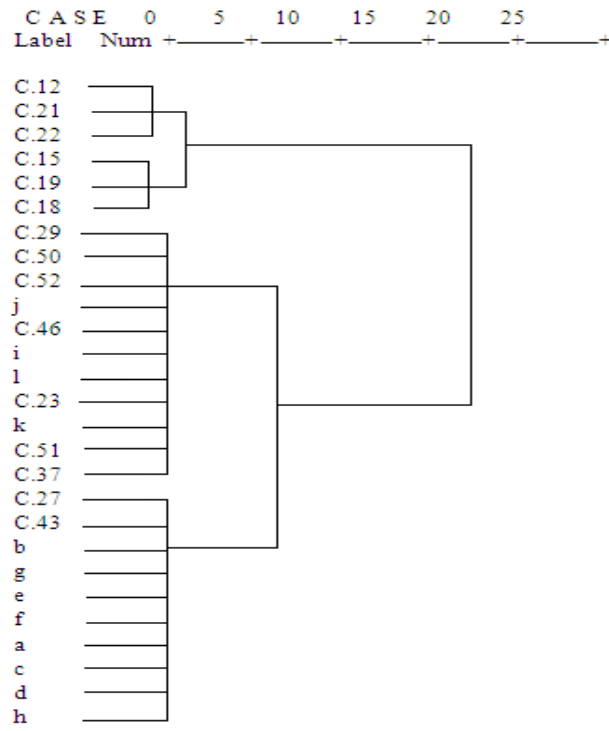
Çamaltı tuzlasından izole edilen halofilik bakterilerin kendi içlerinde hiyerarşik küme analizi yapılmıştır ve yapılan kümeleme analizi sonucu bakteriler 2 ana alt kümeye ayrılmışlardır. İlk kümede C12, C21, C22, C15, C18 ve C19 toplanırken ikinci kümede C29, C50, C23, C46, C51, C37, C52, C27 ve C43 toplanmıştır. İlk küme kendi içinde iki alt kümeye ayrılmıştır, İlk alt kümede C12,C21 ve C22 ikinci alt kümede ise C15, C19, ve C18 toplanmıştır. İkinci küme de kendi içinde iki kümeye daha ayrılmıştır, birincisinde C29, C50, C23, C46, C51, C37 toplanırken; ikincisinde C27 ve C43 toplanmıştır.



Şekil 3.29. Çamaltı Tuzlası izolatu halofilik bakterilerin HCA analizi

3.8. İzmir Çamaltı Tuzlası ve Diğer Örneklerin Birlikte Hiyerarşik Küme Analizinde Değerlendirilmesi

Çamaltı tuzlasından izole edilen halofilik bakteriler ve referans bakterilerin hiyerarşik küme analizi yapılmıştır ve yapılan kümeleme analizi sonucu bakteriler 2 ana alt kümeye ayrılmışlardır. İlk ana kümede C12, C21, C22, C15, C18 ve C19 bulunurken diğer ana alt kümede a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, C29, C50, C52, C46, C23, C51, C37 ve C43 bulunmaktadır (Şekil 3.30.).



Şekil 3.30 Referans halofilik bakteriler ve Çamaltı Tuzlası izolatu halofilik bakterilerin HCA analizi

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Arkea/Bakteria ayırımı için kullanılan yöntemlerden birisi Arkea ve Bakteria spesifik primerler kullanılarak; 16S rRNA geninin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile amplifikasyonudur ancak bu yöntem oldukça zahmetli ve maliyetlidir.

Araştırmacılar Arkea/Bakteria varlığının polar lipid fraksiyonlarındaki farklılıklara göre ortaya konması üzerine odaklanmışlardır. Son olarak Oren, Arkea'da en azından 12 farklı glikolipidin bulunduğunu bildirmiştir. Glikolipidler şeker kısımlarının tipleri, sülfatın bulunup bulunmayışı ve sayılarına göre farklılık göstermektedirler. Glikolipidlere ek olarak fosfotidil gliserolsülfat, fosfotidil gliserofosfat ve fosfotidil gliserofosfatın metil esterleri gibi fosfolipidler halofilik Arkea'da yaygın olarak bildirilmiştir. Bakteria'da bulunan en yaygın fosfolipidler fosfotidil etanolamin, fosfotidilkolin, fosfotidikasit ve fosfotidilgliserofosfattır (Ventosa 2004).

Çalışmamızda; Arkea/Bakteria ayırımı için halihazırda kullanılan yöntemler olan 16S rRNA analizi, Yağ asidi metil esterlerinin, gaz kromatografisiyle analizi (FAME), gibi uzun zaman ve maliyet gerektiren yöntemlere alternatif olarak, FT-IR 'nin Arkea/Bakteria ayırımı için uygun bir yöntem olup olmadığı araştırılmıştır.

Neden FT-IR?

İnfrared spektroskopisi biyolojik moleküllerin çalışılmasında güçlü bir teknik olarak görülüyor ve bu yöntemin biyolojik problemlerin çözülmesindeki kullanımını FT-IR'nin de bulunmasıyla giderek artmıştır. İnfrared spektroskopisinin en büyük avantajlarından birisi de her örneğin, her aşamada çalışılmasına olanak sağlamasıdır. Sıvı, katı, gaz, toz, fiber pek çok yüzey uygun preparasyon metodu uygulanarak incelenebilmektedir. Proteinler, peptidler, lipidler, biyomembranlar, karbonhidratlar, farmasötikler, gıda maddeleri, bitki ve hayvan dokuları başarılı bir şekilde infrared spektroskopisiyle analiz edilebilmektedir (Stuart 1997).

Lipitler, proteinler, peptidler, biyomembranlar, nükleik asitler, hayvan dokuları, mikrobiyal hücreler, bitkiler ve klinik numuneler infrared spektroskopisiyle başarılı bir şekilde çalışılmıştır. Mikroskopik yöntemler diğer çok yönlü analitik yöntemlerle birleştirildiği zaman kompleks örneklerin mikron boyutlarında incelenmesine olanak sağlamaktadır (Stuart 1997).

Çeşitli mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan geleneksel yöntemler; morfolojik özelliklere, biyokimyasal reaksiyonlara, serolojik reaksiyonlara, bakteriyofaja duyarlılık ve 16S rDNA dizi analizine dayanır. Ancak bu tekniklerin tümü yorucu, zaman alan ve çoğu zamanda kesin değildir (Garip 2009).

FT-IR büyük bir hassaslıkla çalışan bir fizikokimyasal tekniktir. Makromoleküllerdeki kimyasal bağlarda bulunan çok küçük açı ve uzunluk değişiklikleri bile kolaylıkla saptayabilen bu cihaz, moleküllerdeki yapısal değişikliklerin detaylı bir şekilde incelenmesine olanak sağlar (Garip 2009).

Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan kültür hazırlanması, ELISA gibi immünolojik metodlar, ve PCR, in-situ hibridizasyonu gibi moleküler biyolojik teknikler gibi geleneksel yöntemlerdir. Genellikle kesin sonuçlar vermekle birlikte bu tekniklerin hiçbiri 1 dakika gibi kısa bir süre içinde uygulanabilir hale getirilememiştir (Foster ve ark. 2004). FT-IR spektroskopisi yüksek derecede duyarlı, herhangi bir reagent kullanımını gerektirmediği için sık sık kullanılması ekonomik olan, hızlı ve zararsız bir tekniktir. Cins, tür ve tür altı kategorilerdeki bakterilerin sınıflandırılmasında başarılı bir şekilde kullanılır ve elde edilen spektrumların, spektral veritabanlarıyla karşılaştırılması sonucu bakterilerin identifikasyonu yapılır. Bunun yanı sıra, FT-IR bakterilerin identifikasyonunda herhangi bir bakteriyal örnek görüntüleme tekniklerinden çok daha hızlı sonuç vermektedir (Kirkwood et al.2004).

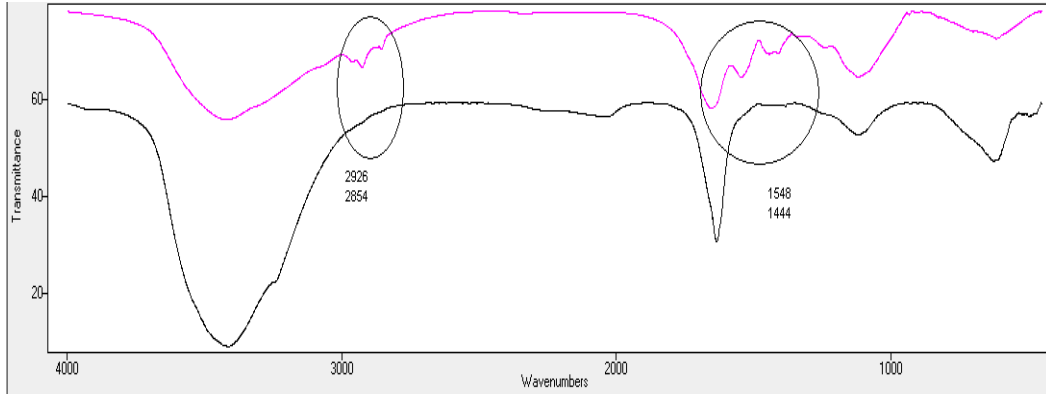
Mikroorganizmaların karakterizasyonunda ve identifikasyonunda kullanılan çeşitli spektroskopik tekniklerden en umut verici olanı FT-IR'dir. FT-IR çok hızlı bir method ve kullanıcılara spektrumun tamamının bir kaç saniye içinde görüntülenmesi olanağını sağlamaktadır. Yapıdaki değişiklikler ve hücre duvarının yapısındaki maddeler, polisakkarit, lipit ve proteinler; türler arasındaki farklılıkları gösterecek şekilde spektruma yansımaktadır (Al-Holy ve ark. 2006).

FT-IR spektroskopisi hiç bir taksonomik kriteri önceden seçmeye bağlı kalınmaksızın, bakterilerin sınıflandırılması için kullanılabilir. Tek boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PFGE) ve DNA-DNA hibridizasyonunun aksine serogrup ve cins seviyesinde ayrımlar için kullanılabilir. Verilerin eldesi PAGE ve diğer tekniklere kıyasla çok hızlıdır. Analiz için örneklerin hazırlanması basit ve hızlıdır ve sadece 10-60 µg biyomas analiz için yeterlidir, hücrelerin parçalanması, saflaştırılması gibi aşamalara gerek yoktur. Klasik testlerin ve Kemotaksonominin aksine, FT-IR bütün bakteri gruplarına uygulanabilir (Helm ve ark. 1991).

İşte bütün bu bahsedilen avantajlı özelliklerinden dolayı FT-IR spektroskopisi mikrobiyolojik örneklerin incelenmesinde, bakterilerin identifikasyonunda son derece kullanışlı bir cihazdır. Bu çalışmada da bu avantajlı yönleri göz önüne alınarak halofilik bakterilerin identifikasyonunda kullanılan geleneksel yöntemlere (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 16S rRNA analizi) bir alternatif olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır.

Mikroorganizmalar FT-IR analizine hazırlanırken 24 saat boyunca ependorfların kapakları açık bırakılarak içlerindeki suyun uçurulması hedeflenmiştir. Çünkü su İnfrared spektroskopisi analizinde büyük bir alanda girişim yaparak diğer piklerin görülememesine neden olmaktadır. Bu nedenle analiz öncesi böyle bir işlem uygulanmıştır.

Hiyerarşik Küme Analizi (HCA) sonucuna göre birbirine en uzak noktada bulunan mikroorganizmaların FT-IR profillerinin karşılaştırılması Şekil 4.1.'de yapılmıştır. Çamaltı tuzlasından izole edilen mikroorganizmaların dizi analizi sonuçları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2. de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Hiyerarşik Küme Analizi (HCA) sonucuna göre birbirine en uzak noktada bulunan

mikroorganizmalar : *C.salexigens* ■ *H.argentinensis* ■

(2926 cm⁻¹): asimetrik CH₂ titreşimi

(2854 cm⁻¹): yağ asitlerindeki asimetrik CH₂ titreşimi

(1548 cm⁻¹):Amid 2

(1444 cm⁻¹): COO⁻ 'da simetrik C=O titreşimi

Bölgelerinde farklılıklar görülmektedir.

Tablo 4.1. İzmir Çamaltı Tuzlası İzolatları Bakteria Domainine ait Dizi Analizi Sonuçları

| Dizi Analizi İçin İzolatlar | Dizi Analizi İçin Seçilen Primerler | Dizinin Uzunluğu | Eşleşen Baz Sayısı | Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------|--------------------|--|
| C12 | M13F | 1029 | 603/616 | %97 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 341F | 756 | 438/444 | %98 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 785F | 1222 | 679/680 | %99 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 907R | 1160 | 652/655 | %99 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 1AB | 659 | 367/368 | %99 <i>Halobacillus sp.</i> |
| C21 | M13F | 973 | 541/542 | %99 <i>Halomonas halophila</i> |
| | 341F | 1020 | 567/568 | %99 <i>Halomonas halophila</i> |
| | 785F | 1099 | 611/612 | %99 <i>Halomonas halophila</i> |
| | 907R | 1175 | 653/654 | %99 <i>Halomonas halophila</i> |
| | M13R | 1031 | 674/676 | %99 <i>Halomonas salina</i> |
| C15 | M13F | 1115 | 659/674 | %97 <i>Bacillus permians</i> |
| | 1B | 720 | 415/423 | %98 <i>Halomonas halophila</i> |
| | 341F | 729 | 408/409 | %99 <i>Unculture Virgibacillus sp.</i> |
| | 785F | 872 | 508/518 | %98 <i>Bacillus permians</i> |
| | 907R | 780 | 472/485 | %97 <i>Unculture Virgibacillus sp.</i> |
| | M13R | 549 | 335/348 | %98 <i>Bacillus morismortui</i> |
| C22 | 1B | 1003 | 558/559 | %99 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 341F | 823 | 464/469 | %98 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | 907R | 1265 | 709/713 | %99 <i>Halobacillus sp.</i> |
| | M13R | 715 | 416/425 | %99 <i>Halobacillus profundi</i> |

C18 ve C19'un ne olduğu bilinmiyor ama aynı mikroorganizma oldukları biliniyor.

Tablo 4.2.İzmir Çamaltı Tuzlası İzolatları Arkea Domainine ait Dizi Analizi Sonuçları

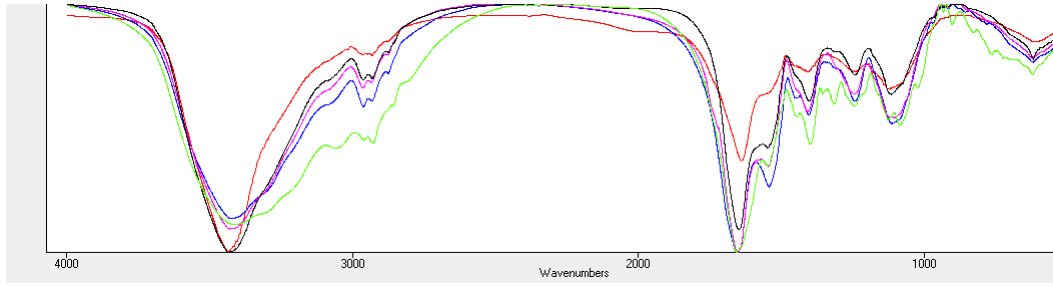
| Dizi Analizi İçin Seçilen Temsilci İzolat | Eşleşen Baz Dizisi | Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı |
|---|--------------------|-------------------------------------|
| C23 ve C24 | 255/453 | %89 <i>Halorubrum sp.</i> |
| C29 | 407/532 | %85 <i>Haloarcula sp.</i> |
| C37 | 812/921 | %94 <i>Halorubrum sp.</i> |
| C46 | 657/812 | %93 <i>Haloarcula sp.</i> |
| C50 | 659/700 | %95 <i>Haloarcula vallismortis</i> |
| C51 | 584/690 | %97 <i>Haloarcula hispanica</i> |
| C52 | 459/686 | %89 <i>Haloarcula hispanica</i> |

C27 ve C43 'ün ne olduğu bilinmiyor.






Sonuç olarak;

1. FT-IR yöntemi ile referans ve Çamaltı izolatu olan halofilik prokaryotların Arkea/Bakteria domainleri seviyesinde ayrılabilirdiği gösterilmiştir.
2. FT-IR yöntemi ile referans ve Çamaltı izolatu olan Bakteria üyelerinin tür seviyesinde ayrılabilirdiği gösterilmiştir.
3. FT-IR yöntemi ile referans ve Çamaltı izolatu olan Arkea üyelerinin tür seviyesinde ayrılabilirdiği gösterilmiştir.

Tür düzeyinde de ayırım yapılabileceği yaptığımız çalışmalardan anlaşılmaktadır. Dizi analizi sonuçlarına göre gen bankasındaki en yakın karşılığı %85 *Haloarcula sp.* Olan mikroorganizmanın; elimizdeki *Haloarcula hispanica* ve *Haloarcula vallismortis* türleriyle spektral olarak karşılaştırılması sonucu; türü belirli olmayan *Haloarcula sp.* İzolatının *Haloarcula vallismortis* ' e FT-IR profili olarak daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. Dizi Analizi Sonuçlarına Göre *Haloarcula sp.* Çıkan izolatlar

| | |
|---|---|
|  | C51: %97 <i>Haloarcula hispanica</i> |
|  | C46: %93 <i>Haloarcula sp.</i> |
|  | C29: %85 <i>Haloarcula sp.</i> |
|  | C50: %95 <i>Haloarcula vallismortis</i> |
|  | C52: %89: <i>Haloarcula hispanica</i> |

Çalışmamızda yapılan istatistiksel analiz yöntemleri ile FT-IR 'nin tür seviyesindeki halofilik prokaryotların ayırımında da kullanılabileceği görülüyor. Her farklı tür kümeleme analizinde farklı bir kümede toplanmaktadır. Bundan yola çıkarak; tuzlu ortamlarda sık rastlanan organizmaların FT-IR profillerinin yüklendiği bir kütüphane oluşturularak; yeni çalışılan tuzlu bir ortamda genel olarak hangi türlerin olduğu FT-IR analizleriyle anlaşılabilir. Organizmaların FT-IR analizleri; PCR, dizi analizi gibi moleküler metodlarla kombineli olarak kullanılarak bir sonuç elde edilebilir. Dizi analizi sonucu gen bankasındaki karşılığıyla düşük yüzdeyle eşleşen mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılabileceği tahmin edilmektedir.

Literatürde daha önce halofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışma bulunmadığından elde edilen FT-IR spektrumları literatür ile karşılaştırılmamaktadır. Ancak biyolojik moleküllerin FT-IR bantlarının değerleri bilindiği için elde ettiğimiz verileri Tablo 1.6. daki Biyolojik FT-IR analizi bant frekansları ile karşılatırabiliriz. Arkea ve Bakteria'daki farklılıkların genel olarak yaklaşık 3000'li dalga boylarında pik veren Yağ asiti bölgesinin (2959: Yağ asitlerindeki metil gruplarında asimetric CH_3 titreşimi ; 2934: CH_2 gruplarında C-H titreşimi; 2927 : Yağ asitlerinde metilen gruplarında asimetric CH_2 titreşimi; 2876: Yağ asitlerindeki metil gruplarında simetric CH_3 titreşimi;

2857: Yağ asitlerinde metilen gruplarında simetrik CH₂ titreşimi), 1500-1000 bölgeleri arasındaki karışık bölgenin ve 900-600 dalga boyları arasındaki parmak izi bölgesinin farklı olduğu görülmektedir (Şekil 3.17.).

1500-1000 bölgeleri arasında amid bandı bölgeleri bulunmaktadır ve 900-600 dalga boyları arasındaki parmak izi bölgesi her bir mikroorganizma için spesifiktir. Bu yüzden ayırt edici bölgedir. Parmak izi bölgesinin aydınlatılması bizlere daha çok bilgi verecektir.

Arkea ve Bakteria için genel olarak farklılık veren bölgeler; Arkea ve Bakteri'nin farklı kimyasal moleküller içermesindedir ve FT-IR spektrumlarındaki farklılık içeren bölgelerin bu farklı kimyasal moleküllerden olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın yapılması sırasında 28 adet farklı halofilik mikroorganizmanın FT-IR profilleri çıkarılmıştır. Ancak farklı türlerde olan diğer halofilik mikroorganizmaların çıkarılmamıştır. İleride bu mikroorganizmalarında FT-IR profilleri çıkarılarak biyoteknolojik açıdan çok önemli bu grubun bir FT-IR kütüphanesi oluşturulabilir. Böylece ilk kez çalışılan tuzlu bir ortamda bu bakterilerin varlığı, FT-IR kütüphanesi sayesinde kolaylıkla bulunabilir.

Bu yöntemin daha ileri istatistiksel metodlarla birleştirilip halofilik mikroorganizmalarda tür altı kategorilerde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmalıdır, *Yersinia enterocolitica* (Kuhm 2006), *Lactobacillus* suşları (Oust 2004), *Enterococcus faecium* (Preisner 2006) gibi pek çok mikroorganizma tür altı kategoriler seviyesinde FT-IR ile incelenmiş ve identifikasyonları yapılmıştır. Ancak halofilik mikroorganizmalarda araştırılmamıştır.

5. KAYNAKLAR

- Al-Holy, A.M., Lin, M., Al-Quadiri, H., Cavinato, A.G., Rasco, A.B., (2006), *Classification of foodborne pathogens by fourier infrared spectroscopy and pattern recognition techniques*, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. **14**, 189-200.
- Bardakçı, F. , Yenidünya, A. F. , Yılmaz, N., (2009), *Gen Klonlama ve DNA Analizi*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara
- Beekes, M., Lasch, P., ve Naumann, D. (2007), *Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research*, Veterinary Microbiology, **123**, 305-319
- Burgula, Y., Khali, D., Krishnan, S. S., Cousin, M. A., Gore, J. P., Reuhs, B. L., Mauer, L.J (2007), *Review of Mid-Infrared Fourier Transform- Infrared Spectroscopy Applications for Bacterial Detection*, Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology **15**, 146-175
- Çökmüş, C. (Ed) (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* 11.Baskıdan Çeviri; Palme Yayıncılık, Ankara,
- Dilsiz, N. (2009), *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara
- Dyall-Smith, M. (2004), *Halohandbook*, www.microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/HaloHandbook.
- Foster, S.N., Thompson, S.E., Valentine, N.B., Amonette, J.E., and Johnson, T.J., (2004), *Classification of sporulated and vegetative bacteria using statistical analysis of Fourier Transform Mid-infrared Transmission Data*, Applied Spectroscopy. **58**, 2.
- Garcia, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2005), *Catabolic versatility of aromatic compound- degrading halophilic bacteria*, FEMS Microbiology Ecology. **54**, 97-109.
- Garip, S., Gozen, A.C., Severcan, F., (2009), *Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates*, Food Chemistry **113**, 1301-1307.
- Gündüz, T., *Enstrümental Analiz*, 9.Baskı Gazi Kitabevi, Ankara, Ekim 2005
- Güven, K. (Ed) (2009), *Genel Mikrobiyoloji*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir,

- Halkman, A., ve Tunail, N., *Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ders Notları* www.mikrobiyoloji.org/TR, erişim tarihi 9 Haziran 2010-06-09
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., ve Naumann, D. (1991), *Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy*, Journal of General Microbiology, **137**, 69-79.
- Kirkwood, J., Al-Khalidi, S.F., Mossoba, M.M., Sedman, J., and Ismail, A.A., (2004), *Fourier Transform Infrared bacteria identification with the use of a focal-plane-array detector and microarray printing*, Applied Spectroscopy. **58**, 11.
- Lambert, B. J., Shurvell, H. F., Ligtner, D., Cooks, R.G. (1987), *Organic Structural Spectroscopy*, Macmillan
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Moletta, R. (2005), *Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reaktor*, Water Research **39**, 1471-1480.
- Madigan, M.T., Martinko, M.M.(2009), *Brock Biology of Microorganisms*, Twelfth Edition, Pearson Education
- Mantsch, H.H. (Ed) (1996), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, WILEY-LISS
- Mantsch, H. ve Chapman, D.(1996), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Wilmington.
- Margesin, R. ve Schinner, F. (2001), *Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology*, *Extremophiles*, **5**, 73-83.
- Nicholson, C.A, Fathepure, B.Z., (2005), *Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma.*, FEMS Microbiology Letters **245**, 257-262.
- Oren, A. (2002), *Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria*, FEMS Microbiol. Ecol. **39**, 1-7.
- Preisner, O., Lopes, A.J., Guiomar, R., Machado, J., Menezes J.C.(2007), *Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination*, Anal Bioanal Chem **387**, 1739-1748

- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J. F. (1985), *Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern*, *Microb. Ecol.* **11**, 107-115.
- Sandt, C., Madoulet, C., Kohler, A., Allouch, P., De Champs, C., Manfait, M. ve Sockalingum, G.D. (2006), *FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens*. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 785-797.
- Schmitt, J., ve Flemming H. (1998) *FT-IR Spectroscopy in Microbial and Material Analysis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**, 1-11.
- Stuart, B. (1997), *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John WILEY&SONS
- Stuart, B. (2004), *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, WILEY
- Thaler, J., *A survey of Halophilic Microorganisms at the Mars Desert Research Station*, available on-line: [http://chapters.marssociety.org/canada/expedition-mars.org/ExpeditionBeta/crew/BiologyProposal\(Thaler\).pdf](http://chapters.marssociety.org/canada/expedition-mars.org/ExpeditionBeta/crew/BiologyProposal(Thaler).pdf), 2005. Son erişim tarihi 3 Mayıs 2010
- Ventosa, A. (ed) (2004), *Halophilic Microorganisms*, Springer-Verlag, Berlin.
- Ventosa, A. ve Nieto, J.J. (1995), *Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **11**, 85-94
- Yıldız, A., ve Genç, Ö. (1993), *Enstrümental Analiz*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara
- www.nature.com son erişim tarihi 3 Mayıs 2010-05-02

