T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MARMARA DENİZİ VE KARADENİZ' DEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN SAFLAŞTIRILMASI VE TANIMLANMASI

Mine GÜL-ŞEKER

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MARMARA DENİZİ VE KARADENİZ' DEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN SAFLAŞTIRILMASI VE TANIMLANMASI

Mine GÜL-ŞEKER

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER

GEBZE
2009

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Marmara Denizi ve Karadeniz' den İzole Edilen Bakterilerin Saflaştırılması ve Tanımlanması

YAZAR: Mine GÜL-ŞEKER

Bu doktora tez çalışması kapsamında örnekleme bölgeleri olarak, şehir ve ev deşarjı almayan İstanbul Boğazı'nın Marmara çıkışı (M) ile Karadeniz'in özelliklerini tam olarak temsil eden ve İstanbul Boğazı'nın Karadeniz çıkışından (K) birer ve İzmit Körfezi' nde (İK) iç, orta ve dış körfezi temsil eden üç farklı istasyon toplamda beş istasyon belirlenmiştir. Deniz suyu örnekleri, Marmara Denizi ve Karadeniz istasyonlarından birer defa, İzmit Körfezi istasyonlarından ise mevsimsel farklılıklar gözetilerek farklı zamanlarda dört defa alınmıştır

Marmara Denizi, Karadeniz ve İzmit Körfezi' ni temsil eden istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinden sırası ile 132 adet (M), 90 adet (K), 82 adet (İK 1), 119 adet (İK 2), 129 adet (İK 3), 146 adet (İK 4) olmak üzere toplam 698 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatların kolonilerine ait özellikler (koloni görünümü, rengi, kenarı, yüksekliği, yüzeyi vb.), Gram boyama ve katalaz testleri yapılmıştır. Toplam 698 adet bakteri izolatının içinden, farklı koloni morfolojisi gösteren örneklerden 46 adet izolat seçilmiştir. Bu izolatların saf olarak elde edilme basamağında izolat sayısı 53 adete ulaşmıştır. Çizgi ekimlerle saf olarak elde edilen bu izolatlar temel mikrobiyolojik tanımlama testleri yapılmıştır.

Seçilmiş izolatlar, VITEK 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile *Sphingomonas paucimobilis, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter haemolyticus, Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis, Brucella melitensis, Brevundimonas diminuta / vesicularis, Brevibacillus laterosporus* olarak birbirinden farklı 7 saf tür şeklinde tanımlanmış, 11 izolat tanımlanamamıştır.

İzolatların çoklu ağır metal dirençliliği, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri belirlenerek tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği, izolatların ekstraselüler enzim üretim yetenekleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları, seçilmiş izolatların

çoğunun Cu^{+2}, Cd^{+2} ve Cr^{+3}' a özel dirençlilikleri ile metal dirençliliği indikatörleri olarak tanımlanabilecek *Acinetobacter* ve *Bacillus* cinslerine ait olduğunu göstermiştir. Ağır Metal dirençli izolatların çoğunun aynı zamanda en az 2 antibiyotiğe dayanıklı olduğu ve ağır metal-antibiyotik arasındaki çifte dirençlilik, Cd^{+2} ve Cu^{+2} metalleri ve kloramfenikol ve ampisilin antibiyotikleri arasında %100 olarak tespit edilmiştir.

Seçilmiş 53 izolat 16S rDNA dizi analizi yöntemi ve BLASTN programı kullanılarak NCBI veri bankasında kayıtlı türlerin 16S rDNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre seçilmiş izolatlar içinde *Acinetobacter sp.* ve *Bacillus sp.* oldukça baskın cinsler olarak ortaya çıkmıştır. BLASTN sonucu Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sitemi sonuçları ile genus seviyesinde identik, tür seviyesinde ise benzer bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Marmara Denizi, İzmit Körfezi, İzolasyon, İdentifikasyon, Vitek otomatik tanımlama sistemi, 16S rDNA

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Isolation and Identification of the Bacteria from the Marmara Sea and Black Sea

AUTHOR: Mine GÜL-ŞEKER

In the frame work of the Ph D thesis, sample collection sites were determined as Marmara Sea entrance (M) where there was no urban or house discharge, and Black Sea entrance (B), from Bosphorus which represents the full characteristics of Black Sea, and internal, middle and external regions of Izmit Bay (IB). Sea of Marmara and Black Sea samples were collected once while, Izmit Bay samples were collected four times, at different periods depending on seasonal changes.

A total of 698 culturable marine bacteria isolates have been obtained from these collection sites: 132 isolates (M), 90 isolates (B), 82 isolates (IB 1), 119 isolates (IB 2), 129 isolates (IB 3), 146 isolates (IB 4).

The isolates of all purified 698 marine bacteria were initially characterized phenotypically by means of a combination of phenotypic tests including colonial apperance, cell morphology, Gram and spore staining, oxidase and catalase production. Following initial characterization, 46 out of 698 original isolates were preselected for further investigations especially to their ability to produce liquit deposition. 46 out of 698 marine isolates were purified by streaking plate methods. In this stage totally 53 isolates were purified. For these isolates conventional microbiological tests were performed. According to basic microbiological test results, manual identification stage has been carried out with using Bergey's Manual of Systematic Bacteriology reference book.

Selected isolates also identified at the species-level by using VITEK 2 Compact Automatic Identification System. According to the results, the samples have been determined *as Acinetobacter baumannii, Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis, Acinetobacter haemolyticus, Spingomonas paucimobilis, Brucella melitensis, Brevundimonas diminuta / vesicularis* and *Brevibacillus laterosporus*. Other 11 bacteria species were not identified.

Muliple heavy metal tolerance of the isolates were determined according to minimal inhibition concentration (MIC) values. Moreover, presence of possible interaction between multiple heavy metal and antibiotic resistance and extracellular enzyme production ability of the isolates were also examined result of this study revealed that majority of the Cu^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+3} resistant selected isolates were belonging to *Acinetobacter sp*. and *Bacillus sp.* genera which could be identified as indicators of heavy metal tolerance. In addition, majority of the metal resistant isolates were found to be resistant to at least 2 antibiotics and double resistance between heavy metal (Cd^{+2} and Cu+2) and antibiotic (chloramphenicol and ampicillin) resistance was determined as 100%.

Molecular characterization of the selected 53 isolates was also carried out by using 16S rDNA analysis and the obtained sequences compared with the sequence of the species sequence of the exist in the database of NCBI by using BLASTN program. According to the results *Acinetobacter sp.* and *Bacillus sp.* were appeared to be highly dominant genera among the selected isolates. In the genus level BLASTN results were found to be identical with the Vitek 2 Compact Automatic Identification System results while they were similar in the species level.

Key Words: Sea of Marmara, Izmit Bay**,** isolation, identification, VITEK Automatic Identification System, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Uzun soluklu bu koşuda yanımda olan ve sağladığı olanaklar ile her fırsatta yolumu açan sevgili hocam Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL' e ve tezimin oluşturulmasında, deneylerimin düzenlenmesi ve gerçekleştirilmesinde hep yanımda olan ve benimle beraber çalışan sevgili hocam Yrd. Doç Dr. Yosun MATER' e saygı ile teşekkür ederim.

Gösterdiği yakın ilgi, yardım ve desteği için dostum ve arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Yelda ÖZDEN-TOKATLI' ya tüm kalbimle teşekkür ediyorum. Bugüne kadar deneylerimin hazırlığı ve gerçekleştirilmesi esnasında adeta bir duvar gibi yanımda duran maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım ve dostum Özlem ASKER' e sonsuz teşekkür ediyorum. Hiç ummadığım bir anda verdiği o ufak kıvılcımla destek olan dostum ve arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Elif Aylin ÖZÜDOĞRU' ya çok teşekkür ediyorum. Her zaman desteğini hissettiğim ve yol göstericiliği ile yardımlarını esirgemeyen Hocam Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN' e, tüm bölüm akademik kadrosuna saygı ile teşekkür ediyorum.

İ.Ü., Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, R/V Arar Gemisi personeline ve GYTE Çevre Mühendisliği Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Salim ÖNCEL ve Doç. Dr. Güleda ENGİN' e deniz suyu örneklerimizin alınması konusunda gösterdikleri titizlik yakın ilgi ve nezakete, Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Personeli'ne Vitek 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Cihazı' nı kullanımı konusunda gösterdikleri anlayış ve ilgiye teşekkür ediyorum.

Her zaman güler yüzleriyle beni dinleyen ve sonsuz anlayışlı olan tüm laboratuvar arkadaşlarıma Arş. Gör. Tuğrul DORUK, Arş. Gör. Banu BAŞARA CİĞERİM' e, Arş. Gör. Sinem TUNCER' e, Biyolog Pelin BALÇIK ELÇİN' e, burada ayrılmış olsalar da her zaman kalbimde olan Fatih AKYOL ve Çiğdem İLERİ' ye kalpten teşekkür ediyorum. Tüm bölüm araştırma görevlilerine ve personeline teşekkür ediyorum.

Tüm doktora öğrenimim sürecinde ve öncesinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tezin gizli kahramanları olan eşim Murat ŞEKER' e, maddi ve manevi destekleri için annem, babam, kardeşlerime, teyzeme, küçücük yaşında bana gösterdiği sabrı ve anlayışı için kızım Zeynep-İdil' e sevgi ile teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması GYTE Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 2006-A-2 ve 2008-A-15 no' lu BAP araştırma projeleri ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Deniz Mikrobiyolojisinin Gelişimi	1
1.2. Yeni Biyoaktif Metabolit ve Enzim Kaynakları Olarak Deniz Mikroorganizmaları	4
1.3. Kazanılmış Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği ile İlgili Çalışmalar	5
1.4. 16S rDNA Dizilendirme Yöntemi ile İlgili Çalışmalar	7
1.4.1. Ribozomal RNA (rRNA)	8
1.4.2. Evrensel Primer ve PCR Protokolü ile İlgili Çalışmalar	12
1.5. Tezin Amacı	15
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
2.1. Gereçler	16
2.1.1. Kimyasal Maddeler	16
2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	17
2.2.Yöntem	18
2.2.1. Çözeltiler	18
2.2.1.1 Besiyerleri	19
2.2.1.2 Boyalar	22
2.2.1.3. Ayıraçlar	23
2.2.1.4. Kitler, Evrensel Primerler ve PCR Sarf Malzemeleri	23
2.2.2. Deniz Suyu Örneklerinin Alınması	26
2.2.3. İzolasyon Besiyerlerinin Seçimi ve Hazırlanması	27
2.2.4. Bakteri İzolasyonu ve Ekim Yöntemi	27
2.2.5. Oluşan Farklı Kolonilerin İzole Edilmesi	29
2.2.6. İzolatların Tanımlanmalarına Yönelik İlk Testler	30

2.2.6.1. Koloni Özelliklerinin (Tekstürlerinin) Gözlemlenmesi 30
2.2.6.2. Gram Boyama Testi 31
2.2.6.3. Katalaz Testi 32
2.2.6.4. Oksidaz Testi 32
2.2.6.5. Spor Boyama 33
2.2.7. İzolatlardan Tür Düzeyinde Tanımlanacakların Seçilmesi 34
2.2.7.1. Tanımlanmak Üzere Seçilen İzolatların -20 Stoklarından Canlandırılmaları 35
2.2.7.2. İzolatların Saf Olarak Elde Edilmesi 36
2.2.8. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Morfolojik Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler 38
2.2.8.1. Kapsül Boyama 38
2.2.8.2. Hareketlilik Testi 40
2.2.9. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Fizyolojik Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler 41
2.2.9.1. Lipid Boyama 41
2.2.9.2. Tuz Gereksinimi ve Toleransına Göre Testler 42
2.2.9.3. Antibiyotiklere Duyarlılık Testleri 42
2.2.10. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Biyokimyasal Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler 45
2.2.10.1. Üç Şekerli Demirli Agar'da Hidrojen Sülfür Oluşumu ve Karbonhidrat Kullanımı 45
2.2.10.2. IMVIC Testi 47
2.2.10.2.1. İndol Testi 47
2.2.10.2.2. Metil Kırmızısı Testi 48
2.2.10.2.3 Voges Proskauer (VP) Testi 49
2.2.10.2.4. Sitrat Testi 51
2.2.10.3 Karbonhidrat Kullanımı Testi 52
2.2.10.4. Oksidasyon-Fermentasyon (O/F) Testi 55
2.2.10.5. Dekarboksilaz Testi (Arginin ve Lizin) 57
2.2.10.6. Nitrat İndirgeme Testi 59
2.2.10.7. Hemoliz Testi 61
2.2.10.8. Jelatin Hidroliz Testi 62

2.2.10.9. Nişasta Hidrolizi Testi 63
2.2.10.10. Lipit Hidrolizi Testi 64
2.2.10.11. Protein Hidrolizi Testi 65
2.2.10.12. Selüloz Hidrolizi Testi 66
2.2.11. İzolatların otomatik Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanması 66
2.2.12. Seçilmiş İzolatların Çeşitli Ağır Metallere Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Değerlerinin Tayin Edilmesine Yönelik Deneyler 69
2.2.13. İzolatların Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlanması 71
2.2.13.1. Genomik DNA İzolasyonu 72
2.2.13.2. Kullanılan Termal Döngü Cihazı PCR Reaksiyon Karışımının Belirlenmesi ve Programının Oluşturulması 76
2.2.13.3. PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması ve 16S rDNA Bölgesinin Dizilendirilmesi ve Filogenetik Sınıflandırma 76
3. BULGULAR 78
3.1. Deniz İzolatlarının Örnekleme Bölgelerine Göre Dağılımı 78
3.2. İzolatların Ön Testlerine Ait Bulgular 78
3.3. Seçilmiş İzolatların Klasik Mikrobiyolojik Yöntemlerle Tür Düzeyinde Tanımlamasına Ait Bulgular 81
3.3.1.Antibiyotik Dirençliliklerine Göre İzolatların Dağılımı 99
3.4. İzolatların Otomatik Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanmasına Ait Bulgular 103
3.5. Seçilmiş İzolatların Çeşitli Ağır Metaller Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Minimal Inhibition Consantration-MIC) Değerlerine Ait Bulgular 109
3.5.1. Antibiyotik ile Ağır Metal Dirençliliği Arasındaki Etkileşim 107
3.5.2. Hücre Dışı Enzim Üretimi ile Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği Arasındaki Etkileşim 109
3.6. İzolatların Moleküler Biyolojik Yöntemler İle Tanımlanmasına Ait Bulgular 113
3.6.1. Genomik DNA izolasyonu 113

3.6.2. PCR Ürünleri 113
3.6.3. PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması ve 16S rDNA Bölgesini Dizilendirilmesi ve Filogenetik Sınıflandırma Bulguları 117
4. TARTIŞMA 130
4.1.VİTEK 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Sistemi, Klasik Tanımlama Yöntemi ve 16S rDNA Dizisi ile Tanımlama Sonuçlarının Karşılaştırılması 130
4.2. Antibiyotik ile Ağır Metal Dirençliliği Arasındaki Etkileşim 159
4.3.Hücre Dışı Enzim Üretimi ile Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği Arasındaki Etkileşim 161
4.4. Tanımlanan İzolatların Çeşitli Özellikleri ve Yeni Araştırma Konuları İçin Sahip Oldukları Potansiyel 168
4.5. Seçilmiş 53 İzolatın Örnekleme İstasyonları ve Derinliklerine Göre Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliklerinin İncelenmesi 174
4.6. Genel Sonuçlar ve Değerlendirme 175
KAYNAKLAR 179
ÖZGEÇMİŞ 199
EK-1 (İzolatlara Ait Tanımlama Tabloları)
EK-2 (Teze Ait Yayın)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	: Etilen diamidin tetraasetik asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaCL	: Sodyum klorür
CH_3COOH	: Asetik asit
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TE	: Tris EDTA
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Sıvı Besiyeri
LA	: Luria Agar
LB	: Luria Sıvı Besiyeri
TSI Agar	: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
MR	: Metil Kırmızısı
VP	: Voges Proskauer
O/F Besiyeri	: Oksidasyon/Fermantasyon Besiyeri
GPS	: Global Position System
ºC	: Derece santigrat
sa	: saat
w/v	: weight/ volume=ağırlık/hacim
v/v	: volume/volume=hacim/hacim
dH_2O	: distile su
m	: metre
Bkz	: bakınız
$FeSO_4$	: Demir sülfat
H_2S	: Hidojen Sülfür
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
N	: Normal
FA	: Fakültatif Anaerop
A	: Aerop

vbg	: ve benzeri gibi
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
$MnCl_2$	: Mangan Klorür
$Pb(NO_3)_4$	: Kurşun Nitrat
$CdCl_2$	: Kadmiyum Klorür
$CrCl_3$	: Krom Klorür
$CuSO_4$	: Bakır Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	Sayfa
2.1. Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonların dağılımı	26
2.2. Deniz suyu örneklerinin katı besiyerlerine ekimi	28
2.3. Filtre parçası üzerinde görülen farklı koloniler ve antagonist madde ürettiği düşünülen kolonin etki zonu fotoğrafı	29
2.4. Hücre içi (intraselüler) sıvı bir kimyasal madde biriktirdiği düşünülen koloniler	31
2.5. Schaffer Fulton ile boyanmış basiller	33
2.6. Kapsül Boyama (negatif) örnek resim	39
2.7. İzolatların on tanesinde hareketlilik testi fotoğrafı	40
2.8. Lipit Boyama sonucu PHB varlığı yönünden pozitif (A) ve negatif (B) izolatlar için örnek resimler	42
2.9. Örnek antibiyogram	43
2.10. TSI agar testi için örnek fotoğrafı	47
2.11. MR testi örnek fotoğrafı	49
2.12. VP testi için örnek fotoğrafı	50
2.13. Sitrat testi örnek fotoğrafı.	52
2.14. Karbohidrat kullanım testi sonuçlarına ait örnekler	53
2.15. Karbonhidrat kullanımı için örnek yerleşim planı	54
2.16. Karbonhidrat kullanım testi sonuçlarına ait izolatların on farklı şeker kullanımı için yapılan testlerinin sonuçlarından örnekler	54
2.17. Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) testi örnek resim	56
2.18. Lizin dekarboksilaz testi sonuçlarına ait fotoğraf	58
2.19. Arjinin dekarboksilaz testi sonuçlarına ait fotoğraf	59
2.20. Nitrat indirgenme basamakları ve buna bağlı renk reaksiyonu sonuçları	60
2.21. Nitrat testine ait fotoğraf	61
2.22. Hemoliz testi örnek resimleri	62
2.23. Jelatin Hidrolizi denemesine ait fotoğraf	63
2.24. Nişasta Hidrolizi Testi' ne göre amilaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek resimler	64
2.25. Lipit Hidrolizi Testi' ne göre lipaz negatif örnek fotoğrafı	64

2.26. Protein Hidrolizi Testi'ne göre proteaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek fotoğraflar 65
2.27. Selüloz Hidrolizi Testi'ne göre selülaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek fotoğraflar 66
2.28. Vitek otomatik tanımlama sistemi ile izolatların tanımlanmasında izlenen iş akışı 68
2.29. Mueller Hinton sıvı besiyerinin farklı ağır metal konsantrasyonlarına göre hazırlanışı 70
2.30. İzolatların ve ağır metalli besiyerlerinin dilüsyonlarının plaklara dağılımının örnek yerleşim planı 71
3.1. Deniz izolatlarının örnekleme bölgelerine göre dağılımı 78
3.2. İzolatların Gram boyama özelliklerine göre dağılımı 79
3.3. İzolatların hücre morfolojilerine göre dağılımı 80
3.4. İzolatların katalaz, oksidaz testi sonuçları ve spor varlığı yönünden dağılımı 81
3.5. Klasik tanımlama sonuçlarının cinslere göre dağılımı 98
3.6. İzmit Körfezi, Boğazın Marmara ve Karadeniz girişinden gelen antibiyotiklere dirençli izolatların sayısı ve dağılımı 100
3.7. İzmit Körfezi, Boğazın Marmara ve Karadeniz girişinden gelen çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren izolatların sayısı ve dağılımı 101
3.8. Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemine göre izolatların dağılımı 103
3.9. İstanbul Boğazı' nın Marmara ve Karadeniz girişi ile İzmit Körfezi' nden elde edilen ağır metallere dirençli izolatların sayısı 111
3.10. 1Kb belirtece ait farklı büyüklükteki DNA' ların dizilişi 113
3. 11. PCR ürünlerine ait jel fotoğrafları 114
4.1. İzolatların farklı tanımlama yöntemlerine göre tanımlanma düzeylerinin karşılaştırılması 175

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa no
2.1. Koloni özellikleri bakımından dikkat çekici bulunan izolatlar	34
2.2. Temel Mikrobiyolojik testler ve otomatik tanımlama sistemi ile tür düzeyinde tanımlanmaya alınan izolatların listesi	37
2.3. Kullanılan antibiyotik disklerine ait zon çapı bilgi çizelgesi	44
2.4. Seçilmiş izolatlardan elde edilen genomik DNA'ların miktarları	74
3.1. İzolatların büyüme ve koloni özellikleri	82
3.2. İzolatların hücre şekli ve Gram, spor, lipit, kapsül boyama, oksidaz ve katalaz testi sonuçları	85
3.3. Dekarboksilaz, Denitrifikasyon, O/F testi sonuçları	88
3.4. Karbonhidrat kullanımı testi sonuçları	91
3.5. TSI Agar, hareketlilik, hemoliz ve IMVIC testi sonuçları	94
3.6. Jelatin, nişasta, lipit, protein, selüloz hidrolizi testi sonuçları	97
3.7. Seçilmiş izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve MAR indeks değerlerinin hesaplanması	102
3.8. Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemine göre tür seviyesinde tanımlanmış izolatlar	104
3.9. Örnekleme istasyonları ve derinliklerine göre Vitek 2 ile tanımlanmış ve tanımlanmamış izolatların dağılımı	108
3.10. İstanbul Boğazı' nın Marmara Denizi ve Karadeniz girişi ile İzmit Körfezi' nden izole edilen bakterilerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) değerleri	110

3.11. İzolatlara ait 16S rDNA dizilerinin BLASTN programı ile elde edilen sorgulama sonuçları ve tanımlama yüzdeleri 118

3.12. BLASTN bulgularının özeti 128

4.1. İzolatların Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi, klasik yöntem ve 16S rDNA dizilerinin BLASTN programı ile tanımlanma sonuçlarının karşılaştırılması 131

4.2. *Bacillus sp.* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Bacillus cereus /Bacillus thuringiensis*'in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması 143

4.3. *Acinetobacter sp.* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *A. baumannii / A. haemolyticus / A. calcoaceticus*' un Bergey's Manual of Systematic Bacterology referans kitabından karşılaştırılması 147

4.4. *Acinetobacter haemolyticus* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *A. haemolyticus* 'un biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması 150

4.5. *Brevibacillus laterosporus* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Bacillus laterosporus* / *Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*'in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması 152

4.6. *Brevundimonas diminuta / B. vesicularis* izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Brevundimonas diminuta / B. vesicularis'* in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması 154

4.7. *Brucella melitensis* izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Brucella melitensis'* in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması 156

4.8. 193 / İK2-2 izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Staphylococcus pasteuri'* nin biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ve Chesneau ve ark. (1993)' e göre tanımlanması 158

4.9. Marmara Denizi, İzmit Körfezi ve Karadeniz izolatlarında çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliğinin karşılaştırılması 160

4.10. Seçilmiş 53 izolatın hücre dışı enzim üretimi, antibiyotik ve çoklu ağır metal dirençliliği arasındaki etkileşim 162

1.GİRİŞ

Okyanus ve deniz suları yeryüzünün yarısından fazlasını kaplamakta, dünya iklimi üzerindeki etkilerinin yanı sıra çok zengin bir hayvan, bitki ve mikroorganizma topluluğunu barındırmaktadır. Deniz suları, tuz oranları derinlik ve coğrafyaya göre değişmekle birlikte, litrede yaklaşık 35 g tuz içerir. Yüksek tuzluluk genelde buharlaşma ve su değişiminin bol olduğu kıyılarda ve suların sığ kesimlerinde görülür (Rodrigez-Valera, 1988). Bu doktora tezi kapsamında çalışma alanı olarak seçilen Marmara Denizi ise, Türkiye'nin kuzey doğusunda 40º 41´- 40º 47´ kuzey enlemleri ve 29º 21´–29º 57´ doğu boylamları arasında yer alır. Sularının özelliği bakımından, Akdeniz ile Karadeniz arasında bir geçiş özelliği gösterir. Karadeniz'den gelen üst akıntı nedeniyle yüzeyde % 0,23 tuz oranına, Akdeniz'den gelen alt akıntının etkisiyle derinlerde, özellikle Çanakkale Boğazı yakınlarında % 0,36 civarında tuz oranına sahiptir (www.geotics.com). Beşiktepe ve arkadaşları 1997 yılında, Marmara Denizi'nin hidrografisi ve dolaşımı üzerine yaptıkları araştırmalarında, uzun dönemli ölçümlere dayanan tuzluluk ortalamalarının, farklı akımlar ve su hareketliliğinden dolayı mevsimsel olarak değiştiğini belirtmektedirler. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kış aylarında Marmara Denizi için bildirilen tuz değerleri % 0,20-0,24 arasında değişmektedir. Ancak yaz aylarında Ege Denizi'nden gelen suların bir bölümü doğuya doğru farklı bir yol izleyerek, havzanın güney kısmını etkilediğinden, Marmara Denizi'nin güney kesimlerinde yaz aylarında tuzluluk oranlarının arttığı bildirilmiştir (Beşiktepe ve ark., 2000). Bu değişken tuzluluğun deniz mikroflorası üzerine etkili olduğu düşünülmektedir.

1.1. Deniz Mikrobiyolojisinin Gelişimi

Biyolojinin diğer alt bilimlerine göre genç bir bilim dalı olan Deniz Mikrobiyolojisi, 19.Yüzyılın sonlarında gelişmeye başlamıştır. 1855-1890 yılları arasında "Challenger Seyahatleri" gibi okyanus keşifleri, açık denizlerdeki mikrobiyolojik çalışmalar için kaynak sağlamıştır. İlk çalışmalar, deniz sularında yaşayan patojen mikroorganizmalar, ışık yayan (lüminesans) bakteriler ve azot döngüsü üzerinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar ise, biolüminesans yapan bakterilerin beslenmeleri, çeşitli deniz canlıları ile olan simbiyotik ilişkileri ve

ışık üretme mekanizmaları üzerine yoğunlaşarak, bu canlıların fizyolojileri üzerine pek çok yayın yapılmasına neden olmuştur (http://www.19thcenturyscience.org/HMSC/HMSC-INDEX/index-linked.htm).
1950'li yıllarda Galathea Seyahati, deniz ve psikrofilik bakteriler yönünden ilk kritik keşifler arasında yerini almıştır. Hidrostatik basınç üzerine yapılan çalışmalar, denizlerin mikrobiyolojik yönden keşfine öncülük etmiştir. Zorunlu psikrofiliklerin keşfi, oligotrofik koşullar altında mikrobiyal aktivitelerin açıklanmasına olanak sağlayan, "bolluk ya da kıtlık" ve "açlık ya da hayatta kalma" gibi çok önemli kavramların gelişimine öncülük etmiştir (Bruun ve ark., 1956).

1960 sonlarında araştırmacılar, deniz mikroorganizmalarını tanımlayıcı çalışmalar ve bu canlıların dağılımı üzerine odaklanmış olup, günümüzde deniz mikrobiyojisi, global deniz bilimlerinin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. 1975 -1986 döneminde biyofilm, deniz beslenme zincirinde bakterilerin rolü, denizlerin mikroorganizma ekolojisi, psikrofilik bakteriler, kıtlık anında hayatta kalma kavramı, mikroorganizmalardan oluşan biyokütlesi (biomas) ve deniz verimliliği gibi konular üzerine kapsamlı makaleler yazılmıştır. Bu dönemde ana gelişmeler; haliç ve tuzlu bataklık ekosistemlerinin araştırılması, özellikle metanogenezis gibi sülfat, nitrat ve demir indirgeme süreçlerinin incelenmesi yoluyla, organik maddelerin anaerobik mineralizasyonu konusunda gerçekleşmiştir. Deniz bakterilerini tanımlamada, rDNA dizi analizi gibi tekniklerin kullanımı, deniz bakterilerinin özellikle de *Vibrionaceae* grubundaki bakterilerin sınıflandırılması üzerine önemli katkılar sağlamıştır (Meyers, 2000).

1975 yılında John McNeill Sieburth, elektron mikroskobu yardımı ile gözlemlediği deniz bakterilerinin resimlerini *Micobial Seascapes* adlı kitabında yayımlamıştır. Bu detaylı mikrograflar deniz mikroorganizmalarında doğal morfolojik yapıyı ve bilinmeyen pek çok özelliği ortaya çıkarmıştır (DeLong, 2001).

Günümüzde araştırmalar, deniz bakterilerinin jeokimyasal rolleri gözetilerek, mikrobiyolojik dağılımdan, populasyon yoğunluğuna değin varan bir çeşitlilik kazanmış, mineral döngü, enerji akışı ve bakteriyel biyokütleyi de kapsayacak şekilde yön değiştirmiştir. Son yıllarda deniz mikrobiyolojisi ile ilgili temel konular; denizlerde yaşayan patojen mikroorganizmaların, hayatta kalma mekanizmaları,

deniz ekosisteminde yaşayan bu sistemin doğal parçası olan bakterilerinin varlığının irdelenmesi, deniz bakterilerinin izolasyonu, dağılımı ve bulunma sıklıkları, ana mikrobiyolojik sınıfların belirlenmesi, temel döngü süreçleri, numaralandırma yöntemi ve metodolojisi, bakterilerin ayrıştırıcı rolleri, mikrobiyal döngü, çeşitli süreçlerde deniz bakterilerinin aktiviteleri ve rolleri, derin deniz mikrobiyolojisinde keşifler ve termal yarıklarda yaşam ile tüm ekosistem çalışmaları, olarak sıralanmakta, moleküler temelli yöntemlerin kullanımı yapılan çalışmalara önemli katkılar sağlamaktadır (Meyers, 2000).

Chandramohan 1995'de yayımladığı makalesinde, Hint Denizi'nde 1976-1985 yılları arasında yapılan araştırmalarda, deniz canlıları üzerinde hastalık oluşturan *Salmonella irimu, S .panama, S. lexington ve Vibrio parahaemolyticus* türlerinin izole edildiğini bildirmektedir. Sonraki yıllarda aynı denizde yapılan diğer araştırmalarda *Desulfovibrio desulfuricans, D. salexigens, D. sapovorons, Desulfotomaculum orientis, D. acetoxidans, Desulfosarcina variabilis,* ve *Desulfococcu smultivarons* gibi sülfat indirgeyen bakteri türlerinin, *Vibrio harvei, V. fischeri* ve *Photobacterium leiognathi, P. phosphoreum* gibi ışık yayan bakteri türlerinin ve ayrıca deniz kaynaklı *Streptomyces* türlerinin izolasyon ve tanımlamalarının yapıldığını rapor etmiştir (Chandramohan, 1995).

Hutchesson ve arkadaşları 1999' da, Meksika körfezinde yaptıkları araştırmalarında, Gram negatif deniz bakterilerini, tuzluluk oranları % 3,4 ile % 3,9 arasında değişen bir bölgeden izole ettiklerini ve yoğunlukla *Vibrio aligonilictus* ve *V. metschenikovii* türlerini tanımladıklarını bildirmişlerdir (Hutchesson ve ark.,1999).

Pujalte ve arkadaşları 1999'da Akdeniz' de aerobik ve fakültatif anaerobik heterotrofik bakteriler üzerine yapılan araştırmalarda, *Vibrio splendidus, V. harveyi, V. pelagus, V. mediterranei ve V. vulnificus* türlerinin yanı sıra *Pseudoalteromonas luteoviolacea* ve *Protobacteria* türlerinin izolasyon ve tanımlamaları yapılmıştır (Pujalte ve ark., 1999).

1.2.Yeni Biyoaktif Metabolit ve Enzim Kaynakları Olarak Deniz Mikroorganizmaları

Denizden elde edilen doğal ürünler son 50 yıldır tüm dünyada kimyacılar ve biyologların ilgisini çekmektedir. Deniz mikroorganizmalarından elde edilmiş deniz kaynaklı 16000 ürün literatürlerde yer almıştır. Bunlara ek olarak bu ürünleri konu alan biyolojik aktivite çalışmaları ve sentez mekanizmaları üzerine de yaklaşık 9000 yayının varlığından söz edilmektedir (Bhakuni ve Rawat, 2005).

Denizlerden izole edilen mikroorganizmaların ürettiği biyoaktif metabolitler içinde en yaygın bilinenleri toksinler, antibiyotikler ve çeşitli ilaç ajanları olduğu ifade edilmektedir. Bu maddelerin izolatlardan saf olarak elde edilme basamaklarını takiben üretildikleri sıvı besiyerlerinden ayrıştırılmaları ve doğru yöntemlerle (özütleme, kısmi saflaştırma gibi) tanımlanmalarının gerektiği bildirilmektedir. Bunun sonucunda tanımlanan metabolitin *in vivo* da zararsız olduğunun test edilmesi bir zorunluluktur. Ayrıca bulunan aktif metabolitin tayin edilmesi uzun bir süreci kapsamakta ve güçlü maddi destek gerektirmektedir (Lanchini ve Lorenzetti, 1993).

Biyolojik olarak aktif enzimler yaşayan herhangi bir mikroorganizmadan özütlenebilir. Enzimlerin yüzlercesi belki daha fazlası, endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Bunların yarısından çoğu mikrofungus ve mayalardan, üçte birinden fazlası bakterilerden kalan kısım ise hayvan (%8) ve bitki (%4) kaynaklarından elde edilmektedir. Enzimlerin çok büyük bir kısmının kimyasal analizlerde ve klinik olarak tanı amaçlı kullanım alanları vardır. Günümüzde mikrobiyal olmayan (hayvansal ve bitkisel) kaynaklar ihtiyacın bir kısmını sağlamakla beraber, enzim kaynağı olarak bakteriler, bitki ve hayvanlara tercih edilirler. Çünkü mikrobiyal kaynaklı enzimlerin genel olarak elde edilmeleri daha ucuzdur. Ürettikleri enzim miktarları tahmin ve kontrol edilebilmekte, kararlı yapıları kolaylıkla düzenlenebilmektedir. Üstelik bitki ve hayvan dokuları bakterilere göre potansiyel olarak daha zararlı materyalleri içermektedir. Bunların arasında, bitkilerin içerdiği fenolik bileşenler ve hayvanların içerdiği endojen enzim inhibitörleri, proteazlar gibi bileşenler sayılabilir (http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sources.html).

Deniz mikroorganizmaları çok geniş bir enzimatik aktiviteye ve yeni enzimlerle çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Chandesekaran, 1997). Bunların arasında, aerobik bakterilerin amilazlar, deoksiribonükleazlar, lipazlar, proteazlar gibi enzimleri üretebilme vb özellikleri literatürde bildirilmiştir (Rheinheimer, 1992). Bu enzimler üzerine yapılan yayınlara rağmen, bunların potansiyel endüstriyel uygulamalarına dair bilgilere çok az rastlanır. Deniz bakterileri arasında bazı türlerin, aljinat liyazları, kitinazları, glukonazları, sıcaklığa dayanıklı bazı enzimleri, glutaminazlar ve DNA polimerazları bol miktarda ürettiği bilinmektedir (Rheinheimer, 1992, Austin 1992; Renu ve Chandasekaran 1992 a,b). Tüm bunlara ek olarak, yeni restriksiyon enzimleri, yüzey aktif maddelerin organik olarak sentezinde, steroit ilaç ve bileşenlerin yapısını değitirecek, besinlerdeki toksik maddelerin detoksifikasyonunda, sentetik bileşenlerin ve kirleticilerin yıkılmasında kullanılabilecek, biyotransformasyon enzimlerini üretme kabiliyetindeki türleri de içerdiği bildirilmektedir. Tuz toleransına sahip enzimler, deri işlemesinde kullanılan asidofilik ve özellikle atık su arıtımında kullanılan oldukça alkalin enzimlerin deniz bakterilerinde varlığıda literatürde bildirilmiştir (Chandrasekaran, 1997). Ayrıca deniz bakterilerinin ürettiği enzimleri tercih edilir hale getiren bazı özellikleri (tuza dayanıklık, yüksek sıcaklıklarda kararlılık vbg) olduğu ve bu özellikleri ile PCR (Polymerase Chain Reaction=Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli moleküler biyolojik yöntemlerde kullanılabilecek yeni enzimler için (polimerazlar, ligazlar vbg) önemli birer kaynak oldukları bildirilmektedir (http://www.marine-genomics-europe.org/index2.php?rub=a&pid=23& aid=342).

1.3. Kazanılmış Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği ile İlgili Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında örnekleme bölgesini konu edinen yayınlar incelendiğinde, son yıllarda yapılan yayınlarda Marmara Denizi ve civarında endüstürileşme ve yerleşim bölgelerinin artışı ile özellikle metal kontaminasyonunun bu bölgelerde arttığına işaret etmektedir (Topçuoğlu ve ark., 2002; Pekey ve ark. 2004; Pekey, 2006 a,b). Bununla beraber tez kapsamında örnek alım noktalarının bulunduğu İzmit Körfezi ise, diğer örnek alım noktalarını da kapsayan İstanbul

Boğazı' na yakın bir bölgede konumlanmış giderek kalabalıklaşan insan populasyonundan [yaklaşık 2 milyon kişi ikamet etmektedir. (Yaşar ve ark., 2001)] ve endüstürileşmeden [yaklaşık 300 büyük sanayi kuruluşu bulunmaktadır. (Pekey ve ark., 2004)] oldukça etkilenen yarı kapalı bir körfezdir. Ek olarak özellikle ağır gemi taşımacılığı (Okay ve ark., 2001), ülke ihtiyacının yaklaşık %30' unu karşılayan bir petrol rafinerisi körfezin kuzeybatı bölgesinde konumlanmıştır (Pekey ve ark., 2004). Diğer örnekleme noktalarını kapsayan Marmara Denizi ve Karadeniz ise özellikle metal ağırlıklı veya diğer kirleticilerin nehirler vasıtasıyla taşıdığı kirleticiler ile endüstüriyel olmayan tarımsal, hastane ve şehir atıklarının doğrudan salınımı yolu ile, aynı zamanda deniz taşımacılığı ile [Boğazdan yaklaşık yılda 6000 gemi geçiş yapmaktadır. (Güven ve ark., 2004)] ve yabancı gemiler tarafından sorumsuzca bırakılan variller içinde safra atıkları (Topçuoğlu ve ark., 1990) veya büyük tankerlerin karıştığı önemli deniz kazaları nedeniyle salınan petrol ile kirletilmektedir (Taşdemir, 2002; Topçuoğlu ve ark., 2002).

Son yıllarda veteriner, tıp, tarım ve akuakültür (balık çiftliği üretimi vbg.) alanında giderek artan seviyede antibiyotik kullanımına rağmen, bunların kullanımından sonra ne kadarının doğaya döndüğüne dair çok az şey bilinmektedir (Halling-Sørensen ve ark., 1998; Backhaus ve Grimme, 1999, Hirsch ve ark., 1999). Artan antibiyotik kullanımı, bakteriler üzerinde etkin bir seçilimin göstergesidir (Schwartz ve ark., 2003). Bakterilerin çoğu kendilerine karşı kullanılan antibiyotikleri etkisiz kılacak çeşitli ve çok etkili direnç mekanizmaları geliştirmiştir (Mudryk, 2005). Bu mekanizmalara örnek olarak; hücre içine antibiyotiğin geçişinin indirgenmesi ya da antibiyotiğin hücre dışına veya içine taşınmasındaki değişiklikler, hedef moleküllerin hücresel değişiklikleri, etkisiz antibiyotik veya modifiye olmuş enzim üretimi sayılabilir (Hermansson ve ark., 1987). İşte bu nedenle deniz bakterilerinin de bu değişimlerden etkilenmesi ve bu kadar yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç geliştirmiş türlere sahip olması mümkün görünmektedir. Bu nedenle mevcut izolatların antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekli görüldü.

Litetürde adı geçen kontaminasyon etkenlerinin, bu alanda yaşayan deniz bakterilerinde bazı adaptasyonlara neden olduğu ve bu adaptasyonun bir sonucu olarak da özellikle ağır metal dirençliliğine neden olabileceği düşünülmektedir.

Deniz bakterilerinde ağır metallere karşı adaptasyon ve insanlarda hastalığa neden olan etkenlerde (patojenler) antibiyotik dirençliliğinin ortaya çıkışının küresel bir olguya sebep olduğu bildirilmiştir (Akinbowale ve ark., 2007). Bu durum antibiyotik dirençliliği ile de ilişkili olabilen ağır metal dirençlilik genlerini üzerinde taşıyan plazmitlerin yayılması ile ilişkilendirilmektedir (Bezverbnaya ve ark., 2005).

Bugüne kadar kirlilik seviyesini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda, indikatör olarak balıklar, omurgasızlar, algler, çeşitli beslenme seviyelerinden veya sedimentten (Demirel ve Kulege, 2004; Karbassi ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2008) gelen türlerin kombinasyonlarından faydalanılmıştır (Chandy, 1999; Fidan ve ark., 2008; Fırat ve ark., 2008). Bu bölgedeki özellikle kimyasal kirliliği ortaya çıkarmak için, İzmit Körfezi, Marmara Denizi ve Karadeniz' den alınan deniz suyu örneklerinde de bu çalışmaların yapıldığı görülmektedir (Tolun ve ark., 2001; Topcuoğlu ve ark., 2002; Pekey ve ark., 2004; Pekey 2006a,b). Bununla beraber özgün habitat şartlarına adapte olma yetenekleri nedeniyle, mikroorganizmaların toksisitenin hızlı bir şekilde taranmasının için en iyi indikatörlerden biri olduğu açıktır (Dutka ve Bitton, 1986; Liu ve ark., 1989; Stauber ve Florence, 1989; Nair ve ark., 1992). Bundan dolayı kısa sürede toksisite tayini deneylerinde bakteri, maya, mantar, tek hücreliler ve alglerin kullanımı giderek gelişmektedir. Fakat, ilginç bir şekilde bu tezin araştırma konusunu oluşturan örnek alma sahasında denizden yapılan izolasyonların konu edildiği çalışmalara sınırlı sayıda rastlanmaktadır (Aslan-Yılmaz ve ark., 2004).

1.4. 16S rDNA Dizilendirme Yöntemi ile İlgili Çalışmalar

Moleküler biyolojik yöntemler ile sınıflandırma genlere ve onların ürünlerine dayandırıldığı için türler arasında doğru bağlantıları kurmayı sağlamaktadır.(Klein, 1996). Bakterilerin sınıflandırılmasınds günümüzde yedi farklı yaklaşım getirilebilmektedir. Bunlar;

1- DNA homolojisi ve DNA' nın % G+C içeriği
2- 23S, 16S ve 5S rRNA dizi benzerliği,
3- Oligonukleotitlerin kataloglanması,
4-Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin ana noktasını oluşturan toplam çözünebilir proteinlerin sayısal sınıflveırımına yönelik analizler,

5- Hücre duvarı analizleri,
6- Serolojik profiller,
7- Hücresel yağ asitlerinin profilleridir.

Geleneksel sınıflandırma yöntemleri ile özellikle 1980'li yıllardan sonra geliştirilen Moleküler Biyoloji temelli tekniklerin beraber kullanılması, bakteriyel sınıflandırmanın hızlı bir şekilde gelişimine ve yeni sınıfların, mevcut mikroorganizma gruplarına eklenmesine yol açmıştır (Akçelik, 2000).

1.4.1. Ribozomal RNA (rRNA)

Canlılar dünyasını prokaryotlar ve ökaryotlar diye ikiye ayırmak nesillerin ortak çizgisinden gelen çeşitli ilkel dallanmaların gizli kalması gibi bir problemi beraberinde getirir. Çünkü canlıları prokaryot ve ökaryot gibi iki ana gruba ayırmak temel bir filogenetik ayırım değildir. Kuşkusuz ki farklılıkları dökümante edebilecek sınırsız moleküler detay bulunmaktadır. Ancak günümüze kadar canlıların bu iki temel tipte sınıflandırma biçimi ile sınırlandırılması ciddi bir yanılgıdır. Açık bir şekilde bilinmektedir ki ökaryotlar prokaryotlara göre çok daha karmaşık ve farklı yollarla düzenlenirler (Woese ve Fox, 1977).

Canlılar arasındaki filogenetik akrabalıklar karşılaştırılamayacak özellikler üzerinden kurulamaz (Sneath ve Sokal, 1973). Bunun için karşılaştırılabilir yapılardaki farklılıkların, ölçülebilir bir temele oturması gerekir. Bu bağlamda bir organizmanın genomu onun evrimsel tarihini kaydeden güçlü bir veri olarak elimizde bulunmaktadır (Zuckerkendl ve Pauling, 1965). İşte bu yüzden moleküler dizilerin karşılaştırmalı analizi, canlılar arasındaki filogenetik akrabalıkları tayin etmek için güçlü bir yaklaşım olduğu literatürde ifade edilmiştir (Fitch ve Margoliash, 1967).

Son elli yıllık dilimde geniş canlı sistemlerinin tüm halkalarını örten akrabalık derecelerini bulmak için, bazı bölümleri sabit olan ancak türler arasındaki farklılıkları ortaya koyabilecek değişken bölgeleri içeren özel bir moleküle ihtiyaç duyulmuştur. Hazır bir şekilde tanımlı proteinlerin hiçbiri bu ihtiyaca uygun olmadığı da ifade edilmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda rRNA bu ihtiyaca cevap verebilecek anahtar bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. rRNA dizi tanımlamalarına bağlı filogenetik analizler var olan canlı sistemlerin 3 ana koldan farklılaştığını ortaya koymuştur. Bunlar sırası ile Öbakteriler (Eubacteria-tüm

bakterileri içerir), Arkealar (Archea-metanojenik bakterileri içerir) ve Ökaryotlar (Eucaryotes-sitoplazmik bileşenleri olan bir ya da çok hücreliler) dır (Woese ve Fox, 1977).

Sınıflandırmada bakteri kaynaklı RNA'dan bilgi elde etmek için, ya RNA nükleotit dizilerinin ya da dizi homolojilerinin belirlenmesi yöntemleri kullanılmaktadır. Prokaryotik canlılar 70S ribozomlara sahiptirler ve bu ribozomlar 30S ve 50S' lik alt birimlerden oluşur. 50S büyük altbirimi bugün bilinen 34 farklı proteinden (L proteinleri= Large proteins) ve bunlara ek olarak 5S ve 23S rRNA' dan oluşmuştur. 30S küçük alt birimi ise 21 farklı ribozomal protein (S Proteinleri=Small proteins) ve 16S rRNA' dan meydana gelmiştir. 16S rRNA, yaklaşık 1500 ribonukleotitten oluşur. Bu tek zincirli rRNA molekülü, çift zincirli uzun ara zincirleri ile karmaşık bir yapıya sahiptir. 16S rRNA, mRNA' nın, protein sentezi sürecinde işlevseldir. Üzerinde mRNA' daki Shine–Dalgarno dizisinin karşılığı olan anti - Shine Dalgarno dizisini bulundurur. Bu dizi mRNA' nın ribozom üzerinde konumlanmasına izin verir. rRNA'lar işlevsel olarak korunmuş, evrensel dağılım gösteren ve geniş filogenetik farklılıklara karşın dizileri iyi korunmuş çok eski moleküllerdir. Bu özelliklerinden dolayı rRNA'lar, prokaryotlar arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymak konusunda eşsiz moleküllerdir ve bakteri evriminin mükemmel bir kronometresi olarak kabul edilmektedirler. Ayrıca rRNA genleri, dizi sıralaması ve tanımlanmaları konusunda kolaylıkla ulaşılabilen geniş bir veritabanına (Ribosomal Database Project) sahiptir (http://wwjw.micromemanalytical.com/molbiol/comp3.htm).

"Revers Transkriptaz" enzimi sayesinde 16S rRNA dizilerinden rDNA dizilerinin elde edilmesi ve bu dizilerin homolojisi sonucu bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin saptanması mümkün olabilmektedir. Çoğu büyük filogenetik grubun 16S rRNA'ları oligonükleotit imzası (oligonucleotid signature) olarak isimlendirilen bir ya da daha fazla tanımlayıcı nükleotit dizisine sahiptirler. Oligonükleotit imza dizileri, özel bir filogenetik grubun çoğu ya da tüm üyelerinde bulunan özgün dizilerdir. Bu diziler arasındaki benzerlik daima filogenetik ilişkilere işaret eder. Bununla beraber, iki organizma arasındaki göreceli evrimsel bağa işaret eden aslında onların dizileri arasındaki benzerliğin derecesidir. rDNA çalışmalarının

yanında rDNA katalogları hazırlanmış ve zengin 16S rDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. (http://prion.bchs.uh.edu).

Klein tarafından Mikrobiyoloji (1996) kitabında; 6-20 nukleotitlik oligonukleotit dizileri ile, farklı bakterilerden gelen rRNA parçalarının ilişkili dizilerinin karşılaştırılması ile benzerlik katsayılarının (S_{ab} değeri) bilgisayarda hesaplanabildiği bildirilmektedir. Eğer iki organizmanın 16S rRNA' larından gelen tüm T_1 ribonukleaz kesim ürünleri, dizi düzeyinde özdeş ise, S_{ab} değeri 1.0' dır. S_{ab} değeri evrimsel sürecin bir ölçüsünü de verir. Uzun süre önce diğer bakterilerden farklılaşarak ayrılmış bir grup bakteri, çok geniş bir S_{ab} değeri gösterecektir. Çünkü son zamanlarda ayrılan diğer bakteri grubuna farklılaşmak için çok daha fazla zamana sahip olmuştur. S_{ab} değerlerini hesaplayan bilgisayar programı bu benzerlikler ve farklılıkları bir dallanma grafiği (dendogram) ile özetler. Ancak bu uygulama RNA parçalarından ziyade, dizilendirilmesi tamamlanmış rRNA molekülleri için mümkündür (Klein, 1996).

Morris ve arkadaşları, 2000'de, Gram pozitif deniz bakterileri üzerine yaptıkları araştırmalarında, bu bakterilerden izole ettikleri, genomik DNA'yı kalıp olarak kullanmışlar ve 16S rDNA bölgesini PCR ile çoğaltmışlardır. PCR ürünlerini, Lac Z geni içine klonladıkları plazmitler, konak *Eschericia coli*'ye aktarılmış ve plazmiti içine alan transformanları seçmek üzere, X-gal/ampisilin içeren LB besiyeri kullanılmıştır. Beyaz koloniler oluşturan klonlar seçilmiş ve bu klonlardan izole edilen plazmit DNA'larının dizi analizleri yapılmıştır. Elde edilen diziler GenBank'ın BLAST arama programında analiz edilmiştir. Dizilerin karşılaştırıldığı çalışma sonucunda, izole edilen bakteriler, *Bacillus sp, Bacillus thermoaerophilus*, *γ Protobacterium sp.* olarak tanımlanmıştır (Morris ve ark., 2000).

Pukall ve arkadaşları, 1999'da, Akdeniz'den topladıkları *Alteromonas macleodii* türünün 16S rDNA'sı üzerine yaptıkları çalışmalarında genomik DNA'nın izolasyonunun ardından 16S rDNA'yı 27f ve 1527r evrensel primerlerini kullanarak PCR ile çoğaltmış ve PCR ürünlerini, Prep-A-Gene kiti kullanarak saflaştırmışlardır. PCR ürünleri, "pGEM T (Easy) Vector System II" (Promega) kullanılarak klonlanmıştır. Bu klonlardan elde edilen plazmitler üzerine yerleştirilen DNA parçaları, M13(-21) ve M13r primerlerinin kullanımıyla yeniden çoğaltılmıştır. Elde edilen klonlar üzerinden 16 S rDNA genini 530r veya 357r evrensel primerleri

kullanılarak kısmi olarak çoğaltılmıştır. Transformanlardan DNA izolasyonu yapılmış ve kısmi ya da tam 16S rDNA dizi analizleri, "*Taq* Dye Deoxy Terminator Sequencing Kit" (Applied Biosystems) kullanılarak otomatik DNA dizilendirme cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Pukall ve ark., 1999).

Mergaert ve arkadaşları, 2001'de, kutup bölgelerindeki denizlerden topladıkları fakültatif oligotrofik bakterilerin 16S rDNA dizileri ile tanımlanmaları konulu araştırmalarında, 23 soydan genomik DNA izolasyonunun ardından, 16S rDNA genlerini termal döngü cihazı ile çoğaltmışlardır. Bu çalışmada bazı evrensel primer dizileri kullanılmıştır. Termal döngü cihazı tarafından çoğaltılan PCR ürünleri "QIAquick PCR Purification" kiti (Qiagen) ile saflaştırılmıştır. Dizi analizleri, "Biosystem 377 DNA sequencer" ile gerçekleştirilmiş ve "BigDyeTerminator Cycle Sequencing Ready Reaction" kiti kullanılmıştır. Diziler arasındaki benzerlikler "Auto Assembler 1.4.0" programı kullanılarak bulunmuştur. En yakın ilişkili diziler FASTA programı kullanılarak belirlenmiştir. Filogenetik analizler ise GeneCompar 2.1 bilgisayar paket programı ile yapılmıştır (Mergaert ve ark., 2001).

Dennis ve Sidie 2001'de, denizden izole ettikleri Gram pozitif bakterilerin genomik DNA'larını "Qiagen Genomic Tipa" sistemini kullanarak özütlemişler ve 16S ribozomal DNA'nın 600 baz çiftlik son derece çeşitlilik gösteren bir bölgesi için seçici primerler kullanmışlardır**.** Oluşturdukları DNA parçalarının dizilerini belirlemişler ve bilinen Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ilgili dizileri ile göreceli genetik ilişkiyi bulmak için dizi homolojilerini BLAST programı ile araştırmışlardır. Sonuç olarak bu soyların pek çoğu için (2001 yılı için) veri tabanlarında herhangi bir homolog diziye rastlamadıklarını bildirmişlerdir (Dennis ve Sidie 2001).

Kwon ve arkadaşları, 2002'de, biyofilm formundaki deniz bakterileri üzerine yaptıkları araştırmalarında seçilmiş soyların genomik DNA'larını "Wizard Genomic DNA purification Kit" kullanarak saflaştırmışlardır. Uygun primerler düzenleyerek, genomik DNA kalıbından 16S rDNA'nın çoğaltılmasında kullanmışlardır. PCR ürünlerini "Wizard PCR Preps DNA Purification Kit" kullanarak saflaştırmışlardır. 16S rDNA dizilerinin yaklaşık 1000 bazlık bölgelerini, "ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit" kullanarak tanımlamışlardır. Bir sonraki adımda, aynı primerleri dizi tayini için kullanmışlardır. 16S rDNA dizilerinin

analizlerini, RDP2 den SIMILARITY RANK ve BLAST programlarını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bölgesel rDNA dizileri RPD'den gelen 16S rDNA verileri ile karşılaştırılmıştır. PHYLIP (3,57 versiyonu) programını dizilerin analizinde kullanmışlardır. Dizi benzerliklerini bulmak üzere geliştirilmiş DNADIST programını kullanarak benzerlikler bulmuşlar ve filogenetik ağacın oluşturulmasında FITCH programını kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarının AY159882 ile AY159889 arasındaki ulaşım numaraları ile GenBank'ta erişilebilir konumda olduğunu bildirmişlerdir (Kwon ve ark., 2002).

1.4.2. Evrensel Primer ve PCR Protokolü ile İlgili Çalışmalar

Kullanılacak evrensel primerlerin dizayn edilmesi konusunda aşağıdaki literatür bilgisinden faydalanılmıştır.

Vanbroekhoven ve arkadaşları, 2004' deki çalışmalarında *Acinetobacter sp.* türlerini genotipik olarak tanımlamak için hem bu türe özgül primerlerden ve hem de evrensel primerlerden yararlanmışlardır. *Acinetobacter sp.* için türe özgül primer olarak *Eschericia coli*' deki pozisyonuna göre numaralandırılmış Ac436F (5' – TTTAAGCGAGGAGGAGG - 3') ve Ac 676R (5' – ATTCTACCATCCTCTCCC - 3') primerlerini kullanmışlardır. Diğer bir primer çeşidi olarak genel 16S rRNA evrensel primerlerini 27F (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') ve 1492R (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3') kullanmışlardır. Yuvalanmış (Nested) PCR uygulaması ile hedef 16S rDNA bölgesi elde edilmiş ve tanımlama yapılmıştır (Vanbroekhoven ve ark., 2004).

Güney Kore' de yapılan bir araştırma kapsamında izole edilen *Sphingomonas sp.*' nin genotipik tanımlanması evrensel primerler (16SF, 5' – GAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' ve 16SR, 5' – AGAAAGGAGGTGATCCAGCC - 3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Termal Döngü Cihazı, 16S rDNA bölgesini çoğaltmak üzere *Taq* DNA polimeraz kullanılarak, 94 ºC' ta 5 dk ilk denatürasyon için; 94 ºC' ta 1 dk denatürasyon; 55 ºC' ta 1 dk bağlanma; 72 ºC' ta 1dk uzama için (toplam 30 döngü) ve 72 ºC' ta 5 dk son uzama için programlanmıştır. PCR ürünlerini saflaştırmak üzere QUIAEX II jel özütleme kiti (Qiagen, Hilden, Germany) ve kullanılmıştır. 16S rDNA bölgesi

Applied Biosystems 373A Dizilendirme Cihazı (Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts, U.S.A) ile dizilendirilmiştir (Seo ve ark., 2004).

Çeşitli kaynaklardan izole edilen *Sphingomonas sp.* morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlendiği ilk tetstlerin ardından 16S rDNA bölgesi *Eschericia coli* 9-31 pozisyonu ile ilişkili 9F 5' – GAGTTTGATCATGGCTCAGATTG – 3' ile *Eschericia coli* 1460-1480 pozisyonu ile ilişkili 1480R 5' – TTCCTTGTTACGACTTCACCC - 3' primerleri kullanılarak Termal Döngü Cihazı eliyle çoğaltılmıştır. Termal Döngü Cihazı 98ºC' ta başlangıç denatürasyonu için, 5 dk; 94 ºC' ta 1 dk denatürasyon; 55 ºC' ta 1 dk bağlanma; 72 ºC' ta 2 dk uzama için (toplam 30 döngü) ve 72 ºC' ta 7 dk son uzama için programlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, dizilendirilerek tür seviyesinde tanımlama yapılmıştır (Zhu ve ark., 2007).

Park ve arkadaşları, 2008 yılındaki araştırmalarında mikroalglerden izole ettikleri *Brevundimonas sp.*'leri tanımlamak üzere 27F (5' - AGAGTTTGAT(A/C)TGGCTCAG C - 3') ve 1492R (5' - TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT - 3') 16S evrensel primerleri kullanmışlardır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jelden geri kazanılması için saflaştırma kiti (Bio-Rad, Hercules, CA,USA) kullanmışlardır (Park ve ark., 2008).

Da Silva ve arkadaşları, 2006, hastane kaynaklı *Brevundimonas dimunata*' nın tanımlanmasında Öbakteriyel evrensel primerler PA (5'- AGAGTTTGAT(A/C)TGGCTCAG C - 3') ve PD (5' – GTATTACCGCGGCTGCTG - 3') kullanılmıştır. İzolatlardan genomik DNA izolasyonu DNA izolasyon kiti (QIAampMini kit, Qiagen GmbH, Hilden Germany) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA ve öbakteriyel evrensel primerler kullanılarak Termal Döngü Cihazı' nda hedef 16S rDNA bölgesi çoğaltılmıştır. Cihaz; 95 ºC' ta 15 dk başlangış sıcaklığı için, 95 ºC' ta 40 sn denatürasyon, 58 ºC' ta 1 dk bağlanma; 72 ºC' ta 1 dk uzama için (toplam 32 döngü) ve 72 ºC' ta 10 dk son uzama basamağı için programlanmıştır. PCR ürünlerini jelden geri kazanmak üzere ise kit (QIAquick Gel Extraction Kit / Qiagen / Hilden-Germany) kullanılmıştır (Da Silva ve ark., 2006).

Chen ve Tsen, 2002 *Bacillus cereus ve Bacillus thuringiensis* türlerinin otamatik tanımlama sistemleri ve moleküler biyolojik yöntemlerle ayırt edilmesinde karşılaşılan güçlükleri tartıştıkları çalışmalarında bu iki tür için kromozomal genler üzerindeki *gry*B genleri ve 16Sr RNA izerindeki değişken V1 bölgesinin ayırt edici bir faktör olarak faydalı olabileceğini önermişlerdir. Çünkü eğer *Bacillus thuringiensis* kendisi için önemli bir ayırt edici faktör olan *cry* genlerini içeren plazmitlerini kaybetmişse *Bacillus cereus*'tan ayırt edilmesinin güç olduğunu vurgulamışlardır. Bu amaçla BcF (5' – GGATTAAGAGCTTGCTCTTAT - 3') ve BtF (5'- GATTGAGAGCTTGCTCTCAA - 3') ile her iki ileri (forward) primer için evrensel 16S iki ters (revers) primer (5'- AAGCCCTATCTCTAGGGTTT - 3') kullanılırken *gyr*B gen dizisi için tasarlanmış BC1 (5' – ATTGGTGACACCGATCAAACA – 3') / BC2r (5'- TCATACGTATGGATGTTATTC - 3') ve BT1 (5'- ATCGGTGATACAGATAAGACT – 3') / BT2r (5'- CCTTCATACGTATGAATATTATTT - 3') primerlerinin kullanıldığı rapor edilmiştir (Chen ve Tsen, 2002).

Ki ve arkadaşları, 2009 denizlerden izole edilen *Bacillus sp.*' lerin 16S rDNA dizileri ve *rpoB* gen dizilerinin karşılaştırılması yolu ile tür seviyesinde tanımlanmalarını konu alan çalışmalarında, farklı 16S rRNA evrensel primer kombinasyonları ile *rpoB* genlerine özgül primerler kullanmışlardır. Bu primer kombinasyonları 27F- 1492R, 27F – 1389R ve 519F- 1492R olarak bildirilmektedir. 27f (5'- AGA GTTTGATCMTGGCTCAG - 3'); 519F (5' – CAGCMGCCGCGGTAATAC – 3'); 1389R (5' – TGACGGGCGGTGTGTACAAG - 3'); 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGT - 3') dır. Termal Döngü Cihazı; 95 ºC' ta 3 dk başlangıç denatürasyonu için, 95 ºC' ta 20 sn denastürasyon, 55 ºC' ta 30 sn bağlanma, 72 ºC' ta 1,5 dk uzama için (toplam 35 döngü) ve 72 ºC' ta 5 dk final uzaması için programlanmıştır. Her bir PCR ürünü 2 µl olarak %1' lik agaroz jelde (1X TAE buffer da hazırlanmış) yürütülmüştür. PCR ürünleri UV ışık altında görüntülenmiş ve jelden ürünler PCR saflaştırma kiti (PCR prufication Mini Kit / Watson Biotechnologies Inc., China) ile geri kazanılmıştır (Ki ve ark., 2009).

1.5. Tezin Amacı

Bu çalışma uluslararası düzeyde oldukça kabul gören bir çalışma alanı olan Deniz Mikrobiyolojisi' ni kendine konu olarak seçmiştir. Buralardan izole edilen ve tanımlanan bakteriler yukarıdaki literatür bilgisinde verildiği üzere şaşırtıcı özellikleri ile öne çıkmaktadır. Gerek hastalık yapıcı ve gerekse endüstriyel ve farmokolojik öneme sahip tüm türler çalışılan denizlerin mikrobiyolojik florası üzerine tanımlayıcı bilgiyi sunması yeni bilimsel araştırmaların kapısını aralamaktadır. Literatürde deniz mikrobiyolojisi üzerine yer alan pek çok kaynakta biyolojik öneme sahip türlerin tanımlanmalarının endüstüriyel, farmakolojik ve ekonomik katkıları da vurgulanmaktadır. Çalışmamızda İstanbul Boğazı Marmara Denizi ve Karadeniz girişi ile İzmit Körfezi mikrobiyolojik zenginlikleri irdelenmek istenmiştir. Ülkemiz denizlerinden izole edilen türler arasında endüstüriyel olarak önemli olan türlerin izolasyon ve tanımlanmalarının farklı yöntemler ile yapılmış, örnekleme bölgelerinden elde edilen bakteri izolatlarının farklı yöntemler (klasik mikrobiyolojik, otomatik tanımlama sistemi ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi) eliyle tanımlayarak bu sistemlerin veritabanlarının birbirlerine görece karşılaştırılması hedeflenmiştir. Böylece yerli bilimsel çalışmalara katkının sağlanması, elde edilecek olası farklı ve özgün türlerin araştırmacılarımızın ilgilerine sunulması amaçlanmıştır.

Ayrıca elde edilen türlerin çeşitli ağır metal ve antibiyotiklere olan dirençliliği, hücre dışı enzim üretimleri üzerine bu ikilinin etkileri gibi özel yetenekleri de sorgulanarak, elde edilen verilerin mevcut çevreden nasıl etkilendiğinin ortaya çıkarılması da hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında Enstitümüz ve Biyoloji Bölümü imkanları gözetilerek elde var olan cihaz ve sarf malzemesinin kullanılmasına öncelik verilmiş ve bu nedenle 698 bakteri izolatından sadece 53 tanesi bu çalışmada tamamlanmıştır. Bu şekilde daha kapsamlı araştırmalar için bir model oluşturulması ve mevcut çalışmanın araştırma potansiyellerinin ortaya konması planlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Ksilol (Reidel–de Haën-16446), Mineral yağ (Sigma M 8410), Pepton (Merck, 1.07214.9), Demir fosfat $FePO_4$ $4H_2O$ (Fluka, 44963), Agar (Merck, 101614), Kazaminoasit (N-Z Amin–Sigma, C7290), Çözülebilir Nişasta(Fluka-85643), Sodyum Piruvat (Merck,106619), Dipotasyumfosfat (K_2 HPO^4- Applichem, A1042), Magnezyum Sülfat $7H_2O$ (Merck, 1.05886), Sodyum Klorür (Merck -1.06404), Sodyum Hidroksit (Merck,1.06462), EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit - Sigma-077K0132), Etidyum Bromür (Sigma-E7637), 2-propanol (isopropiyonik asiti Reidel –de Haën, 24137), Alkol (tenik etil alkol-Prolab), Trizma-Base (Sigma, T6066), D-Glukoz (Reidel –de Haën ,16301), D-Sukroz (Merck, 1.07651), D-Fruktoz (Reidel–de Haën, 15760), D-Sellobiyoz (Fluka, 22150), D-Arabinoz (Fluka,10850), D-Ksiloz, (Fluka, 95730), D-Mannoz (Fluka, 63582), D-Galaktoz (Fluka, 48260), D-Trehaloz (Fluka, 90208), D-Sorbitol (Fluka, 90207), D-Mannitol (Himedia, RM 570), Triptik Soy Agar (Merck, 105458), Triptik Soy Sıvı Besiyeri (Merck-104459), Yağsız Süt Tozu (Skim Milk, Applichem, A0839), Nutrient Jelatin (Nutrient Gelatin-Himedia, M 60), Nutrient Agar (Merck, 1.05450), Nutrient Broth (Merck, 1.05443), Simmon's Sitrat Agar (Himediai M 099), Maya Özütü (Yeast Extract– Merck 1.03753), MR-VP Besiyeri (Himedia, M 070), Agar (Merck, 1.01614), Triple Sugar Iron Agarm (Merck, 1.03915), Tris Aminometan (Merck, 108387), Karboksi Metil Selüloz (Alfa easer, A.18105), Gliserol tuributirat (Merck, 1.01958), Rhodamin-B (Applichem, C.I. 45170), Kongo Kırmızısı (Merck, 1.01340), Metil Kırmızısı (Merck, 1.06076), Sudan Siyahı (Fluka, 86015), Safranin (Himedia, RM 11315), Aseton (Merck, 1.00013), Dekarboksilaz Temel Besiyeri (Decaboxylase Broth Base – Bacton Dickenson, 211430), L-arginin (fluka, 11009), L-Lizin (Himedia, RM 3028), Fenol Kırmızısı Temel Sıvı Besiyeri (Phenol REd Broth Base, Merck, 1.10987), Gliserol (Merck, 1.04092), İmmersiyon yağı (Immersion oil,

Merck, 1.04699), Kovac's ayıracı (Kovac's Indole Reagent, Merck, 1.09293), Gram Boyama Seti (Merck, 111885), N, N, N', N'- Tetra metil –p- fenilen daimin (Sigma, T7394), CH_3COOH (Merck 100056), α- naftol (Fluka 70442), Çinko Tozu (Fluka 93027), Agaroz (Lonza 500002), Brom timol mavisi (Merck 3026), Lizozim (Sigma L7651)

2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

Vakum pompalı membran filtre düzeneği (Sartorius, Berlin, Germany), Standart Su Örnekleme Cihazı [standard water sampler device (Hidro-Bios, Germany)], Küresel pozisyon belirleme sistemi [Global Positioning System (GPS)], -20 (Regal, Türkiye) ve -80 Derin Dondurucu (Heraeus, Denamark), +4 ºC buzdolabı (Regal, Türkiye), Çalkalalayıcı (Infors Ht, Germany), Steril Kabin (Haeraus-Lamim Air, Denmark), VITEK 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi (bioMérieux Inc., l'Etiole, France), Yoğunluk ölçme cihazı (Densicheck), Mac Farland ölçüm cihazı (Bacton Dickenson, USA), ELISA Okuyucu (ELISA Reader - EL_X 800 Bio-Tek Instruments Inc., USA), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 22R Refrigerated Microcentrifuge, Fullerton-USA), Mikrosantrifüj (Heraeus Sepatech Biofuge 15 R Microcentrifuge), Vorteks (IKA-TTS 2 Yellow Line Wilmington-USA), Liyafilizatör sistemi (JOUAN CRC 1010, RCT90, Alcatel /Pascal/2005), UV spektrofotometre (Shimadzu 3600 UV-VIS-NIR Spec., Japan), Termal Döngü Cihazı (MJ Research, PT-20, USA), Jel Tankı (Mini Sub Cell CT, Bio-Rad, USA) ve Güç Kaynağı (GIBCO-BRL ST606T, USA), Jel Görüntüleme Sistemi (Kabin+ fotoğraflama sistemi-Vilber Lourmat, Germany, Ekran- Sony, Yazıcı Sony, Japan), Etüv (Binder, USA), Mikroskop (XZS 107 BN, İndonesia), Otoklav (Hirayama Hiclave, Japan), Hassas Terazi (BL210S, BL3100, Sartorius, Germany), Buz makinası (Brema, Italy), +4 ºC soğuk oda, +30 ºC sıcak oda, 0,45 µm por çaplı filtreler (Sartorius-selüloz nitrat filtre/1380-50-ACN), 0,22 µm por çaplı filtre (Chromafil CA-20/25 S Art-Nr./Cat. No:728024).

2.2. Yöntem

2.2.1. Çözeltiler

α- naftol (Barrit' s reagent A): 5 gr alfa naftol 100 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

% 40 (w/v)' lık KOH (Barrit's reagent B): 40 gr NaOH önce 7 ml dH_2O' da çözüldü. Daha sonra 0,3 gr kreatin eklendi ve üzeri 100ml dH_2O' ya tamamlanarak çözüldü.

1M NaCl: 58,44 g/l olacak şekilde tartıldı. 1000 ml dH2O'da çözülerek hazırlandı.

5N CH_3COOH: 14, 33 ml CH_3COOH 50 ml dH_2O'ya tamamlanarak hazırlandı.

Agaroz Jel: %0.8 w/v tartıldı 1X TAE tamponunda mikrodalga fırında eritildi. 50 ºC' a kadar soğuyunca EtBr (0,001 g/l) ilave edildikten sonra jel tepsisine dökülerek, jel tarağı yerleştirilip donması sağlandı.

Lizozim:10 mg/µl olacak şekilde tartıldı steril dH_2O' da eritilerek hazırlandı.

EtBr: 10 g/100 ml olacak şekilde tartıldı steril dH_2O' da eritilerek hazırlandı.

0,5 M EDTA (pH 8.0): 73,06 g EDTA (Etilendiamidin tetraasetik asit) tartıldı. 300 ml steril dH_2O' da çözüldü. pH' sı 8.0' a 10 M NaOH ile ayarlandı. 500 ml' ye steril dH_2O' la tamamlandı.

50 mM EDTA (pH 8.0): 2,922 g Na_2EDTA (Etilendiamidin tetraasetik asit) tartıldı. Yaklaşık 150 ml steril bidistile dH_2O' da çözüldü. pH 8.0'e 10 M NaOH (~50 ml) ayarlandı ve 200 ml'ye tamamlandı.

10 M NaOH: 400 ml dH_2O içinde 200 g NaOH (Sodyum hidroksit) dikkatlice çözüldü , 500 ml'ye tamamlandı.

50X TAE (pH 8.0) tamponu: 121 g tris base tartıldı. 28,55 ml glasiyel asetik asit; 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) 300 ml steril dH_2O' da çözüldü pH'sı 8.0' a ayarlandı ve 500 ml' ye tamamlandı.

10X TAE (pH 8.0) tamponu: 100 ml 50X TAE tamponundan alındı üzerine 900 ml steril dH_2O eklenerek 10X' e seyreltildi.

1X TAE (pH 8.0) tamponu: 100 ml 10X TAE tamponundan 100 ml alındı ve 900 ml steril dH_2O eklenerek 1X' e seyreltildi.

1M Tris-HCL (pH 8.0): 24,228 g Tris tartıldı. 200 ml steril dH_2O eklenerek çözüldü. pH' si HCL ile 8.0' a ayarlandı.

TE Buffer (pH 8.0): 100 ml steril dH_2O' ye 2 ml Tris-HCL (pH 8.0)'den ve 500 µl EDTA (pH 8.0)' dan eklendi. pH' sı 8.0' a ayarlandı. Üzeri 200ml' ye tamamlandı.

2.2.1.1. Besiyerleri

Triptik Soy Agar: 40 g/l tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

Triptik Soy Sıvı Besiyeri: 40 g/l tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

R2A Agar Besiyeri: 0, 5g/l, pepton; 0,5 g/l maya özütü; 0,5 g/l kazaminoasit; 0,5 g/l çözülebilir nişasta; 0,5 g/l glukoz; 15 g/l agar, 0,3 g/l sodyum piruvat, 0,3 g/l K_2HPO_4, 0,05 g/l $MgSO_4$ $7H_2O$ olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı

R2A Sıvı Besiyeri: 0, 5g/l, pepton; 0,5 g/l maya özütü; 0,5 g/l kazaminoasit; 0,5 g/l çözülebilir nişasta; 0,5 g/l glukoz; 0,3 g/l sodyum piruvat, 0,3 g/l K_2HPO_4, 0,05 g/l $MgSO_4$ $7H_2O$ olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

Lauria Agar: 10 g/l nutrient sıvı besiyeri; 5 g/l maya özütü, 8 g/l NaCl; 15 g/l agar olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

Luria Sıvı Besiyeri: 10 g/l nutrient sıvı besiyeri; 5 g/l maya özütü, 8 g/l NaCl; 0,52 g/l Tris-Base olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

ZoBell Agar: 0, 5 g/l pepton; 1 g/l maya özütü; 0,01 g/l $FePO_4 4H_2O$, 15 g/l agar olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

ZoBell Sıvı Besiyeri: 0, 5 g/l pepton; 1 g/l maya özütü; 0,01 g/l $FePO_4 4H_2O$ olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 18 dk otoklavlandı.

İndol Hareketlilik Test Agar Besiyeri (Indol Motility Test Agar): 30 g/l, pepton; 3 g/l, dana ekstraktı; 3g/l, agar; 0,025 g/l, $Na_2 S_2O_3$. $5H_2O$ olacak şekilde tartıldı. Sıcak su banyosunda eritildi ve tüplere bölünerek 121ºC' ta 15 dk otoklavlandıktan sonra soğumaya bırakıldı.

Gliserol Maya Özütü: 15 g/l, pepton; 3 g/l, maya ekstratı; 10ml/l gliserol, 15 g/l agar olacak şekilde tartıldı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

Süt Tozlu Agar (Skim Milk Agar): 5 g/l, kazaminoasit; 2,5 g/l, maya ekstraktı; 1 g/l, glukoz; 15 g/l, agar; olacak şekilde hazırlandı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı. 50-55 ºC' asoğutularak +110 ºC'ta 15 dk otoklavlanarak hazırlanmış, süt tozu solüsyonundan 5gr/100ml eklenmiştir.

Müller-Hinton Agar Besiyeri: 21 g/l; Müller Hinton sıvı besiyeri; 15 g/l, agar olacak şekilde hazırlandı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlanarak Petri kaplarına döküldü.

Müller-Hinton Sıvı Besiyeri: 21 g/l; Müller Hinton sıvı besiyeri olacak şekilde hazırlandı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

Üç Şekerli Demirli (TSI =Triple Sugar Iron) Agar: 65 g/l tartılarak su banyosunda eritildikten sonra tüplere bölündü ve 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandıktan sonra steril cam tüplere bölündü. Soğuma aşamasında yatık agar olarak hazırlandı.

Metil Kırmızısı-Voges Preskauer Besiyeri (MR-VP Besiyeri): 17 g/l tartıldı. Tüplere 5' er ml dağıtıldı. 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

Simon Sitrat Agar (Simmon's Citrate Agar): Besiyerinden 24,28 g/l tartıldı. Başlangıç pH' sı 6,9' ayarlandıktan sonra, distile su ilave edildi ve ısıtılarak

kaynayıncaya kadar eritildi. Tüplere 5'er ml bölünerek ve 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandı. Sonrasında yatık olarak katılaşmaları sağlandı.

Fenol Kırmızısı Sıvı besiyeri (Phenol Red Broth): 5g/l tartılarak hazırlandı ve 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı. İçine test edilecek 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edilmiş her bir şeker çözeltisinden (Glukoz, fruktoz, galaktoz vbg), %5 w/w olacak şekilde ilave edilerek farklı şeker besiyerleri hazırlandı.

O/F besiyeri (Atlas, 1997' ye göre): Glukoz 10 g/l, NaCL 5 g/l, agar ve kazein 2 g/l, K_2HPO_4 0,3 g/l, brom timol mavisi 0,08 g/l tartılarak hazırlandı. Başlangıç pH'sı 7,1 e ayarlandıktan sonra iyice eritilerek tüplere 5' er ml olarak dağıtıldıktan sonra 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı ve dik olarak donmaları sağlandı.

Dekarboksilaz Temel Besiyeri (Decarboxylase Broth Base): 10,52 g/l tartılarak121ºC' ta 10 dk otoklavlandı (HiMedia önerisi).

Nitratlı Sıvı Besiyeri (Nitrate Broth): 9 g/l tartılarak hazırlandı. 5' er ml olarak tüplere dağıtıldı. Tüplerin içine Durham tüpleri ters konumda içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

Kanlı agar: Ticari firmadan (Ekbag, Pendik) hazır olarak satın alındı.

Nutrient Jelatin Besiyeri: Bu besiyeri 128 g/l tartıldı, eritildi ve tüplere 5' er ml olacak şekilde dağıtıldı. 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandıktan sonra tüpler dik konumda tutularak donmaları sağlandı.

Nutrient Agar: 35 g/l tartılarak 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

%1 (w/v) Çözülebilir Nişastalı Nutrient Agar Besiyeri: Nutrient agar besiyerine %1 w/v çözülebilir nişasta ve izolatların kendilerine ait izolasyon deniz suyu oranlarında deniz suyu katılarak hazırlandı. 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

%1 (w/v) Gliserol Tributiratlı Nutrient Agar Besiyeri: Nutrient Agar besiyerine %1w/v gliserol tuributirat ve izolatların kendilerine ait izolasyon deniz suyu

oranlarında deniz suyu ilave edilerek hazırlandı besiyerleri 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı.

0,001 (w/v) Rodamin B' li ve % 2,5 (v/v) Zeytinyağlı Nutrient Agar Besiyeri: Nutrient Agar besiyeri in B ve izolatların kendilerine ait izolasyon deniz suyu oranlarında deniz suyu ilave edilerek hazırlandı ve 121 ºC' ta 15 dk otoklavlandıktan sonra 60 ºC' a soğutuldu. Soğuyan Nutrient Agar besiyerlerine, 0,001 w/v oranında olacak şekilde 0,2 µm por çaplı filtre ile steril edilmiş Rodamin B solüsyonu ve substrat olarak da aynı yöntemle steril edilmiş %2,5 (w/v) oranında steril zeytinyağı ilave edildi. İyice karıştırılarak homojenize edilen besiyerleri Petri kaplarına bölündü ve katılaşmaları sağlandı.

%1 (v/v) Süt Tozlu Nutrient Agar Besiyeri: izolatların izole edildikleri deniz suyu oranlarında hazırlandı. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandı ve 60 ºC' a soğumasını takiben içlerine %10 (w/v) oranında Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu (110 ºC' ta 10 dk otoklavlanarak steril edilmiştir) ilave edildi.

%1 (w/v) Karboksimetilselülozlu Nutrient Agar Besiyeri izolasyon aşamasındaki oranlarda deniz suyu oranları ile hazırlandı ve içlerine substrat olarak %1 (w/v) oranında karboksimetilselüloz ilave edildi. 121ºC' ta 15 dk otoklavlandıktan sonra izolat sayısı kadar Petri kaplarına bölündü

2.2.1.2. Boyalar

Malaşit Yeşili: % 5 (w/v) hazırlandı, dinlendirildikten sonra filtre kağıdı ile süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

Nigrosin: %1 (w/v) toz nigrosin distile su içinde 30 dk kaynatıldı, soğuduktan sonra kaba filtre ile süzüldü ve %40'lık Formaldehit çözeltisinden koruyucu olarak 0,5 ml ilave edildi. Boya bir gece dinlendirildikten sonra kullanıldı.

Kongo Kırmızısı: %1 (w/v) Toz Kongo kırmızısı dH_2O' da çözülerek hazırlandı. pH' sı 5,2' ye ayarlandı.

Safranin: %0,5 (w/v) toz safranin tartıldı, dH_2O' da çözülerek hazırlandı.

Sudan Siyahı Boyası 0,3 g boya 75 ml %95 etil alkol içerisinde iyice çözüldükten sonra 25 ml distile su ilave edilerek hazırlandı

Metil Kırmızısı: 0,1 gr metil kırmızısı 250 ml %95' lik etanolde çözüldü. Üzerine 250 ml dH_2O ilave edildi.

2.2.1.3. Ayıraçlar

Hidrojen peroksit (H_2O_2- %3): %37' lik H_2O_2' den 2,7 ml alındı dH_2O ile 100ml' ye tamamlandı.

N'-N'-N'-N'- tetrametil *p*-fenildiamin: 0.1 gr ayıraç tartılarak 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı her kullanımda taze olarak kullanıldı.

Alfa-naftol: 0,5 g/l alfa-naftol (%95 v/v) etil alkolde çözülerek kullanıma hazırlandı.

Sülfanilik Asit (Reagent A): Sülfanilik asit 5 N CH_3COOH (Bkz., 2.2.1) 8g/l çözülerek hazırlandı (Fluka Test Kiti prospektüsü).

N,N-Dimetil-1-naftilamin (Reagent B): N, N-Dimetil-1-naftilamin 5 N CH_3COOH' te 6 g/l çözülerek hazırlandı (Fluka Test Kiti prospektüsü).

Kovac's Ayıracı: Hazır olarak temin edildi.

2.2.1.4. Kitler, Evrensel Primerler ve PCR Sarf Malzemeleri

Nitrat İndirgeme Test Kiti (Nitrate Reduction Test Kiti - Fluka)

DNA izolasyon kiti: (Promega Wizard® genomic DNA Purification Kit / Madison-USA): Nüklei lizis solüsyonu, RNaz solüsyonu, Protein Çöktürme solüsyonu ve DNA sulandırma solüsyonundan oluşan bir kittir. Herhangi bir sulandırma yapılmadan kullanıcı önerilerinde tarif edilen iş akışına uygun olarak kullanıldı.

27F YM (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3'/IDT-60179285 / 160481368 - USA) : Tasarlandıktan sonra toz halinde ticari firmadan temin edildi. Santrifüj cihazında kısa süreli çevrilerek çöktürüldü. Ürüne ait firma tarafından belirlenen OD değeri konsantrasyon değerleri kullanılarak

$X = \frac{MW/10}{(OD).(33)}$

X= Sulandırma katsayısı
MW=Primerin molekül ağırlığı
OD=260 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede primerin verdiği absorbans değeri

(Kaynak: http://www.tracyk.12.ca.us/thsadvbio(pdfs/primer-design-dilutionb.pdf-2009)

formülü gereğince sulandırma katsayısı hesaplandı ve 1000/X eşitliğinden elde edilen değer ile 100 mM ana stok primer elde etmek üzere, sulandırma için kullanılacak TE tamponunun (pH 8.0) miktarı belirlendi.

Bu formüle göre ileri (F) primerin sulandırma katsayısı hesaplandı.

$X=\frac{6461,2/10}{(6,4).33} = 3,06$

1000/ 3,06= 326,8 µl TE tamponu (Bkz 2.2.1.1) ile sulandırıldı.

Her kullanımdan önce santrifüjde kısa süreli çevrildikten sonra sarf edilecek miktar kadar 10 mM konsantrasyonda sulandırıldı, karıştırldı ve yine kısa süreli santrifüjlemeyi takiben kullanıldı. Stok primer -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

1491R YM (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'/IDT—60179285 / 160481369 - USA): İleri primer gibi tasarlandıktan sonra toz halinde temin edildi, santrifüjle kısa süre çevrilerek çöktürüldü ve yukarıdaki formül kullanılarak 100 mM ana stok primer elde etmek üzere sulandırma miktarı hesaplandı.

Her kullanımdan önce santrifüjde kısa süreli çevrildikten sonra sarf edilecek miktar kadar 10 mM konsantrasyonlarda sulandırıldı ve yine kısa süreli santrifüjlemeyi takiben kullanıldı. Stok primer -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

Taq polimeraz (Go Taq® Flexi DNA Polymerase - Promega M8305-Madison-USA): Ticari firmadan kendi özel tamponu içinde 5u/µl konsantrasyonda satın alındı. Bu enzim ile beraber PCR için kullanılacak yardımcı kimyasallar da beraberce satın alındı. Bunlar $MgCl_2$ solusyonu (25 mM), PCR tamponu (5X)' dur

Enzim, her kullanımdan önce soğutmalı santrifüjde kısa süreli çevrilerek kullanıldı. Stok Taq polimeraz -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

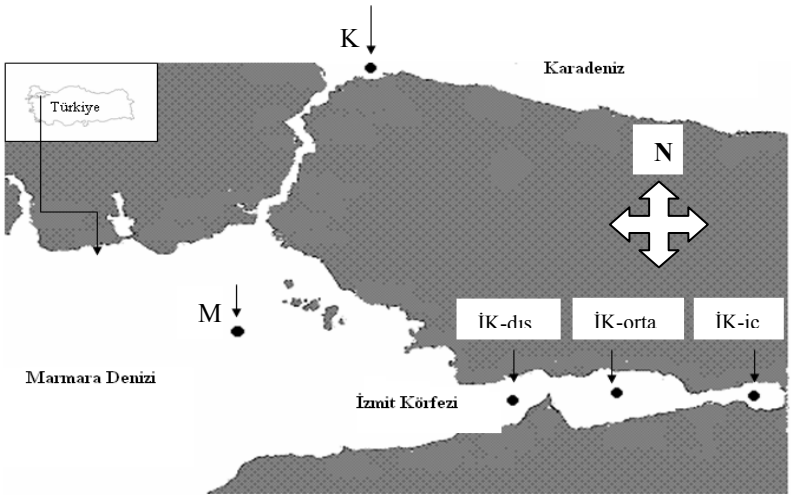
dNTP karışımı (Promega U1515-Madison-USA): dATP, dCTP, dGTP, dTTP içeren bu karışımın toplam konsantrasyonu 40mM (pH 7,5) olarak satın alındı. Her kullanımda sulandırmadan doğrudan kullanıldı ve santrifüjde kısa süreli çöktürmeyi takiben PCR reaksiyon karışımına final konsantrasyonu 200 µM/50 µl olacak şekilde ayarlanarak eklendi. Stok dNTP karışımı -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

1Kilobazlık DNA belirteçi (1 Kb DNA Ladder / Promega G5711- Madison-USA): 250-10000 baz çiftlik boyutlar arasında çift sarmal DNA parçalarından oluşan bir DNA boyut belirtecidir. Ticari firmadan kendi tamponu içinde, beraberinde 6X jelde yürütme boyası ile satın alındı. Elektroforez tankında jele yükleme yapılırken 5µl belirteç+1µl boya (6X) ile karıştırılarak hazırlandı. Jele 6 µl olarak yüklendi. 1 Kb DNA belirteci -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

100 Baz çiftlik DNA belirteci (100bp DNA Ladder / Promega G2101- Madison-USA): 100-1500 baz çiftlik boyutlar arasında çift sarmal DNA parçalarından oluşan bir DNA boyut belirtecidir. Ticari firmadan kendi tamponu içinde, beraberinde 6X jelde yürütme boyası ile satın alındı. Elektroforez tankında jele yükleme yapılırken 5 µl belirteç+1µl boya (6X) ile karıştırılarak hazırlandı. Jele 6 µl olarak yüklendi. 1 Kb DNA belirteci -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandı.

2.2.2. Deniz Suyu Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada izolasyon amacı ile kullanılan Marmara Denizi ve Karadeniz deniz suyu örnekleri, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü'ne ait R/V Arar Gemisi personeli tarafından alındı. İzmit Körfezi deniz suyu örnekleri ise Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü' nün yürüttüğü "Integrated Modelling of Nutrients in Selected River Basins of Turkey" (Karpuzcu ve ark., 2008) isimli Türk-Alman ikili araştırma projesi kapsamında üç farklı istasyondan 2006 - 2007 döneminde mevsimsel dört örnekleme olacak şekilde alındı. Örnekleme istasyonlarının küresel konumu, küresel pozisyon belirleme sistemi [Global Positioning System (GPS)] yardımı ile tespit edildi. Deniz suyu örnekleri, İstanbul Boğazı Marmara Denizi girişinde (M) (derinlik:10 m, 20 m, 100 m, 40º 50′ kuzey enlemi ve 28º 56′ doğu boylamı) ve Karadeniz girişinde (K) (derinlik: 30 m, 40 m ve 44 m, 41º 15′ kuzey enlemi ve 29º 14′ doğu boylamı) 3 farklı derinlikten, İzmit Körfezi (İK) deniz suyu örnekleri ise iç körfez (derinlik: 22 m, 40º 44′ kuzey enlemi ve 29º 54′ doğu boylamı), orta körfez (derinlik: 35 m, 40º 44′ kuzey enlemi ve 29º 43′ doğu boylamı) ve dış körfez (derinlik: 44 m, 40º 44′ kuzey enlemi ve 28º 26′ doğu boylamı) bölgesinden 3 farklı istasyondan standart su örnekleme cihazı [standard water sampler device (Hidro-Bios, Germany)] ile alındı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonların dağılımı.

Alınan deniz suyu örnekleri hızlı bir şekilde laboratuvarlara ulaştırılarak izolasyon aşamasına alındı.

Örnekleme bölgesi olarak seçilen istasyonların şehir ve ev deşarjı almayan bölgeler olmasına dikkat edildi. Buna ek olarak özellikle İstanbul Boğazı'ndan alınan örneklerin Marmara Denizi' nin ve Karadeniz'in genel özelliklerini tam olarak temsil etmesine dikkat edilmiştir.

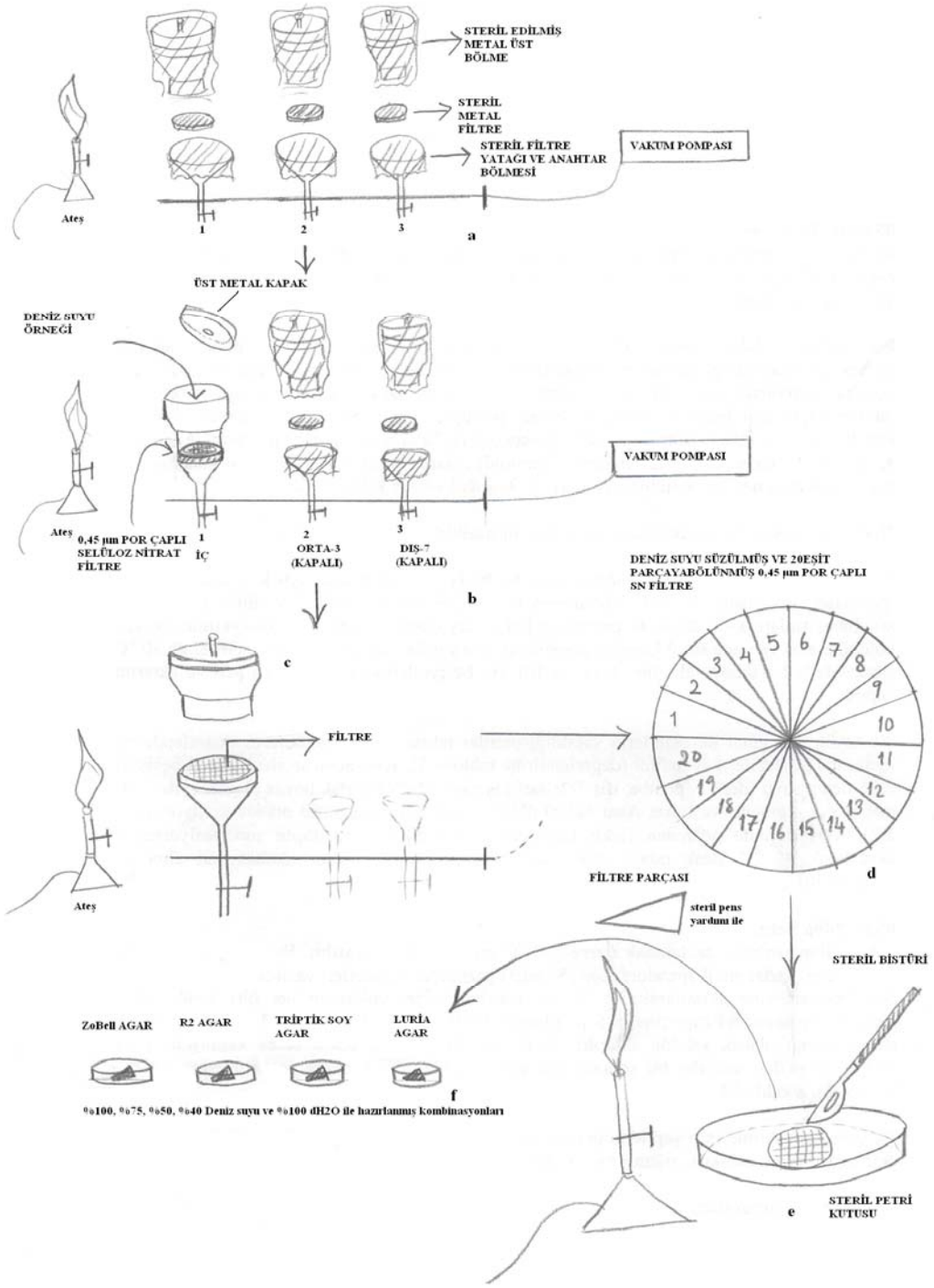
2.2.3. İzolasyon Besiyerlerinin Seçimi ve Hazırlanması

Doktora tez çalışması kapsamında literatürlerde en çok tercih edilen ZoBell (Schut ve ark., 1993; Pinhassi ve ark., 1997; Pukall ve ark., 1999; Lee ve ark., 1999; Pinhassi ve Hagström, 2000; Hagström ve ark., 2000; Troung ve ark., 2001; Lacoste ve ark., 2001; Frette ve ark., 2004), Triptik Soy Agar (Hutcheson ve ark., 1999; Strohecker ve Sidie, 1999) ve R2A Agar besiyerleri (Suzuki ve ark., 1997; Bernard ve ark., 2000; Kwon ve ark., 2002; Connon ve Giovannoni, 2002) kullanıldı. Lauria Agar ise rutin mikrobiyoloji çalışmalarında sıklıkla kullanıldığı için tercih edildi (Seçilmiş besiyerlerinin içerikleri için Bkz. 2.2.1.1). Bu besiyerleri; %100, %75, %50 ve %40 oranlarındaki deniz suyu (Morris ve ark. 2001; Park ve ark. 2002; Kwon ve ark., 2002) ile ve %100 distile su ile hazırlandı. Besiyerlerinin yapımında kullanılan deniz suları, örnekleme istasyonlarından alındıktan sonra 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek izolasyon besiyerlerine ilave edildi. İzolasyon aşamasında toplam 20 çeşit izolasyon besiyeri kullanıldı.

2.2.4. Bakteri İzolasyonu ve Ekim Yöntemi

İzolasyonda kullanılacak 5 farklı istasyondan alınan 100 ml'lik deniz suyu örnekleri, aşağıdaki düzenekte tarif edildiği gibi her parçası ayrı ayrı otoklavlanarak steril edilmiş vakum pompalı membran filtre düzeneğinde, 0,45 µm por çaplı filtreler kullanılarak, yüzey sterilizasyonu yapılmış çeker ocakta süzüldü (Şekil 2.2. a, b, c). Süzme işlemi bittiğinde selüloz nitrat filtrelerin her biri, aynı steril koşullarda, steril bistüri, pens ve Petri kapları kullanılarak 20 eşit parçaya bölündü (Şekil 2.2. d).

Bölünen her bir parça steril bir diğer pens yardımıyla izolasyon besiyeri içeren Petri kaplarına yerleştirildi (Şekil 2.2. e, f).



Şekil 2.2. Deniz suyu örneklerinin katı besiyerlerine ekimi, a. Vakum pompalı membran filtre düzeneği genel şeklinin çizimi, b. Uygulama sırasında filtre yerleşimine ait çizim, c. Filtrenin alımına ait çizim, d. Filtrenin kabaca 20 eşit parçaya bölünmesini gösteren çizim, e. Filtrenin bölünmesi, f. Bölünen filtre parçalarının Petri kaplarına dağıtımı.

Bu işlem her bir deniz suyu örneği için tekrarlandı. Ekim işleminin takiben tüm Petri kapları +30 ºC' ta sıcak odada büyümeye bırakıldı. Her istasyona ait deniz suyu örneği için, vakum pompalı membran filtre düzeneğinin ayrı bir süzme sistemi kullanılarak deniz suyu örneklerinin kontaminasyonu engellenmiştir.

2.2.5. Oluşan Farklı Kolonilerin İzole Edilmesi

+30 ºC' ta sıcak odada büyümeye bırakılan Petri kaplarında yer alan filtre parçaları üzerindeki izolatlar 24 saat sonunda sıcak odadan alınarak incelendi (Şekil 2.3). Görülen farklı kolonilerin sayısı, tipi, rengi kaydedildikten sonra, bu kolonilerin saf olarak elde edilmesi için, aynı oranlarda deniz suyu içeren katı izolasyon besiyerlerine çizgi ekimler yapıldı. Filtre parçalarını içeren 24 saatlik koloniler ve çizgi ekim yapılan Petri kapları tekrar 30 ºC'ta olan sıcak odaya kaldırıldı. Bu şekilde, gecikmiş kolonilerin yakalanması ve bu kolonilerin de çizgi ekim ile saf olarak eldesi planlandı ve uygulandı. Ek olarak kolonilerin 48 saat ve 5 gün takipleri ve incelemeleri de yapıldı. Tüm bu çalışmalar izolasyon için özel olarak düzenlenmiş, ayrı bir odada ve yüzey sterilizasyonu yapılmış steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. Deneylerde ekimler, steril çalışma akışına uygun şekilde, ateş yanında ve alevde yakılmak suretiyle steril edilmiş öze yardımı ile yapıldı.



Şekil 2.3. Filtre parçası üzerinde görülen farklı koloniler ve antagonist madde ürettiği düşünülen kolonin etki zonu fotoğrafı.

Ekim işleminden sonra petriler +30 ºC' ta sıcak odada 24 saat büyümeye bırakıldı. İzolatların saf olarak elde edilmesi aşaması, her bir farklı koloni tek koloni halinde elde edilinceye kadar devam edildi.

Bir sonraki basamakta, saf olarak elde edilen izolatlar sıvı besiyerine alındılar. Bu amaçla daha önce kullandığımız katı izolasyon besiyerlerinin sıvı formları hazırlandı. Hazırlanan sıvı izolasyon besiyerleri 2'şer ml olarak tüplere dağıtıldı ve saf izolatlar steril koşullarda, steril öze yardımıyla sıvı kültüre inoküle edildi. İnokülasyon aşamasını takiben izolatlar +30º C' ta sıcak odada 24 saat inkübasyona bırakıldılar.

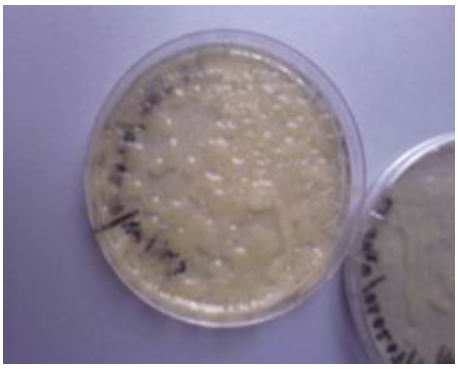
Böylece elde edilen toplam 698 adet izolatın 24 saatlik kültürlerinden, %80' lik gliserol içinde [final konsantrasyonu %33 (v/v)], -20ºC' ta derin dondurucuda saklanmak üzere mikrosantrifüj tüplerine stokları hazırlanarak hücreler koruma altına alındı.

2.2.6. İzolatların Tanımlanmalarına Yönelik İlk Testler

Koruma altına alınmış olan saf izolatlar, temel mikrobiyolojik tanımlama testlerinden koloni tekstürü, gram boyama, spor boyama, katalaz, oksidaz testleri yapıldı. Bu testler için yeniden uygun katı besiyerlerini ekilen bakteriler, aynı zamanda -20 stoklarından [%80 (v/v) gliserol içinden] geri kazanılmaları ve saf olup olmadıkları açısından da yeniden kontrol edildiler. Yapılan bu testler ile bakterilerin koloni yapıları not edildi ve ilk koloni bulguları ile karşılaştırıldı. Gram ve spor boyama sonuçları kaydedildi.

2.2.6.1. Koloni Özelliklerinin (Tekstürlerinin) Gözlemlenmesi

Üreme görülen ve tekrar canlandıkları gözlemlenen izolatların, koloni görünümü, koloni kenarı, koloni yüksekliği, koloni yüzeyi gibi morfolojik özellikleri kaydedilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hücre içi (intraselüler) sıvı bir kimyasal madde biriktirdiği düşünülen koloniler.

2.2.6.2. Gram Boyama Testi (Tamer ve ark., 1989)

Bakterileri hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre (Gram pozitif, Gram negatif) ayırmak için kullanılan bir boyama yöntemidir. Gram pozitif bakterilerin kristal viyole/iyot kompleksini tutma özelliğine sahip kalın peptidoglikan yapıda hücre duvarına sahiptir ve bu ağsı kat kat peptidoglikandan oluşan yapı boya parçacıklarını tutar. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı ise sadece ince bir peptidoglikan katmanından oluşur ve boyaları tutamaz. Gram-negatif bakterilerde aynı zamanda lipit yapıda bir dış zar bulunur. İlk aşamada uygulanan kristal-viyole ve iyot hücre içine alınır. Sonrasında renksizleştirme işleminde kullanılan alkol, Gram-pozitif hücre duvarının su kaybedip büzüşmesine neden olur. Bu yüzden boya tanecikleri moleküllerin arasına sıkışır. Gram negatif bakterilerdeki ince olan peptidoglikan katman boya parçalarını tutamaz; alkol ile yıkama aşamasında dış zardaki lipitleri çözüldüğünde boya dağılır, hücrenin rengi açılır. Renk açılmasının ardından birinciden farklı ikinci bir boya (safranin) uygulanır. Bu boya rengi açılmış hücreleri boyayarak onların görünür hale getirir. Gram pozitifler birinci boyayla mora boyandıkları için ikinci boya onların rengini etkilemez, ama Gram negatif olanlar pembe-kırmızı renkte görünürler (Madigan ve ark., 2004; Tamer ve ark., 1989).

Gram boyama için izolatların katı izolasyon besiyerlerinde büyütülmüş 24 saatlik taze kültürlerinden ateşte steril edilmiş öze ile örnek alınarak lamlar üzerine yayıldı. Kurutulan lamlara sırasıyla; kristal viyole, lügol ve safranin boyaları

uygulanmış örnekler boyama basamakları arasında distile su ile yıkandı. Safranin ile boyama aşamasından önce renksizleştirme işlemi için lamlar alkol ile yıkandı. Boyamayı takiben kuruyan örnekler ışık mikroskobunda immersiyon yağı eklenerek incelendi ve fotoğraflandı. Gram boyama sonuçlarına göre kırmızı-pembe boyalı izolatlar Gram negatif, mavi-mor boyalı örnekler Gram pozitif olarak kayıt edildi.

2.2.6.3. Katalaz Testi (Alexander and Strete, 2001)

Katalaz, H_2O_2'nin su ve O_2'ne parçalanmasından sorumlu enzim olup, mikroaerofilik ve anaerobik mikroorganizmalarda bulunmamaktadır. Aerobik mikroorganizmalar oksijen kullanılabilir durumda bulunduğu için, bu organizmalar son H_2 alıcısı olarak oksijeni kullanarak H_2O_2 meydana getirirler. Katalaz enzimine sahip organizmalar H_2O_2 parçalayarak gaz açığa çıkarır. Bu gaz çıkışı gözle görülebilir ve şiddetine bağlı olarak (+) işareti ile değerlendirilir (Maehly ve Chance, 1954). Bu temel bilgiler ışığında izolatların 24 saatlik saf kültürlerine, %3' lük H_2O_2 damlatılarak katalaz enziminin varlığı test edildi.

2.2.6.4. Oksidaz Testi (Alexandre ve Strete, 2001)

Bu test Sitokrom C Oksidaz enziminin varlığının araştırıldığı bir testtir. Bu sistemde, son H alıcısı olarak oksijen kullanılır ve moleküler oksijen H_2O_2' ye indirgenir. Fakültatif anaerop ve Gram negatif aerobik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılır. Anaeroplarda bu sistem bulunmaz (Alexandre ve Strete, 2001).

Bu test için izolatların ve kontrol olarak kullanılacak *Eschericia coli* [(-) kontrol] ve *Pseudomonas aureginosa*'nın [(+) kontrol] 24 saatlik saf ve taze kültürleri katı izolasyon besiyerlerine yayma ekim yöntemi ile ekilerek hazırlandı. Ayıraç olarak N'-N'-N'-N'- tetrametil *p*-fenildiamin (%1 w/v) kullanıldı. Yapılan taze ayıracın çalışıp çalışmadığını kontrol etmek üzere negatif kontrol (*Eschericia coli*) ve pozitif kontrol (*Pseudomonas aureginosa*)' ün 18-24 saatlik kültürlerinden steril öze yardımı ile örnek alındı ve ayıraç emdirilerek ıslatılmış filtre kağıdı üzerine yayıldı. Filtre kağıdı üzerinde negatif kontrolün beyaz, pozitif kontrolün koyu mor renk aldığı gözlemlendi. Bu deneme temel alınarak her bir taze izolattan bir öze

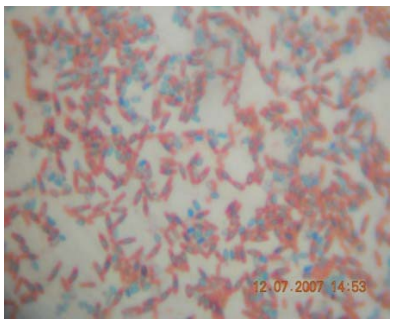
dolusu alınarak ayıraç ile ıslatılmış filtre kağıdına yayıldı ve sonuçlar kontrollere göre ilk 20 sn' de değerlendirilerek kaydedildi.

2.2.6.5. Spor Boyama (Tamer ve ark., 1989)

Bu test endosporların boyanmasında kullanılmaktadır. Endosporlar normal boyama teknikleri ile boyanmazlar. Metilen mavisi ile veya basit boyama metotları ile yapılan boyamalardan sonra, mikroskop altında immersiyon objektifi ile yapılan gözlemlerinde boyanmamış boş alanlar olarak gözlemlenmektedir. Bu boyama yöntemi için Schaffer Fulton' un malaşit yeşili ile boyama tekniği kullanıldı. Bu teknikte malaşit yeşili, hücre içi endosporları yeşile boyarken bazik bir boya olan safranin hücreleri pembeye boyayarak (Şekil 2.5) sporları mikroskopik olarak ayırt edici hale getirmektedir (Tamer ve ark., 1989).

Bu testin yapılışı sırasında oksidaz testi için hazırlanan izolatların saf kültürleri kullanıldı. Bu kültürler oksidaz testinin ardından +30 ºC' ta sıcak odaya kaldırılarak 5 gün bekletildi. Böylece yaşlanan hücreler spor varlığı yönünden incelendiler.

Yaşlı kültürlerden steril öze yardımı ile örnek alınarak lam üzerine yayıldı. Kurutularak örnekler tespit edildi. Üzerine malaşit yeşili (%1 w/v) damlatılarak, boyanın endosporlara nüfuz etmesini sağlamak üzere ısıtma tablasında (boyanın kurumasına müsaade etmeden) 5 dk süreyle boyandı. Boya distile su ile yıkandıktan sonra örnekler karşıt boya safranin ile 30 sn boyandı. Yıkandıktan sonra kurutulan preparatlar immersiyon objektifinde gözlenerek, değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi.



Şekil 2.5. Schaffer Fulton (malaşit yeşili ve safranin ile yapılan boyama yöntemi) ile boyanmış basiller (A171 no' lu örnek).

2.2.7. İzolatlardan Tür Düzeyinde Tanımlanacakların Seçilmesi

Bu aşamadan sonra 698 adet deniz bakterisi izolatı ile çalışmanın ağır iş yükü ve mali boyutu nedeni ile izolatlardan farklı koloni özellikleri gösteren 46 tanesi seçilerek, detaylı tanımlama çalışmalarına alındı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Koloni özellikleri bakımından dikkat çekici bulunan izolatlar (ds=deniz suyu; dH_2O=distile su).

No	İzolatın adı	İstasyon adı	İzolasyon besiyeri	Özelliği
1	42/İK1	İç	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
2	43/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
3	45/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
4	46/İK1	Dış	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
5	65/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Hücre içi birikim var
6	96/İK2	Orta	ZoBell % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
7	171/İK2	Orta	TSA % 100 ds	Sıvı üretiyor
8	174/İK2	Dış	TSA % 100 ds	Sıvı üretiyor
9	181/İK2	Dış	TSA % 75 ds	Sıvı üretiyor
10	189/İK2	Dış	TSA % 50 ds	Sıvı üretiyor
11	193/İK2	Orta	TSA % 40 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
12	235/İK3	İç	ZoBell %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
13	237/İK3	Orta	ZoBell %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
14	257/İK3	İç	LA %50 ds	Hücre içinde madde üretimi var
15	301/İK3	Orta	R2A %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
16	318/İK3	İç	TSA % 50 ds	Gaz üretimi
17	332/İK3	Dış	TSA % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
18	406/İK4	Orta	LA % 100 dH_2O	Gaz üretimi
19	421/İK4	İç	R2A % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
20	429/İK4	İç	R2A % 50ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
21	447/İK4	Dış	R2A %100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
22	461/İK4	Dış	TSA % 75 ds	Gaz üretimi
23	475/İK4	Dış	TSA % 40 ds	Hücre içinde madde üretimi var
24	A27/K	40 m/1	LA % 100 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
25	A31/K	40 m/1	LA % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
26	A36/K	40 m/1	LA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
27	A37/K	40 m/2	LA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
28	A39/K	Dip / 2	LA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
29	A41/K	30 m	LA % 40 ds	Gaz üretimi
30	A73/K	40 m/1	TSA % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
31	A77/K	40 m/1	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
32	A78/K	40 m/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
33	A79/K	Dip/1	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
34	A80/K	Dip/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir

Devamı arka sayfada

Çizelge 2.1' in devamı				
No	**İzolatın adı**	**İstasyon adı**	**İzolasyon besiyeri**	**Özelliği**
35	A82/K	40 m/1	TSA % 40 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
36	A106/M	100 m/1	ZoBell % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
37	A115/M	10 m/2	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
38	A118/M	20 m/3	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
39	A124/M	20 m/2	LA % 100 ds	Hücre içinde madde üretimi var
40	A125/M	20 m/2	LA % 100 ds	Hücre içinde madde üretimi var
41	A139/M	10 m/3	LA % 50 ds	Gaz üretimi
42	A154/M	20 m/1	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
43	A155/M	20 m/2	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
44	A156/M	20 m/3	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
45	A170/M	100 m	R2A % 75 ds	Hücre içinde madde üretimi var
46	A195/M	100 m/2	TSA % 100 ds	Hücre içinde madde üretimi var

2.2.7.1. Tanımlanmak Üzere Seçilen İzolatların -20 Stoklarından Canlandırılmaları

Hem saf olmayan izolatların saf olarak elde edilmesi ve hem de uzun zamandır stok olarak -20ºC' ta derin dondurucuda saklanan izolatların tekrar canlandırılmaları amacıyla sıvı izolasyon besiyerlerine inoküle edildi. Ekim işlemi için her bir seçilmiş izolatın kendine ait izolasyon besiyerinden 2' şer ml steril tüplere bölündü. Gliserol içindeki stok izolatlardan %2 v/v olacak şekilde ekim yapılarak ön kültür hazırlandı. Her bir izolat için sıvı besiyerinden kaynaklanabilecek herhangi bir kontaminasyonun takip edilebilmesi amacıyla izolasyon besiyerlerinden birer adet te kontrol tüpü hazırlandı. Ekim yapılan tüpler, +30 ºC' ta sıcak odada çalkalayıcı üzerinde 270 rpm' de çalkalanarak 24 saat büyümeye bırakıldı. 24 saat sonunda tüplerin bazılarında üreme olduğu görüldü. Aynı izolasyon besiyerlerine bu tüplerden ikinci bir ekim yapıldı ve izolatlar 24 saat daha +30 ºC' ta sıcak odada tutuldular.

48. saatin sonunda bazılarının zayıf üreme göstermekle beraber, tüm izolatların ürediği görüldü. Bu izolatlar da 24 saatte üreyen diğer izolatlar gibi ikinci kez kendi izolasyon besiyerlerine aynı şartlarda inoküle edildi ve benzer inkübasyon şartları korunarak 24 saat büyümeye bırakıldı. Ekimleri yapılmış 24 ve 48 saatlik tüm izolatların 24 saatte ürediği görüldü. Bu da elimizdeki bakterilerin -20 ºC'ta uzun süre kalmaktan etkilendiklerini göstermiştir. Tüm izolatlar, eşit yaşta olmaları için 3. kez sıvı besiyerine alınmış, izolatların saf olarak elde edilmesi aşamasına geçilmiştir.

2.2.7.2. İzolatların Saf Olarak Elde Edilmesi

Tür düzeyinde tanımlamaya alınmadan önce, seçilmiş izolatların, saf olup olmadıkları tekrar tekrar kontrol edildi. 24 saatlik sıvı besiyerindeki izolatlardan, 46 adet bakteri soyuna kesişen çizgi ekimi yapıldı. Bu aşamada iki şey planlandı. Bunlardan ilki çizgi ekimle saflığın kontrolü, ikincisi ise, 5 gün boyunca takip edilen Petri kaplarında 24 saatte görülmeyen farklı kolonilerin olup olmadığının belirlenmesidir.

Ekim işleminin ardından tüm Petri kapları +30 ºC' ta sıcak odada 24 saat büyümeye bırakıldı. Bu aşamada ekim için kullanılan 24 saatlik sıvı kültürler de +30 ºC' ta sıcak odaya kaldırıldı ve 5 gün takip edildi. 24 saatlik büyüme süresini takiben her bir izolatın koloni özellikleri kaydedildi. Bu aşamada tüm Petri kapları yeniden kesişen çizgi ekim yöntemi ile katı besiyerlerine ekildi ve +30 ºC' ta sıcak odada ilk 24 saatlik Petri kapları ile beraber büyümeye bırakıldı. İkinci 24 saat sonunda ilk grup (48. saati dolduran) ve ikinci grup (24. saati dolduran) Petri kapları +30 ºC' ta sıcak odadan alınarak daha önceki koloni özellikleri ve varsa yeni görülen kolonilerin özellikleri kaydedildi. Bu basamakta 24 saatlik ikinci grup Petri kapları +4 ºC' ta soğuk odaya kaldırılırken, 48 saatlik Petri kapları ise 5 güne kadar takip edilmek üzere +30 ºC' ta sıcak odada bekletildi. 48. saatte ve varsa 5. gün sonunda, Petri kapları içerisinde görülen farklı koloniler kaydedildi ve yeni Petri kaplarına yapılan çizgi ekimlerle saf olarak eldesi sağlanmaya çalışıldı.

24 saat sonunda morfolojileri ile ilgili gözlemler kaydedilmesine paralel olarak her bir izolata Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. 5. gün sonunda ise kontrol amaçlı spor boyamaları da yapıldı. Gram boyama ve spor boyama sonucu hazırlanan preparatların mikroskop gözlemlerinde hala saf olarak elde edilemeyen izolatların var olduğu görüldüğünden, saf olarak elde etmek amacı ile izolatların çizgi ekimlerine devam edildi. Bu aşamada bazı izolatların koloni düzeyinde saf görünmesine rağmen mikroskobik çalışmalarda saf olmadığı anlaşıldı. Bu örneklerin ortak yaşadığı düşünüldüğünden, çalışma dışı bırakılarak, saf olarak elde edilebilenler ile çalışmaya devam edildi. Çizgi ekimler sonrası tekrarlanan Gram boyama testi ile mikroskopik olarak saf olduğuna ikna olunan izolatlar sıvı

besiyerlerine ekildi. 24 saat, +30 ºC' ta sıcak odada inkübe edilmelerinin ardından içerisinde steril %80 (v/v) gliserol bulunan steril mikrosantrifüj tüplerine final konsantrasyonu %33 (v/v) olacak şekilde aktarıldı ve -20 ºC' ta derin dondurucuda koruma altına alındılar. Bu aşamada tanımlanmak üzere seçilen izolat sayısı 53 adete ulaştı. Bu 53 izolat, öncelikle temel mikrobiyolojik tanımlama testlerine, sonra da otamatik tanımlama sisteminde tür düzeyinde tanımlanmaya alındı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Temel Mikrobiyolojik testler ve otomatik tanımlama sistemi ile tür düzeyinde tanımlanmaya alınan izolatların listesi (ds=deniz suyu; dH_2O=distile su).

No	**İzolatın adı**	**İstasyon adı**	**İzolasyon besiyeri**	**Özelliği**
1	42/İK1-1	İç	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
2	42/İK1-2	İç	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
3	42/İK1-3	İç	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
4	43/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
5	45/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
6	46/İK1	Dış	LA % 100 dH_2O	Sıvı üretiyor
7	65/İK1	Orta	LA % 100 dH_2O	Hücre içi birikim var
8	96/İK2	Orta	ZoBell % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
9	171/İK2	Orta	TSA % 100 ds	Sıvı üretiyor
10	181/İK2	Dış	TSA % 75 ds	Sıvı üretiyor
11	189/İK2	Dış	TSA % 50 ds	Sıvı üretiyor
12	193/İK2-1	Orta	TSA % 40 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
13	193/İK2-2	Orta	TSA % 40 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
14	235/İK3	İç	ZoBell %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
15	237/İK3	Orta	ZoBell %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
16	257/İK3-1	İç	LA %50 ds	Hücre içinde madde üretimi var
17	257/İK3-2	İç	LA %50 ds	Hücre içinde madde üretimi var
18	301/İK3-1	Orta	R2A %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
19	301/İK3-2	Orta	R2A %100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
20	318/İK3	İç	TSA % 50 ds	Gaz üretimi
21	332/İK3	Dış	TSA % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
22	406/İK4-1	Orta	LA % 100 dH_2O	Gaz üretimi
23	406/İK4-2	Orta	LA % 100 dH_2O	Gaz üretimi
24	406/İK4-3	Orta	LA % 100 dH_2O	Gaz üretimi
25	421/İK4	İç	R2A % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
26	429/İK4	İç	R2A % 50ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
27	447/İK4	Dış	R2A %100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
28	461/İK4	Dış	TSA % 75 ds	Gaz üretimi
29	475/İK4-1	Dış	TSA % 40 ds	Hücre içinde madde üretimi var
30	A27/K	40 m/1	LA % 100 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
31	A31/K	40 m/1	LA % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
32	A36/K	40 m/1	LA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir

Devamı arka sayfada

Çizelge 2.2' nin devamı

No	İzolatın adı	İstasyon adı	İzolasyon besiyeri	Özelliği
33	A37/K	40 m/2	LA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
34	A41/K	30 m	LA % 40 ds	Gaz üretimi
35	A73/K-2	40 m/1	TSA % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
36	A73/K-3	40 m/1	TSA % 75 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
37	A77/K-1	40 m/1	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
38	A78/K-1	40 m/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
39	A78/K-2	40 m/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
40	A79/K	Dip/1	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
41	A80/K-1	Dip/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
42	A80/K-2	Dip/2	TSA % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
43	A106/M-1	100 m/1	ZoBell % 50 ds	Antagonist madde üretiyor olabilir
44	A115/M-1	10 m/2	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
45	A115/M-2	10 m/2	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
46	A118/M-1	20 m/3	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
47	A118/M-2	20 m/3	ZoBell % 100 dH_2O	Hücre içinde madde üretimi var
48	A124/M	20 m/2	LA % 100 ds	Hücre içinde madde üretimi var
49	A139/M	10 m/3	LA % 50 ds	Gaz üretimi
50	A154/M	20 m/1	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
51	A155/M-1	20 m/2	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
52	A155/M-2	20 m/2	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir
53	A156/M	20 m/3	LA % 100 dH_2O	Antagonist madde üretiyor olabilir

2.2.8. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Morfolojik Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler

Seçilmiş ve saf olarak elde edilmiş izolatlara Gram ve spor boyama, Katalaz ve oksidaz testlerine ek olarak aşağıda detayları verilmiş testler yapıldı.

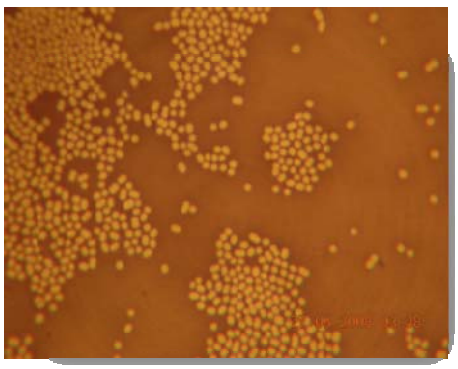
2.2.8.1. Kapsül Boyama (Alexander ve Strete, 2001)

Bazı bakteriler büyümeleri sırasında etraflarına çeşitli polisakkarit ve polipeptitleri salgılarlar. Bu maddeler bakteri hücresi etrafında birikerek kapsül adı verilen bir yapı oluştururlar. Klinik olarak önemli bazı bakteriler kapsülü (ör; Pnömöni etkeni-*Klebsiella pneumoniae* ve *Streptococcus pneumoniae*) kendilerini fagositoza karşı korumada kullanırlar. Bu nedenle kapsül yapısı hastalık yapıcı özelliğinde etkili bir faktör olarak kabul edilmektedir.

Bu yöntemde, kapsüller boyamaya karşı dirençli olduğu için, hücre ve etrafındaki zemin boyanır. Bu nedenle basit boyama ve negatif boyama birleşimi bir yöntemle boyama işlemi tamamlanırken asidik boya olarak Kongo kırmızısı, nigrosin veya çini mürekkebi kullanılır. Bu boyalar bakterinin etrafındaki zemini boyarken, bazik boyalar kristal viyole, karbolfuksin veya safranin ise bakteri hücresini boyar (Alexander ve Strete, 2001).

Bu test için boya olarak nigrosin ve safranin kullanıldı. Bu aşamada boyanacak izolatların taze kültürleri sıvı izolasyon besiyerlerine öze ile steril koşullarda inoküle edildi ve 30 ºC' ta sıcak odada 24 saat büyümeye bırakıldı. Kapsül oluşumunu teşvik etmek amacıyla izolatların taze kültürlerinden Süt Tozlu Agar' a öze ile ekim yapıldı. Petri kapları sıcak odada +30 ºC' ta büyümeye bırakıldı. Pozitif kontrol olarak *Leuconostoc mesenteroides*'in 24 saatlik taze kültürü de hazırlandı.

Ekimden 48 saat sonra, temiz lamlar üzerine birer damla %10 (w/v) 'luk nigrosin (Bkz 2.2.1.2) damlatıldı ve izolatlardan bir öze dolusu alındı ve boya ile karıştırılarak lam üzerine yayıldı (negatif boyama). Preparatların hava ile kurumalarını takiben lamlar safranin damlatılarak 30 sn boyandı (basit boyama) ve kurutuldu. Kapsülü oluşturan polisakkarit yapı suda çözünür olduğundan safranin (30 sn) uygulamasını takiben kurutuldu ve mikroskopta immersiyon objektifinde gözlendi. Bakteri etrafında boyanmadan kalan açık renkli bölge kapsül varlığını gösterdiğinden bu örnekler kapsül pozitif kabul edidi (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kapsül Boyama (negatif) örnek resim (42 İK1-3 no lu izolat)

2.2.8.2. Hareketlilik Testi (Alexander ve Strete, 2001 ve Atlas, 1997)

Bu test bakterilerin hareket etmek için ilave dış uzantıları veya flagella varlığının belirlenmesini sağlamaktadır. Ör; *Escherichia coli* hareketli, *Leuconostoc mesenteroides* hareketsiz bakteri olarak örneklendirilmektedir. Hareketliliğin tayini için İndol Hareketlilik Test Agar Besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerleri ile indol oluşumu ve H_2S oluşumunun belirlenmesi de mümkün olmaktadır. En bilinen hareketlilik tayini besiyeri Sülfit İndol Hareketlilik besiyeri olarak tarif edilmektedir (Alexander ve Strete, 2001).

İzolatların hareketli olup olmadığını tayin etmek üzere Sülfit İndol Hareketlilik besiyeri mevcut olmadığı için; Atlas, (1997)' ın "Handbook of Microbiological Media" kitabında önerilen İndol Hareketlilik Testi Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) kullanıldı. Donmuş bu yarı katı besiyerine, izolatların 24 saatlik sıvı kültürlerinden iğne ile steril koşullarda ekim yapıldı. Bu ekim şekli ile hareketlilik besiyerine üzerinde sıvı kültürden alınmış izolatın olduğu iğnenin batırılıp-çıkarılması sağlandı ve böylece dikey, tek çizgi halinde bir ekim hattı oluştu. Ekim işlemini takiben tüpler +30 ºC' ta sıcak odada 48 saate kadar büyümeye bırakıldı. 24. saatte ve 48. saatte tüpler kontrol edilerek iğne ekim hattından yanlara doğru uzantılar ve büyüme belirtileri, hareketlilik var [Hareketlilik pozitif (+)], bu hatta değişiklik olmaması hareketlilik yok [Hareketlilik negatif (-)] olarak değerlendirildi (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İzolatların on tanesinde hareketlilik testi fotoğrafı. 1 Boş, 2 (-) ve 3 (+) Kontrol, 4,9,10 Hareketli, 5,6,7,8 Hareketsiz

2.2.9. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Fizyolojik Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler

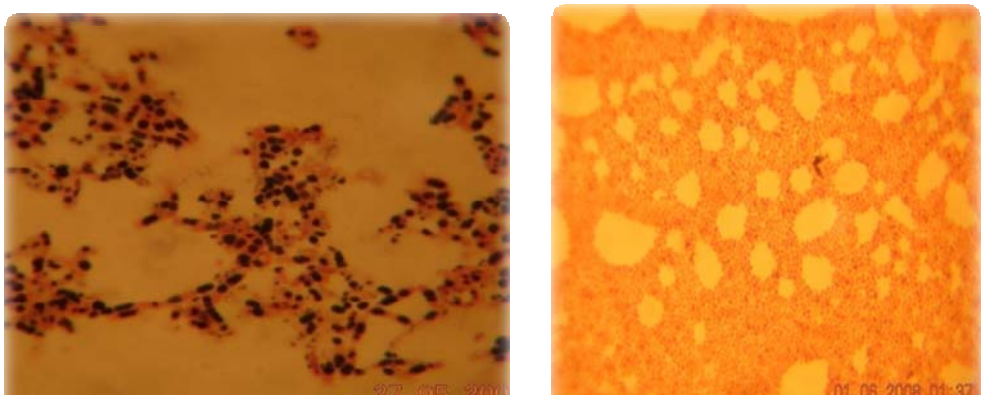
2.2.9.1. Lipit Boyama (Tamer ve ark., 1989)

Prokaryotlarda da, ökaryotlar gibi nötr lipitler (trigliseritler) depolanmaktadır. Birçok bakteride lipit yapılı Poli Hidroksi Butirat (PHB) ana depo maddesidir. PHB cisimcikleri lipofil olduklarından yağda çözünen boyalar ile boyanmaktadırlar. Bu boyama için Sudan siyahı boyası, ksilen ve bazik boya olarak safranin (%0,5 w/v) (Bkz. 2.2.1.2) kullanılmıştır

Seçilmiş izolatların 24 saatlik sıvı kültürlerinden lipit oluşumunu teşvik amacıyla, Gliserol Maya Özütü (Bkz. 2.2.1.1) içeren besiyerine steril öze ile ekildi. Ekim işlemini takiben katı besiyerindeki izolatlar 3 gün boyunca +30 ºC' ta sıcak oda koşularında büyümeye bırakıldı. (Tamer ve ark., 1989).

Lipit boyama için temiz lamlar hazırlandıktan sonra, lam üzerine steril öze yardımı ile izolatlar yayıldı ve ince bir bakteri filmi hazırlandı. Kurutulan preparatlar Sudan siyahı ile 15 dk boyandı. Bu süre sonunda kalan boya, lamların üzerinden döküldü ve boyanın iyice kuruması beklendi. Ardından ksilol ile yıkanan preparatlar hava ile kurumaya bırakıldı. Son basamakta ise (%0.5 w/v) safranin ile 30 sn boyandı ve yıkanarak kurutulduktan sonra immersiyon objektifinde incelendi. Lipit yapılı PHB cimcikleri gri-siyah, bakteri hücreleri ise pembe-turuncu olarak gözlendi (Şekil 2.8).

A B



Şekil 2.8. Lipit Boyama sonucu PHB varlığı yönünden pozitif (A) ve negatif (B) izolatlar için örnek resimler

2.2.9.2. Tuz Gereksinimi ve Toleransına Göre Testler (Tamer ve arkadaşları, 1989)

Seçili izolatlar %10 (w/v) tuz içeren kendi sıvı izolasyon besiyerlerine inoküle edildi ve 24 saat ve 48 saat +30 ºC' ta inkübasyonun ardından üreme durumları boş kontrol besiyerleri ile karşılaştırılarak kaydedildi.

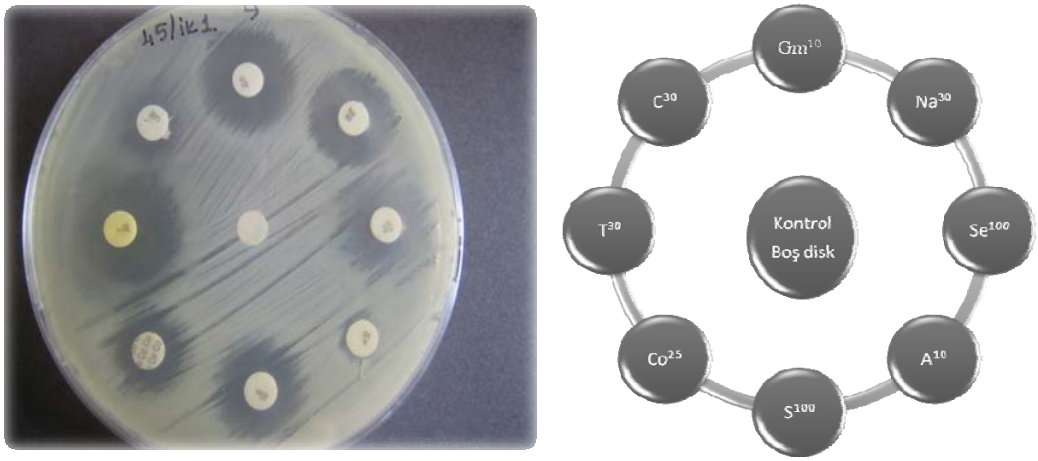
2.2.9.3. Antibiyotiklere Duyarlılık Testleri [Kirby-Bauer Metotu (Alexander ve Strete, 2001)]

Bu metot, bir yorumlama standartı ile sonuçların karşılaştırmasına dayanan ve çeşitli antibiyotiklerin etkililiğini tayin etmek için kullanılan bir yöntem olarak tarif edilmektedir. Bu karşılaştırma test edilen bir bakterinin antibiyotiğe duyarlı (suceptible-S) veya dirençli (resistant-R) olup olmadığını tayin etmeyi sağlamaktadır. Bu testi uygulamak için Müller-Hinton Agar besiyeri önerilmektedir (Himedia-Italy / antibiyotik duyarlılık testi disk prospektüsü).

Bu aşamada seçilmiş izolatlar katı izolasyon besiyerlerine ekilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. İzolatlar, Müller-Hinton Agar (Bkz. 2.2.1.1) içeren besiyerlerine, daha önceden hazırlanarak steril edilmiş pamuklu çubuklar (eküvyon) ile birbirine paralel çizgiler şeklinde ekildi. Böylece tüm Petri kabına izolattan alınan örnek yayıldı. Bu işlem 3 farklı yönde tekrar edilerek yayma işlemi tüm yüzeyde tamamlandı. Her bir izolat için yeni bir steril pamuklu çubuk kullanıldı. Ekim işlemini takiben seçilmiş 8 farklı antibiyotik diski [Gentamisin (Gm^{10}), Nalidiksik

asit (Na^{30}), Spektinomisin (Se^{100}), Ampisilin (A^{10}), Streptomisin (S^{10}), Trimentoprim-Sulfamethoksazol (Co^{25}), Tetrasiklin (T^{30}) ve Kloramfenikol (C^{30})] ekili yüzey üzerine steril koşullarda ve her bir Petri kabı için ortak bir yerleşim planı oluşturularak yerleştirildi. 24 saat, +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında büyümeye bırakıldı. İnkübasyonu takiben izolatların her birinin, disklerin etrafında oluşturduğu zon çapları ölçülerek kaydedildi (Şekil 2.9).

A **B**



Şekil 2.9. Örnek antibiyogram 45 İK 1 (A) Disk yerleşim planı (B).

Oluşan zon çaplarına ilişkin değerlendirme, her bir antibiyotik için antibiyotik disklerinin temin edildiği HiMedia firmasının disklere ait prospektüslerde vermiş olduğu standart aralıklara göre yapıldı. Bu aralıklara ait detaylı bilgi Çizelge 2.3' de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Kullanılan antibiyotik disklerine ait zon çapı bilgi çizelgesi (Kaynak-HiMedia-antibiyotik duyarlılık testi disk prospektüsü)

Antibiyotik Diski		Disk içeriği	İnhibisyon zon çapı (mm)		
			R= Resistant (Dirençli)	I=Intermediate (Arada)	S=Susceptible (Duyarlı)
Gm^{10}		10 µg	12 mm ve daha az	13-14 mm arası	15 mm ve daha fazla
Na^{30}		30 µg	13 mm ve daha az	14-18 mm arası	19 mm ve daha fazlası
Se^{100}		100 µg	14 mm ve daha az	15-17 mm arası	18 mm ve daha fazlası
A^{10}	*Gr –enterikler* için	10 µg	13 mm ve daha az	14-16 mm arası	17 mm ve daha fazlası
	Stafilokoklar için		28 mm ve daha az	-	29 mm ve daha fazlası
	Heamophilus spp.		18 mm ve daha az	19-21 mm arası	22 mm ve daha fazlası
	S. pneumoniae		-	-	-
	S. pneumoniae dışındaki *Streptokoklar*		18 mm ve daha az	19-25 mm arası	26 mm ve daha fazlası
S^{10}		10 µg	11 mm ve daha az	12-14 mm arası	15 mm ve daha fazlası
Co^{25}		1.25/ 23,75 µg	10 mm ve daha az	11-15 mm arası	16 mm ve daha fazlası
T^{30}		30 µg	14 mm ve daha az	15-18 mm arası	19 mm ve daha fazlası
C^{30}		30 µg	30 mm ve daha az	31-37 mm arası	38 mm ve daha fazlası

Kullanılan antibiyotik disklerinin antibakteriyel etkilerini test etmek üzere kontrol mikroorganizmalar olarak NCCLS, 1997 (National Committee for Clinical Laboratory Standards-USA) tarafından önerilen *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 soylarına ait değerler kullanıldı. Elde edilen sonuçların kendi içinde değerlendirilmesine yönelik olarak çoklu antibiyotik dirençliliğinin irdelenmesi konusunda MAR göstergesi (Multiple Antibiotic Resistance Index) değerleri (a/b) hesaplandı. Buna göre "a" seçilmiş izolatların dirençli olduğu antibiyotik sayısını, "b" ise test edilen toplam antibiyotik sayısını ifade etmektedir. Bir bakteri için MAR göstergesi değeri eğer 0,2' den büyük ise, bu antibiyotikler çok yaygın olarak kullanılıyordur ve bu bakteri insan veya hayvanlar için oldukça büyük bir risk oluşturuyor demektir. Aksine MAR indeks değeri 0,2' ye

eşit veya daha küçük ise o antibiyotiklerin kullanımı ya çok azdır veya o antibiyotikler kullanılmamaktadır.

2.2.10. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Biyokimyasal Özellikleri Belirlemeye Yönelik Testler

2.2.10.1. Üç Şekerli Demirli Agar' da Hidrojen Sülfür Oluşumu ve Karbonhidrat Kullanımı (Alexander ve Strete, 2001)

Literatürde enterik bakterilerde 3 farklı şekerin kullanımı ile Hidrojen Sülfür (H_2S) oluşumunun beraberce gözlendiği biyokimyasal bir test olarak tarif edilmektedir. Bu besiyeri enterik bakterilerin kullanabildiği çeşitli karbonhidratları (glukoz, sukroz ve laktoz) ve proteinleri (dana ekstraktı, maya ekstraktı ve pepton) içermektedir. Burada tiyosulfatlar H_2S üretimi için sülfür kaynağı olarak kullanılmaktadır. Farklı enterik bakteriler bu substratları farklı şekilde kullanırlar. Besiyerinin birleşiminde bulunan demir sülfat ($FeSO_4$) ise H_2S ile reaksiyona girerek demir sülfür (FeS) adlı siyah renkli bir çökelti oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu besiyerinde pH belirteci (indikatörü) olarak fenol kırmızısı bulunmaktadır. Bu boya asidik pH' da sarı, bazik pH' da koyu kırmızı renk almaktadır. Besiyeri hazırlanırken başlangıç pH' sının 7,4'e ayarlanması önerilmektedir (Alexander ve Strete, 2001).

Reaksiyon 1: Karbonhidrat fermantasyonu ve H_2S oluşumu negatif

Glukoz, laktoz, sukroz ⟶ Glukoz, laktoz, sukroz
(agarın dibi ve yatık kısmı kırmızı) (agarın dibi ve yatık kısmı kırmızı)

Sistein ⟶ Sistein
(Siyah renk oluşumu yok)

Reaksiyon 2: Yalnız glukoz fermentasyonu

Laktoz, sukroz ⟶ Laktoz, sukroz
(agarın yatık kısmı kırmızı) (Agarın yatık kısmı kırmızı)

Glukoz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(agarın dip kısmı kırmızı) (agarın dip kısmı sarı)

Sistein ⟶ Sistein
(siyah renk oluşumu yok)

Reaksiyon 3: Glukoz fermantasyonu ve H_2S oluşumu

Laktoz, sukroz ⟶ Laktoz, sukroz
(agarın yatık kısmı kırmızı) (Agarın yatık kısmı kırmızı)

Glukoz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(agarın dip kısmı kırmızı) (agarın dip kısmı sarı)

Sistein ⟶ H_2S ve diğer ürünler

H_2S+ $FeSO_4$ ⟶ FeS
(Siyah renk)

Reaksiyon 4: Laktoz ve/veya sukroz ve glukoz fermantasyonu ile H_2S oluşumu

Laktoz ve/veya sukroz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(agarın yatık kısmı kırmızı) (agarın yatık kısmı sarı)

Glukoz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(agarın dip kısmı kırmızı) (agarın dip kısmı sarı)

Sistein ⟶ H_2S ve diğer ürünler

H_2S+ $FeSO_4$ ⟶ FeS
(Siyah renk)

Bu test için izolatların saf ve taze kültürleri katı besiyerlerine ekilerek hazırlandı. Ekim işlemi iğne ile steril koşullarda yapıldı. Bunun için iğne alevde steril edildikten sonra izolattan örnek alındı ve yatık agarın dip kısmına girilerek, dikey ince bir ekim hattı oluşturulduktan sonra besiyerinden çıkma aşmasında, iğne ile yatık kısmı çizilerek ekim tamamlandı. Ekim işlemini takiben izolatlar, +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 24 saat büyümeye bırakıldı. Kontrol olarak *Escherichia coli* [glukoz, laktoz ve sukroz (+), glukozdan gaz oluşumu (+), H_2S (-)], *Pseudomonas aeruginosa* [glukoz, laktoz ve sukroz (-), glukozdan gaz oluşumu (-), H_2S (-)], *Salmonella sp.* [glukoz, laktoz ve sukroz (+), glukozdan gaz oluşumu (+), H_2S (+)]

kullanıldı. 24 saatlik büyümeyi takiben, izolatların bu besiyerindeki davranışları aşağıdaki gibi değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi (Şekil 2.10).

A B



Şekil 2.10. TSI agar testi için örnek fotoğrafı (A) *Salmonella sp.* [glukoz, laktoz ve sukroz (+), glukozdan gaz oluşumu (+), H_2S (+)] H_2S (tüpün siyah kısmı), Glukoz, Sukroz ve Laktoz pozitif (tüpün sarı kısmı), (B) on adet izolatın sonuçları buna göre; Glukoz, Sukroz ve Laktoz pozitif (sarı renkli tüpler) ve negatif (kırmızı renkli tüpler) izolat örnekleri, tüm izolatlar H_2S negatiftir.

2.2.10.2. IMVIC Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Bu test adını aşağıda detayları verilen 4 farklı testten almaktadır. Bunlar Indol (I), Metil kırmızısı (Metil Red-MR), Voges Preskauer (VP) ve Sitrat (C) testleridir.

2.2.10.2.1. İndol Testi

Triptofan aminoasitinin, triptofanaz enziminin varlığında yıkıma uğratılması ile ortaya çıkan piruvik asit, indol ve NH_3 gibi yan ürünlerin içinden indolün Kovaks ayıracı varlığında kırmızı renk vermesi temeline dayanan bir test olduğu ifade edilmektedir.

Pozitif test

Triptofan $\xrightarrow{\text{triptofanaz}}$ NH_3+ piruvik asit+ indol

İndol+ Kovaks ayıracı= kırmızı renk

Negatif test

Triptofan —triptofanaz enzimi yok→ Triptofan p

Triptofan+ Kovaks ayıracı= kırmızı renk oluşumu yok

Bu test için hareketlilik testinde detayları verilen Indol-Hareketlilik Test Agar (Bkz. 2.2.1.1) kullanıldı (Atlas, 1997). Bu besiyerinde hareketlilik özelliğinin yanında indol oluşumunun varlığı da test edildi. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol olarak *Leuconostoc mesenteroides* kullanıldı. Hareketlilik testi için, ekim yapılmış tüplere 48 saatlik inkübasyon sonunda 5' er damla Kovaks ayıracı damlatılmış ve agarın yüzeyin de kırmızı renkli bir halkanın oluşumu gözlemlendiğinde reaksiyon indol pozitif kabul edildi (Şekil 2.7 Hareketlilik testi ile beraber bakılmıştır).

2.2.10.2.2. Metil Kırmızısı (MR) Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Enterik bakterilerde glukoz metabolizmasının çeşitliliğini temel alan bir test olarak tarif edilmektedir. Tüm enterikler glukozu metabolize ettiklerinde ilk ürün olarak piruvik asit oluşturmaktadırlar. Bunlardan bazıları puvik asiti; laktik, formik ve asetik asit gibi diğer asitlere metabolize ettikleri sonraki aşamalarda, karışık asit döngüleri kullanmaktadırlar. Bu bakterilere metil kırmızısı pozitif denmektedir. Diğer enterikler ise piruvik asiti nötr son ürünleri metabolize etmek için butilen glikol döngüsünü kullanmaktadırlar. Bunlara da metil kırmızısı negatif bakteriler denmektedir. Bu testin sonuçları aşağıdaki reaksiyonlara dayanarak değerlendirilmiştir (Alexander ve Strete, 2001).

Pozitif test:

Glukoz ——→ Piruvik asit (1 gün sonra)

Piruvik asit——→ Laktik asit, asetik asit ve formik asit (5-7 günde)

Laktik asit, asetik asit ve formik asit (pH 4,2)+ metil kırmızısı ilavesi= kırmızı renk oluşumu.

Negatif test:

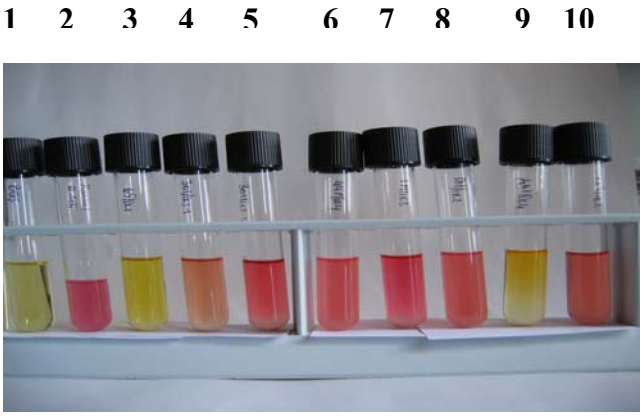
Glukoz ⟶ Piruvik asit (1 gün sonra)

Piruvik asit ⟶ Nötr son ürünler (5-7 gün)

Nötr son ürünler (pH 6,0) + metil kırmızısı ilavesi= sarı renk oluşumu

Bu test için Metil Kırmızısı-Voges Preskauer besiyeri (MR-VP) (Bkz. 2.2.1.1) kullanılmıştır. Bu tüplere izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik sıvı kültürlerinden steril mikropipet ucu ile 40'ar µl ekim yapıldı ve +30 ºC'ta sıcak oda koşullarında 7 gün inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* [VP (+)] kullanıldı.

Bir haftalık inkübasyon süresinin ardından tüplere 10'ar damla metil kırmızısı ilave edildi ve tüpler hafifçe çalkalandıktan sonra yukarıdaki tariflere göre test sonuçları değerlendirilerek kaydedildi (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. MR testi örnek fotoğrafı, 1 Boş, 2 Pozitif kontrol *E.coli*; 4-10 izolatlar 7 Pozitif örnek, 3, 9 negatif örnek.

2.2.10.2.3. Voges Proskauer (VP) Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Bu testte glukoz metabolizmasının ürünlerine dayanmaktadır. MR testi ile asidik ürünlerin varlığı test edilirken, VP testi ile piruvik asitin metabolize edilmesi ile elde edilen asetoin gibi (asetilmetilkarbinol) nötr son ürünlerin varlığı test edilmektedir (Alexander ve Strete, 2001). Bu amaçla, MR testinde olduğu gibi bu test için de MR-VP besiyeri kullanıldı.

Pozitif test:

Glukoz ⟶ Piruvik asit

Piruvik asit ⟶ Asetoin

Asetoin+ alfa naftol+ NaOH ilavesi= kırmızı renk oluşumu

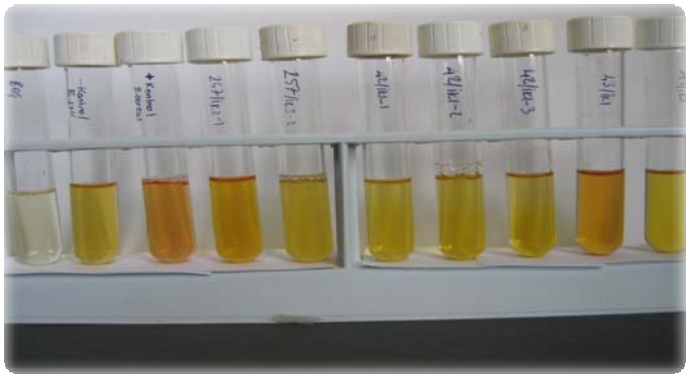
Negatif test:

Glukoz ⟶ Piruvik asit

Piruvik asit ⟶ Asetoin oluşumu yok+ alfa-naftol+NaOH= bakır rengi oluşumu

MR testi için hazırlanan izolatların sıvı izolasyon besiyerlerinde büyütülmüş 24 saatlik taze kültürlerinden MR-VP sıvı besiyerlerine ikinci bir set ekim daha yapıldı. Ekim işlemini takiben kültürler sıcak oda koşullarında 48 saat büyümeye bırakıldı. Negatif kontrol olarak *Escherichia coli* [VP(-)], pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus* [VP (+)] kullanıldı (Tamer ve ark., 1989). 48 saatlik MR-VP besiyerindeki kültürlere, sırası ile 12 damla alfa naftol (Bkz. 2.2.1.3) ve 4 damla NaOH %40 (w/v) (Bkz. 2.2.1) damlatıldı. Sonuçlar aşağıdaki reaksiyonlara göre değerlendirildi ve kaydedildi (Şekil 2.12).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 2.12. VP testi için örnek fotoğrafı; 1 Boş, 2 Negatif kontrol *E.coli*; 3 Pozitif kontrol *B. cereus*, 4-10 izolatlar. 6 Negatif örnek, 9 Pozitif örnek.

2.2.10.2.4. Sitrat Testi (Alexander ve Strete, 2001)

IMVIC testi için son test sitrataz enziminin varlığının gösterildiği sitrat testidir. Sitrat organik bir molekül olup, sitraz enzimini üretebilen bakteriler tarafından kullanılabilmektedir. Bu besiyeri tek karbon kaynağı olarak sitrat ve pH indikatörü olarak bromtimol mavisi içermektedir. Besiyeri başlangıç asiditesi pH 6,9' da yeşil renk, pH 7,6 ve üstünde ise mavi renk almaktadır. Sitratı karbon kaynağı olarak kullanabilen bakteriler besiyerinin pH'sında artmaya neden olduğundan mavi renk almakta, sitratı metabolizma edemeyen bakteriler ise üreyemedikleri için besiyerinin rengi değişmeden kalmaktadır (Alexander ve Strete, 2001).

Pozitif test:

Sitrat (yeşil) —sitraz→ Okzaloasetik asit+ asetik asit

Okzaloasetik asit → Piruvik asit+ CO_2

CO_2+ Na^+ → Na_2CO_3 [(sodyum karbonat-pH artar)] (mavi renk oluşur ve bakteri ürer)

Negatif Test:

Sitrat (yeşil) → Sitrat (pH değişmez) (yeşil ve bakteri üremez)

Bu test için Simon Sitrat Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1). İzolatların katı izolasyon besiyerine ekilerek hazırlanmış 24 saatlik taze kültürlerinden, steril iğne ile ekim yapıldı. Ekim işlemi, iğne ucu önce agarın dip kısmına batırılıp yatık kısım üzerinde kaydırılması ile bir ekim hattı oluşturularak yapıldı. Kontrol olarak *Escherichia coli* [Sitrat (-)] kullanıldı. Ekim tamamlanınca izolatlar +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 5 gün boyunca büyümeye bırakıldı. Sonuçlar yukarıdaki reaksiyon sonuçlarına göre gözlemlendi ve kaydedildi (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Sitrat testi örnek fotoğrafı; 1 Boş, 2, 3, 4, 6, 7, 9 Pozitif sonuç veren izolatlar 5, 8, 10 Negatif sonuç veren izolatlar.

2.2.10.3. Karbohidrat Kullanımı Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Bir mikroorganizmanın çeşitli karbonhidratları fermente edip etmediğini tayin etmek için Mor Sıvı Besiyeri veya Fenol Kırmızısı Sıvı Besiyeri kullanılmaktadır. İzolatlarımıza bu testi uygulamak için Fenol Kırmızısı Sıvı Besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri pepton ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içermektedir. Bu indikatör alkalin pH' da (>7.0) kırmızı iken, asidik pH' da (<7.0) sarı renk almaktadır. Burada Fenol Kırmızısı Sıvı Besiyeri ana besiyeri olup denenmesi düşünülen şekerlerin her biri için ayrı ayrı hazırlanmakta ve her bir şekerin kullanımı test edilebilmektedir. Fenol Kırmızısı Sıvı Besiyeri test edilecek şekere göre Fenol Kırmızısı Glukoz Sıvı besiyeri vbg adlandırılmaktadır.

Bakteriler bir karbonhidratı fermente ettiğinde, son ürün olarak asit veya asit ve gaz oluşturabilmektedirler. Bu da pH' yı düşürmekte ve kırmızı olan besiyerinin rengi sarıya dönmektedir. Eğer aynı zamanda gaz oluşumu varsa, tüp içine yerleştirilen steril Durham tüpleri oluşan gazı toplayarak görünür hale getirmektedir. Eğer bakteri, denemeye alınan şekeri kullanmıyorsa besiyerinin rengi değişmeden kalmaktadır (Alexander ve Strete, 2001).

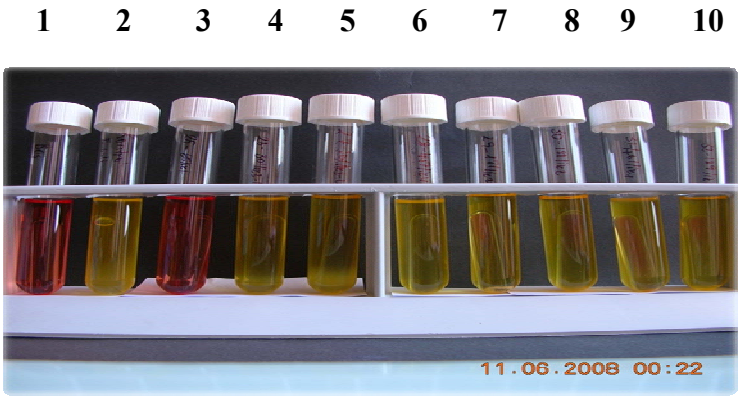
Pozitif test:

Karbonhidrat (kırmızı) ⟶ Asit (pH düşer) veya asit ve gaz (sarı renk oluşumu ve Durham tüp içinde birikmiş hava kabarcığı)

Negatif test:

Karbonhidrat (kırmızı) ⟶ Karbonhidrat (pH değişmez ve gaz oluşumu olmaz) (kırmızı ve Durham tüpü içinde hava kabarcığı yok)

Seçilmiş izolatlar bu temel sıvı besiyeri kullanılarak; glukoz, sukroz, sorbitol, mannitol, ksiloz, arabinoz, mannoz, sellobiyoz, trehaloz, galaktoz, fruktoz' dan oluşan 11 farklı şeker için test edilirken, glukozdan gaz oluşumunun varlığı da tayin edildi. Besiyerinin hazırlanmasının (Bkz. 2.2.1.1) ardından her bir temel sıvı besiyerini içeren şişeye 11 farklı şeker, distile suda çözülüp, 0,2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildikten sonra % 0,5 (w/v) final hacim olacak şekilde ilave edildi. Böylece 11 farklı fenol kırmızısı sıvı besiyeri hazırlandı. Glukozlu besiyerinin diğerlerine göre farkı ise gaz oluşumu için Durham tüpü de içeren ikinci bir set kullanılmış olmasıdır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Karbohidrat kullanım testi sonuçlarına ait örnekler; Glukoz kullanımı testi örnek fotoğrafı 1 Boş; 2 *Escherichia coli* Pozitif Kontrol (Glukoz kullanılıyor ve gaz oluşumu var); 3 Negatif sonuç vermiş izolat; 4 - 10 Pozitif sonuç veren izolatlar.

Bu test, çok fazla sayıda tüp sarfiyatı gerektirdiğinden, hem şeker kullanımının hızlıca taranabilmesi ve hem de tüp sarfiyatını azaltması sebebiyle, elde var olan 24 kuyulu steril plaklarda gerçekleştirildi. Bunun için plaklara bir yerleşim planı yapılarak, yukardan aşağıya izolatlar ekim sırasına uygun olarak yerleştirildi. Soldan sağa farklı şekerleri içeren besiyerleri 2' şer ml olarak dağıtıldı. Böylece iki plağa sıra ile şekerler dağıtıldığında 4 izolat aynı anda taranmış oldu. Ayrıca kullanılan her plak A, A´, B, B´, C, C´, vbg. şeklinde adlandırıldı (Şekil 2.15).

	sukroz	sorbitol	mannitol	ksiloz	arabinoz	mannoz	sellobiyoz	trehaloz	galaktoz	fruktoz	Boş	Boş
96/IK2											Boş	Boş
235/IK3											Boş	Boş
237 IK3											Boş	Boş
A118M-1											Boş	Boş
	1. Plak A										**1. Plak A'**	

Şekil 2.15. Karbonhidrat kullanımı için örnek yerleşim planı.

İzolatların 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Yukarıdaki yerleşim planına uygun olarak, izolatlar her bir kuyucuğa 40' ar µl olarak steril pipet ucu ile ekildi. Kontrol mikroorganizması olarak *Escherichia coli* kullanıldı. Ekim işleminin adından plaklar +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 48 saat büyümeye bırakıldı. İlk 24 saat sonrası yapılan gözlemler kaydedildi. 48. saat yapılan gözlemlerin sonuçları yukarıdaki reaksiyonlara dayanarak değerlendirildi ve kaydedildi. Glukoz içeren tüpte sıvı besiyerleri ise aynı zamanda gaz oluşumu için de gözlemlenerek sonuçları kayıt edildi (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Karbonhidrat kullanım testi sonuçlarına ait on farklı şeker kullanımı için yapılan testlerinin sonuçlarından örnekler (Sarı renkli kuyucuklar o şekerin izolat tarafından kullanıldığını göstermektedir).

2.2.10.4. Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Bu test bakterilerin kullandıkları karbonhidratları, oksidasyon yoluyla aerobik mi, yoksa fermantasyon yolu ile anaerobik olarak mı asidik ürünlere çevirdiklerinin test edilmesini sağlamaktadır. Karbonhidratları okside eden bakterilere aerop (A), fermente eden bakterilere ise fakültatif anaerop (FA) bakteriler denmektedir. Besiyeri olarak oksidasyon-fermantasyon (O/F) besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyeri düşük miktarda pepton (büyüme için gerekli) içermektedir. Peptonun düşük miktarda olması besiyerinde oluşacak alkalin ürünlerin sınırlı olmasını sağlamaktadır. Bu şekilde oluşan asidin nötrleştirilmesi engellenmektedir. O/F besiyerine eklenecek olan şekerler ise oldukça yüksek konsantrasyonlarda eklenmektedir. Bu şekilde bakterinin karbonhidrat kullanımı teşvik edilmektedir. Böylece asidik ürünler bol miktarda oluşmakta pH düşmekte ve besiyerinin rengi sarıya dönebilmektedir. Bu besiyerinde pH belirteci olarak brom timol mavisi kullanılmaktadır. Bu testte besiyerinin başlangıç pH' sı olan 7,1' de besiyeri yeşilken pH 6.0'da renk sarıya dönmektedir. Besiyerine düşük miktarda agar katılarak O/F besiyeri yarı katı besiyeri olarak hazırlanmaktadır (Alexander ve Strete, 2001).

Reaksiyon yok (Inert-I)

Glukoz (yeşil) ⟶ Glukoz (mineral yağ ilave edilmiş tüp) (yeşil)

Glukoz (yeşil) ⟶ Glukoz (mineral olmayan tüp) (yeşil)

Oksidasyon ve fermatasyon reaksiyonu var (Fakültatif Anaerop-FA)

Glukoz (yeşil) ⟶ Asit oluşumu, pH düşer (mineral yağ ilave edilmiş tüp) (sarı renk oluşumu)

Glukoz (yeşil) ⟶ Asit oluşumu, pH düşer (mineral yağ olmayan tüp) (sarı renk oluşumu)

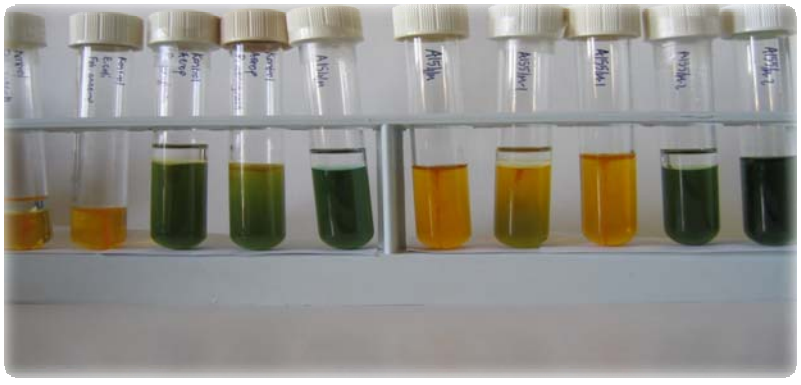
Oksidasyon reaksiyonu var (Aerop-A)

Glukoz (yeşil) ⟶ Glukoz (mineral yağ ilave edilmiş tüp) (yeşil)

Glukoz (yeşil) ⟶ Asit oluşumu, pH düşer (mineral yağ olmayan tüp) (sarı renk oluşumu)

Bu besiyerinden iki ayrı ekim seti olacak şekilde hazırlandı (Bkz. 2.2.1.1.). Takip eden aşamada ekim işlemi ardından, ikinci ekim setine ait tüplere ilave edilecek mineral yağ, 0.22 µm por çaplı tek kullanımlık (disposable) vakumlu filtreden süzülerek steril edildi. Her iki ekim setine, izolatların katı izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik taze kültürlerinden steril edilmiş iğne öze ile yarı katı besiyerinin içine girerek tek bir çizgi ekim hattı oluşturacak şekilde ekildi. Ekim işlemi biten ilk setin kapakları kapatıldı. İkinci set grubunun ise içlerine 1' er ml steril mineral yağ eklendikten sonra kapakları sıkıca kapatılarak etrafı parafilmle sıkıca sarıldı. Her iki ekim seti de +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 48 saat büyümeye bırakıldı. Burada steril mineral yağın ve parafilmle kapakların sarılmasının temel nedeni, fakültatif anaeroplar için anaerop ortam koşulları oluşturmaktır. Bu test için kontrol mikroroganizma olarak *Escherichia coli* (FA), *Pseudomonas aeruginosa* (A) kullanılmıştır. Test sonuçları yukarıdaki reaksiyonlara göre değerlendirilerek kaydedilmiştir (Şekil 2.17).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 2.17. Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) testi örnek resim 1-2 *E.coli*-Kontrol, Fakültatif Anaerop (FA); 3-4 Kontrol *P. aeruginosa* Aerop (A); 5-6 Aerop izolatın sonucu; 7-8 Fakültatif Anaerop (FA) izolat sonucu; 9-10 Etkisiz (Inert=I) izolat sonucunu göstermektedir.

2.2.10.5. Dekarboksilaz Testi (Arginin ve Lizin) (Alexander ve Strete, 2001)

Dekarboksilazlar aminoasitlerden karboksil grubunu uzaklaştıran bakteriyel enzimler olarak bilinirler. Bu işleme dekarboksilasyon denmektedir ve bu aminoasit metabolizmasının bir basamağını oluşturmaktadır. Her bir aminoasit için özgül bir dekarboksilaz enzimi vardır. Ancak bunlardan sadece üçü enterik bakterilerde ayırt edici bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunlar Arjinin, Lizin ve Ornitin Dekarboksilazlar olarak bilinmektedir.

Bu test için kullanılan Dekarboksilaz Sıvı Besiyeri temel besiyeri olarak yapılmakta ve içlerine adı geçen bu 3 aminoasit ayrı ayrı ilave edilmektedir. Bu besiyeri, bakteri büyüme destekleyicisi olarak dana ekstraktı ve pepton içermektedir. Ayrıca dekarboksilazların aktivitelerini teşvik etmek amacı ile bu enzimin koenzimi olan pridoksal içermektedir. İçeriğindeki glukoz ise fermente edilebilir karbonhidrat olarak bulunmaktadır. pH belirteci olarak da brom krezol moru içermektedir. Besiyerinin başlangıç pH' sı 7,0' a ayarlandıktan sonra renk, asitik pH' larda sarıya bazik pH' larda mora dönmektedir (Alexander ve Strete, 2001)

Pozitif test:

Glukoz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(mor) (sarı)

Aminoasit ⟶ Amin+ CO_2 (pH artar)
(ör; lizin) (mor)

Negatif test:

Glukoz ⟶ Asit oluşumu (pH düşer)
(mor) (sarı)

Aminoasit —dekarboksilaz enzimi yok→ Aminoasit (pH asidik kalır)
(ör; lizin) (sarı)

İzolatlar katı izolasyon besiyerlerine ekilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlanarak +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında büyümeye bırakıldı. Bu aşamada dekarboksilaz sıvı besiyeri (Bkz 2.2.1.1) iki ayrı şişeye hazırlandı. Birine lizin (10 g/l), diğerine ise arginin (10 g/l) eklendi. Besiyerleri manyetik ısıtıcıda eritildikten

sonra tüplere 5’ er ml bölündü (elimizde ornitin aminoasiti bulunmadığı için sadece arjinin ve lizin aminoasiti için bu test denendi). Otoklavlanarak steril edildi. Ekim işlemi, steril koşullarda katı besiyerlerinden steril öze ile tüplere yapıldı. Her iki grup tüpe (lizin ve arjinin grupları) yine steril koşullarda 1’ er ml steril mineral yağ eklendi ve kapakları sıkıca kapatılarak parafilmle etrafları anaerobik ortam oluşturacak şekilde sarıldı.

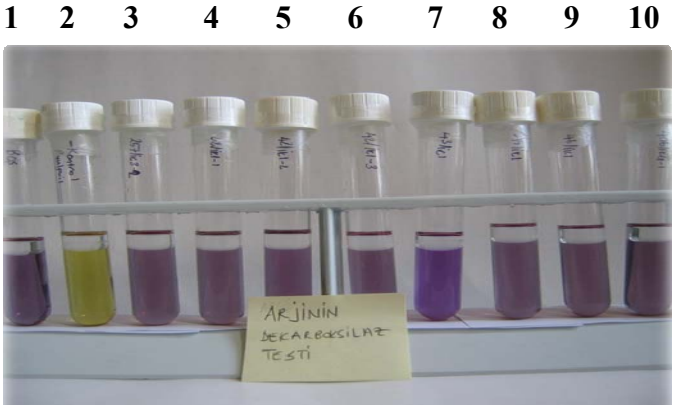
Oksijensiz ortam glikozun fermantasyonu için uygun koşulları oluşturmaktadır. Oluşan asidik ortam besiyerinin renginin (brom krezol moru nedeniyle) sarıya dönmesini sağlamaktadır. Bu dekarboksilazların çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu aşamada meydana gelen dekarboksilasyon ise ortamı tekrar alkali hale getirmekte ve besiyerinin rengi mora dönmektedir. Bu testte kontrol mikroorganizma olarak *Proteus vulgaris* [arjinin ve lizin dekarboksilaz (-)] kullanıldı.

Bu bilgiler ışığında tüpler, +30 ºC’ ta sıcak oda koşullarında 48 saat boyunca büyümeye bırakıldı ve belli aralıklarla takip edilerek gözlemler yukarıdaki reaksiyonlara göre değerlendirilerek kaydedildi (Şekil 2.18 ve 2.19).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 2.18. Lizin dekarboksilaz testi sonuçlarına ait fotoğraf. 1 Boş; 2, Negatif Kontrol *Proteus vulgaris*; 4,5,6,7,8 ve 10 Negatif sonuç veren izolatlar; 3 ve 9 reaksiyon vermeyen izolatlara ait örneklerdir.

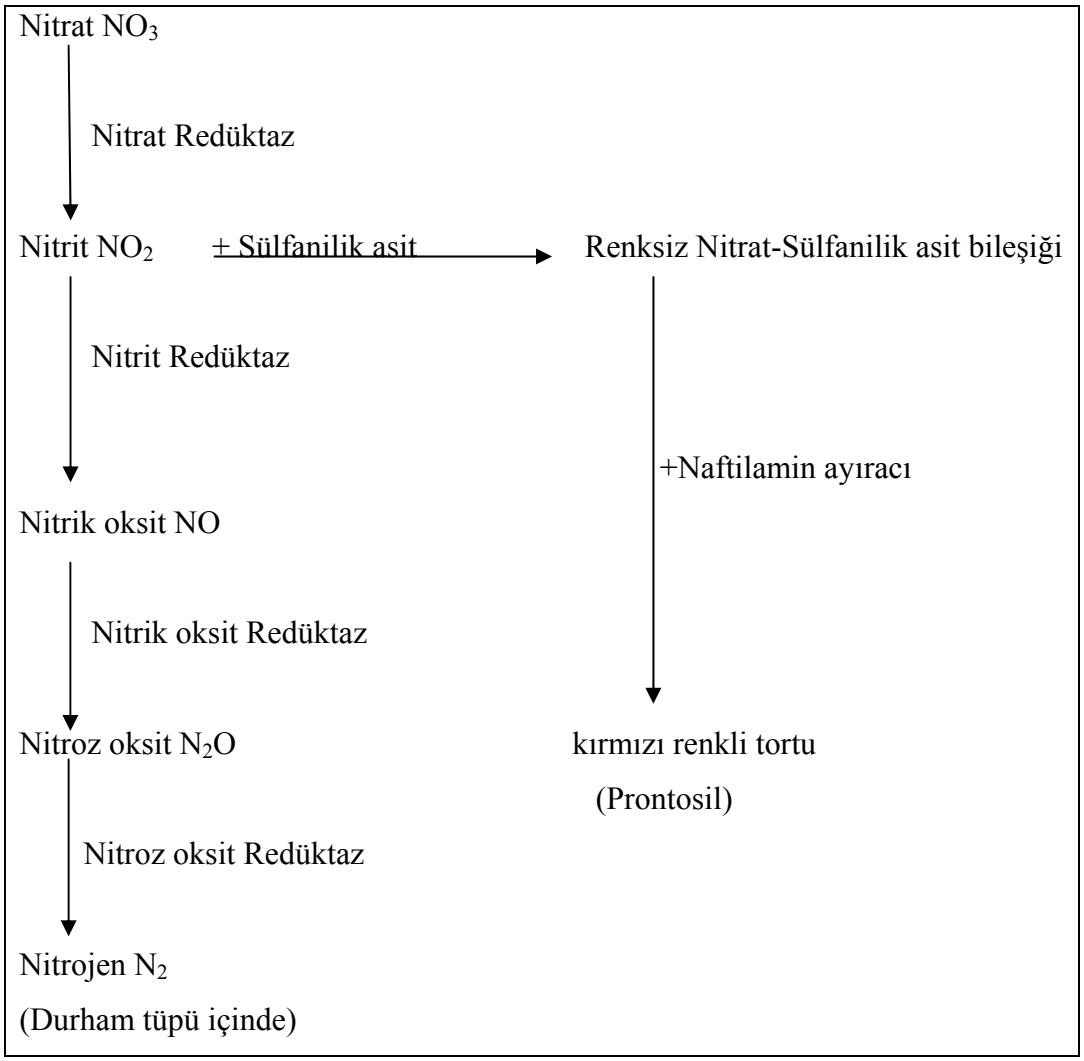


Şekil 2.19. Arjinin dekarboksilaz testi sonuçlarına ait fotoğraf. 1 Boş; 2 Negatif kontrol *Proteus vulgaris;* 3-6; 8-10 Reaksiyon vermeyen izolatlar; 7 Pozitif sonuç veren izolat örneğidir.

2.2.10.6. Nitrat İndirgeme Testi [Alexander ve Strete, (2001) ve Fluka Nitrat İndirgenme Test Kiti prospektüsü]

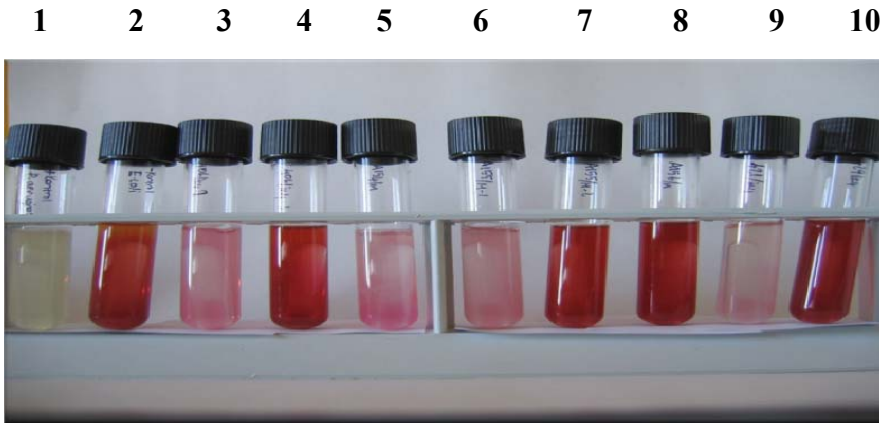
Denitrifikasyon olarak adlandırılan nitratı nitrojen gazına kadar indirgenmesi Nitrat, Nitrit, Nitrik Oksit ve Nitroz Oksit Redüktaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler oksijen yokluğunda nitratı bir elektron akseptörü olarak kullanabilmeyi sağlamaktadır (Alexander ve Strete, 2001).

Bu test için Nitrat İndirgeme Test Kiti kullanıldı. Steril Nitratlı besiyerlerine (Bkz. 2.2.1.1), izolatların 24 saatlik taze kültürlerinden steril öze ile inokülasyon yapıldı. İnokülasyon işlemini takiben tüplerin kapakları sıkıca kapatılıp parafilmle sarıldı ve anaerop koşullar oluşması sağlandı. Kontrol mikroorganizmaları olarak *Pseudomonas aeruginosa* [N_2 gazı oluşumu (+)] ve *Escherichia coli* [Nitratı nitrite indirgeme (+)] kullanıldı. Ekim işlemi biten Nitratlı besiyerindeki izolatlar +30ºC' ta sıcak oda koşullarında 48 saat büyümeye bırakıldı. Bu test esnasında meydan gelen kimyasal reaksiyonların akışı aşağıdaki gibidir. Test nitrat indirgenme şemasında yer alan basamakların sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 2.20). Bunun için Sülfanilik asit ve N,N-Dimetil-1-naftilamin ayıraçları kullanıldı (Bkz 2.2.1.3).



Şekil 2.20. Nitrat indirgenme basamakları ve buna bağlı renk reaksiyonu sonuçları (Kaynak-Fluka Nitratı İndirgeme Test Kiti Prospektüsü).

48 saatlik inkübasyon sonrası tüplerin kapakları açılarak içlerine her iki ayıraçtan sırası ile 5' er damla damlatıldı. Tüpler çalkalanarak oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildi. Birkaç dakika sonra oluşan kırmızı renk nitratın nitrite indirgendiğini göstermiştir. Eğer birkaç dakika içinde renk değişimi meydana gelmemişse tüplere bu sefer eser miktarda çinko (Zn) tozu eklenerek 10-15 dk sonunda kırmızı-pembe renk oluşumu beklendi. Sonuçlar bu şekli ile pozitif kabul edildi. Eğer Nitrat, azot (N_2) gazına kadar indirgenmişse herhangi bir renk değişimi gözlenmedi. Sadece tüplerin içindeki Durham tüplerinde azot gazı birikimi gözlendi. (Şekil 2.21).



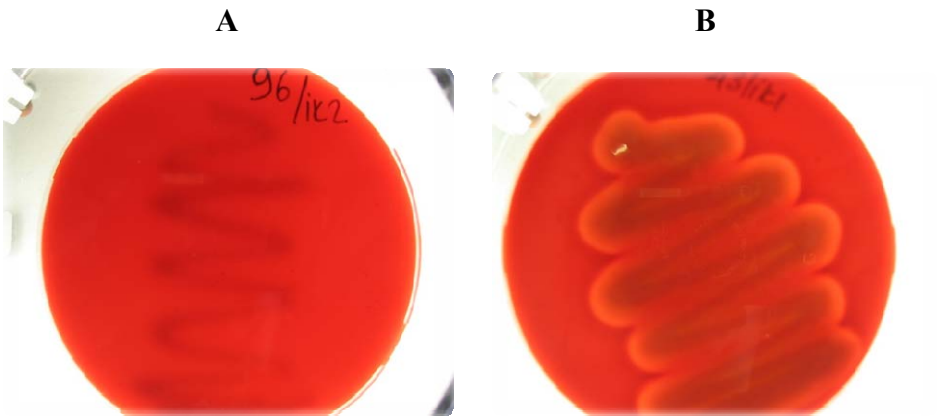
Şekil 2.21. Nitrat testine ait fotoğraf. 1, pozitif kontrol ($NO3 \longrightarrow N_2$), Durham tüpünde Azot gazı oluşmuş Nitrat N_2 gazına kadar indirgenmiş; 2, pozitif kontrol ($NO_3 \longrightarrow NO_2$), Nitrat, Nitrit' e indirgenmiş N_2 gazı oluşumu yok; 2-10 farklı izolatlarda farklı şiddetlerde pozitif sonuçlar.

2.2.10.7. Hemoliz Testi (Alexander ve Strete, 2001)

Bakterilerin kanlı agara ekildiğinde, besiyeri içindeki kanda bulunan kırmızı kan hücrelerini parçalamasına (hemoliz) bağlı olarak meydana getirdikleri zonun değerlendirilmesidir. Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besiyeri kullanılarak test edilebilmektedir. Hemoliz testi, daha çok Streptokok ve Stafilokokları kendi içlerinde ayırmak için kullanılmaktadır. Streptokoklar Kanlı Agar besiyerinde α (alfa), β (beta) ve γ (gamma) hemolitik reaksiyon verirler. α-Hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerinde oluşturdukları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşur. β- Hemolitik streptokoklar, aynı besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturur. γ-hemolitik streptokoklar ise hemolizin enzimine sahip olmayan, kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan streptokoklardır. (Alexander ve Strete, 2001).

Bu bilgiler ışığında izolatlarımızın sıvı izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik taze kültürlerinden, hazır olarak temin edilmiş koyun kanlı agara (Ekbak firması-

Pendik) steril öze kullanılarak, çizgi ekim yöntemi ile ekim yapılarak +30 ºC' ta sıcak oda koşularında büyümeye bırakıldı. 24 saatlik büyüme periyodunu takiben değerlendirme yukarıda açıklanan bilgiler ışığında yapılarak kayıt edildi (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Hemoliz testi örnek resimleri A. Gama (γ) Hemolitik izolat örneği B. Alfa (α) Hemolitik izolat örneği

2.2.10.8. Jelatin Hidroliz Testi (Tamer ve ark., 1989)

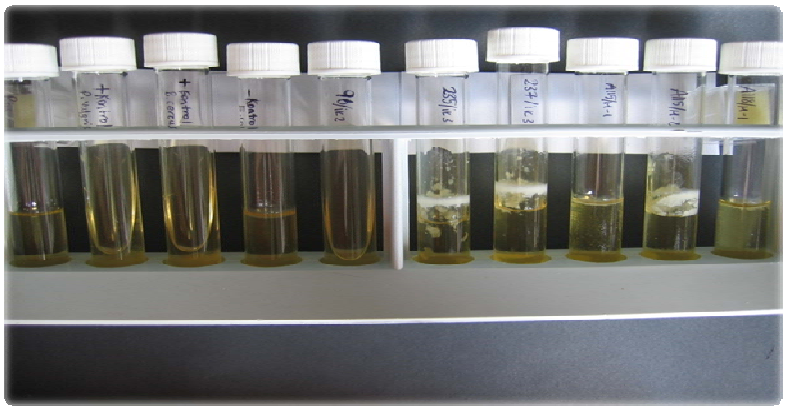
Jelatin ekstraselüler bir enzim olan Jelatinaz tarafından parçalanabilen bir proteindir. Bu enzimatik yıkımı takiben jelatinli besiyerinde ve parçalanma olur. Bu Jelatinaz varlığı, yani pozitif (+) sonuçtur. Besiyerinde bir sıvılaşma olmazsa bu negatif (-) sonuç olarak kaydedilir (Alexander ve Strete, 2001).

Bu enzimin varlığı Nutrient Jelatin besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) ile test edilmiştir. 24 saatlik katı izolasyon besiyerindeki izolatlarımızdan, steril iğne yardımı ile besiyeri içine girerek dikey tek bir ekim hattı oluşturulacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işlemi sonunda izolatlar 7 gün boyunca sıcak oda koşullarında büyümeye bırakıldı. Kontrol mikroorganizması olarak *Escherichia coli* [jelatinaz (-)], *Proteus vulgaris* ve *Bacillus cereus* [jelatinaz (+)] kullanıldı.

Bu testin değerlendirilmesi izolatın jelatini sıvılaştırma biçimine göre yapıldı. Eğer varsa sıvılaştırma biçimi Tamer ve arkadaşlarının (1989) "Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu" nun ilgili bölümü referans alınarak yapıldı. Buna göre izolatların krater, turp, huni, kök veya tabakalı şeklinde bir sıvılaştırma yapıp

yapmadığı kontrol edildi ve gözlemler kaydedildi. Jelatinaz negatif soylar ise herhangi bir üreme ve jelatin sıvılaştırması oluşturmadılar (Şekil 2.23).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 2.23. Jelatin Hidrolizi denemesine ait fotoğraf. 1 Boş, 2 *P. vulgaris* Pozitif kontrol, 3 *Bacillus cereus* Pozitif kontrol 4 *Escherichia coli* Negatif kontrol; 5 Pozitif sonuç veren izolat; 6-10 Negatif sonuç veren izolatlar

2.2.10.9. Nişasta Hidrolizi Testi (Amilaz) [Bora ve Kalita, 2007; Sánchez-Porro ve ark., (2003) ve Tuzlakoğlu (Yüksek Lisans Tezi, 2004)]

Amilaz üreticisi izolatların test edilmesinde Bora ve Kalita (2007), Sánchez-Porro ve ark., (2003) ve Tuzlakoğlu (Yüksek Lisans Tezi, 2004)' nun yöntemleri referans alındı. %1 (w/v) oranında çözülebilir nişastalı Nutrient Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) izolatların elde edildikleri deniz suyu oranlarında hazırlandı ve izolatlar bu besiyerlerine steril iğne ile ekildi. +30 ºC'ta, 48 saat inkübasyonun ardından, Petri kaplarına %1 (w/v) iyot içeren %2 (w/v)' lik KI (Gram iyodür) çözeltisi bir sprey yardımı ile püskürtüldü. Nişastayı hidroliz eden izolatların kolonileri etrafında açık renkli alanlar oluştu (Şekil 2.24) ve bunlar amilaz üreticisi soylar olarak kaydedildi.

(A) 42 İK 1-1 **(B) 447/İK4**



Şekil 2.24. Nişasta Hidrolizi Testi' ne göre amilaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek resimler (Koyu mavi boyanan bölgeler nişasta varlığını, açık renkli bölgeler ise nişastanın amilaz enzimi varlığında parçalandığını ifade etmektedir)

2.2.10.10. Lipit hidrolizi Testi (Lipaz) [Bora ve Kalita (2007), Kauker ve Jeager (1987) ve Balcı (Y.Lisans Tezi, 2004)]

Ekstraselüler lipaz üreticisi soyların tarandığı bu testte ise Kauker ve Jeager (1987) ve Balcı (Y.Lisans Tezi, 2004); Bora ve Kalita (2007)' nın yöntemleri ayrı ayrı denendi. Bora ve Kalita (2007)' nın yöntemine göre %1 (w/v) gliserol tributiratlı Nutrient Agar besiyerine (Bkz. 2.2.1.1.) uygun oranlarda deniz suyu ilave edilerek hazırlandı.

Petri kaplarına dökülmeden önce iyice karıştırılarak besiyeri içindeki substrat homojenize edildi. Katılaşan besiyerlerine izolatların sıvı izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik kültürlerinden steril öze ile ekim yapıldı ve +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 24 saat büyümeye bırakıldı. 24 saat sonunda etraflarında zon oluşturan izolatlar lipaz üreticisi pozitif (+) kabul edildi (Şekil 2.25).

42/İK1-3



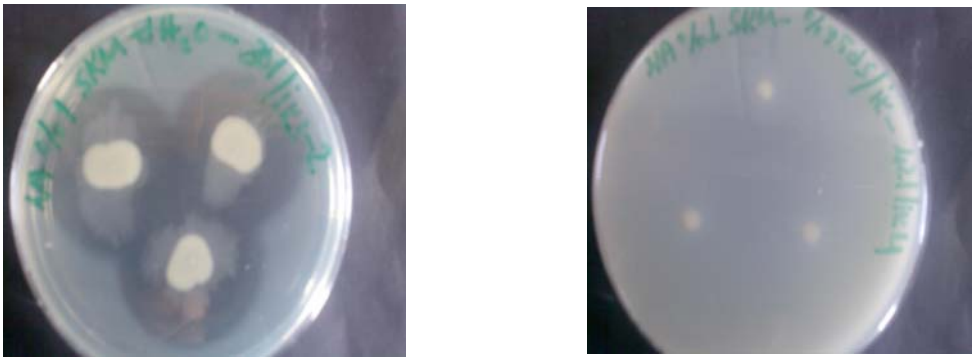
Şekil 2.25. Lipit Hidrolizi Testi' ne göre lipaz negatif örnek fotoğrafı. Ekim hattı etrafında herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir (Bora ve Kalita, 2007' ye göre).

Kauker ve Jeager (1987) ve Balcı (Y.Lisans Tezi, 2004)' ya göre ise 0,001 (w/v) Rodamin B' li Nutrient Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) yine uygun deniz suyu oranlarında hazırlandı ve katı besiyerlerine izolatların 24 saatlik sıvı izolasyon besiyerlerinden steril iğne ile ekim yapılarak +30 ºC' ta sıcak oda koşullarında 48 saat büyümeye bırakıldı. Kontrol mikrorganizma olarak *Escherichia coli* [Lipaz (-)] ve *Pseudomonas aeruginosa* [lipaz (+)] kullanıldı. Büyüme süresini tamamlayan izolatlar 366 nm dalga boylu UV lambası üzerinde karanlık bir ortamda gözlemlendi ve pembe-turuncu ışıma yapan koloniler lipaz üreticisi soylar olarak kaydedildi.

2.2.10.11. Protein Hidrolizi Testi (Proteaz) [Bora ve Kalita, (2007) ve Battal (Y. Lisans Tezi, 2004)]

Bu test için Bora ve Kalita, (2007) ve Battal (Y. Lisans Tezi, 2004)'ın yöntemleri kullanıldı. Bunun için %1 (w/v) süt tozlu Nutrient Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) izolatların izole edildikleri deniz suyu oranlarında hazırlandı ve 53 izolatın sıvı izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik taze kültürlerinden steril iğne ile ekim yapıldı. Kontrol mikroorganizması olarak *Proteus vulgaris* [proteaz (+)] kullanıldı. Ekim işlemi sonrası izolatlar + 30 ºC' ta sıcak odada 24 saat büyümeye bırakıldı. 24 saatlik büyüme periyodunu takiben Petri kapları incelendiğinde etraflarında açık renkli zon oluşturanlar proteaz üreticisi soylar olarak kabul edildi (Şekil 2.26) ve kaydedildi.

(A) 301/İK3 (B) 421/İK4



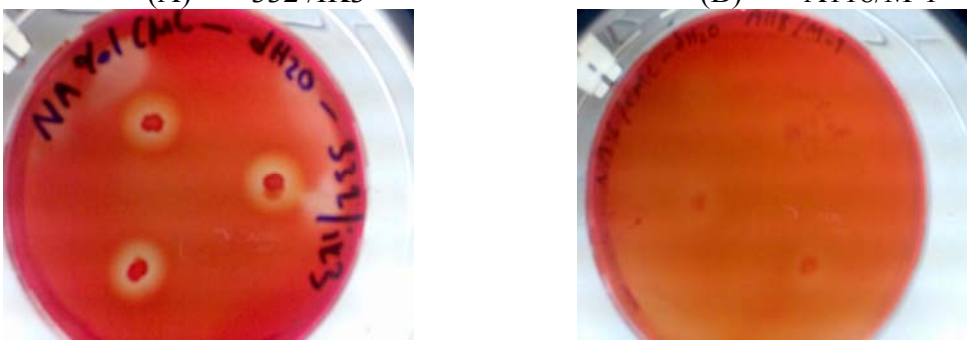
Şekil 2.26. Protein Hidrolizi Testi'ne göre proteaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek fotoğraflar.

2.2.10.12. Selüloz Hidrolizi Testi (Selülaz) [Bora ve Kalita, (2007)]

Bu test için Bora ve Kalita (2007)' nın yöntemi tercih edildi. Bu amaçla %1 (w/v) karboksimetilselülozlu Nutrient Agar besiyeri (Bkz. 2.2.1.1) izolasyon aşamasındaki oranlarda deniz suyu oranları ile hazırlandı. İzolatların izolasyon besiyerlerindeki 24 saatlik taze kültürlerden steril iğne ile ekim yapıldı. Ekim işlemini takiben izolatlar 48 saat sıcak oda koşullarında büyümeye bırakıldı.

Büyüme sürecinin tamamlanmasını takiben izolatların üzerine, önce Kongo kırmızısı (Bkz. 2.2.1.2) damlatılmış ve yüzeysel olarak 15 dk boyanmış (Teather ve Wood, 1982) ve boya dökülerek tuzlu su ile Petri kapları yıkandı. Işıklı tabla üzerine yerleştirilen Petri kaplarındaki kolonileriında etrafında sarı renkli zon oluşturan izolatlar, selülaz üreticisi, göstermeyenler selülaz üreticisi olmayan soylar olarak (Şekil 2.27) kayıt edildi.

(A) 332 /İK3 (B) A118/M-1



Şekil 2.27. Selüloz Hidrolizi Testi'ne göre selülaz pozitif (A) ve negatif (B) izolatlara ait örnek fotoğraflar.

2.2.11. İzolatların Otomatik Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanması

Seçilmiş 53 saf izolatın her birine yeniden koloni morfolojisi, Gram boyama, spor boyama, oksidaz ve katalaz testleri yapılmıştır. Kontaminasyon olmadığından emin olunarak VITEK 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanmaya alınmışlardır.

VITEK 2 Kompakt aleti, bilinmeyen saf kültürü özel kartlarının içeriğinde bulunan 60 farklı biyokimyasal özelliği (enzim kullanımı, karbonhidrattan asit oluşturma vbg) kullanarak test eden ve sonuçları kütüphanesindeki Gram pozitif bakterilere ait 115, Gram negatif bakterilere ait 158 farklı grup (20 000' den fazla tür) ile karşılaştırarak (Zbinden ve ark., 2007) tür seviyesinde tanımlamaya yarayan bir mekanizmadır (Şekil 2.28 a-h). Aletin Gram pozitif, Gram negatif, Gram pozitif basil formunda bakterileri ve mayaları tanımlamada kullanılan kart setleri vardır.

Tanımlanmasına karar verilen bakterilerin izole edildikleri katı besiyerine ekilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerden steril ortamda öze yardımı ile alınan izolatlar, içinde 3 ml steril tuzlu (% 0,45' lik) su bulunan polisteran tüplere aktarıldı ve süspansiyonun yoğunluğu cihaza ait yoğunluk ölçme cihazı yardımı ile 0,5 Mc Farland' a ayarlandı (Şekil 2.28). Bu tüpler cihazın kendine ait kasedine yerleştirildi.

Cihaza tanımlama yapmak üzere izolatların yüklenme basamağında, seçilen uygun kartlar [Gram pozitif kok ve sporsuz basiller için GP kartı / GP-21342, Gram negatif fermentatif veya non-fermentatif basiller için GN kartı / GN-21341 ve Gram pozitif spor formunda basiller için GBL kartı / BCL-21345 kartları) kullanıldı. Kartlar kasetlere tüplerdeki sıraya uygun olarak yerleştirildi (Şekil 2.27. c, d). Ardından cihazın işletim sistemine bağlı olarak kartların üzerindeki barkotların okunması ile tanımlanmaya başlandı. Doğru okuma sonucunun alınması için izolatların çalışma kodları cihaza el ile girildi ve izolatlar sisteme tanıtıldı (Şekil 2.28. e, f). Cihaz, uygun bölmesine yerleştirilen bu kartlara, bu tüplerden dolum yaptı (Şekil 2.28. g). Kartların izolat süspansiyonu ile doldurulmasını takiben kartları taşıyan kaset bu sefer cihazın başka bir bölmesinde bulunan ve kartların cihaz tarafından kabul edilerek inkübasyona alındığı bölmeye yerleştirildi (Şekil 2.28. h, ı). Sistem her bir izolat için farklı inkübasyon sürelerinde değerlendirme yaptığından, sonuçları bazı izolatlar için ilk 5 saatte, bazıları içinde 8-15 saatte otomatik olarak yazıcıdan çıktı olarak alındı. Tanımlama basamağının bitiminde işi biten kartlar cihazın atık kutusunda toplanarak imha edildi (Şekil 2.28.k).

Şekil 2.28. Vitek otomatik tanımlama sistemi ile izolatların tanımlanmasında izlenen iş akışı

http://www.biomerieux-diagnostics.com/ (a ve k)

b, c, d, e, f, g, h, ı ve j fotoğrafları çalışma anında çekilmiştir



a-Vitek 2 Kompakt sitemi



b- İzolat süspansiyonunun Mac Farlve ayarlarının yapıldığı yoğunluk ölçme cihazı



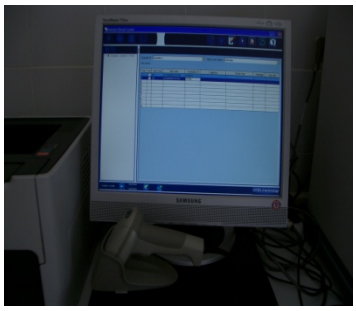
c-Vitek tanımlama kartlarının ve izolat süspansiyonunu içeren polisteran tüplerin yerleştirildiği kaset



d- Vitek kartlarını taşıyan kasetlerin cihaza yükleme yapılmak üzere yerleştirilmesi



e- Kartların barkotlarının okutulması



f- İzolatın cihaza tanıtımı



g- Kartların izolat süspansiyonu ile doldurulması için cihazın haznesine yerleştirilmesi



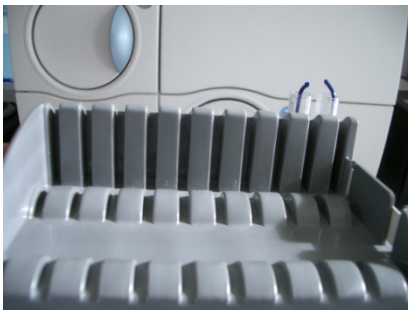
h- Kartların tanımlanmak üzere inkübasyona alındığı cihaz bölmesi

Devamı arka sayfada

Şekil 2.28' nin Devamı



ı-Kartların tanımlama aşamasına alınmak üzere yerleştirilmesi



j-Kartların inkübasyon için cihaza alınmasını takiben atık boş tüpler



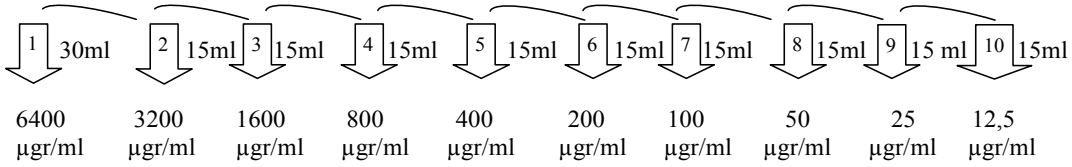
k-Tanımalama aşamasının bitimini takiben atık kartların uzaklaştırılması

2.2.12. Seçilmiş İzolatların Çeşitli Ağır Metallere Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Minimal Inhibition Concentration-MIC) Değerlerinin Tayin Edilmesine Yönelik Deneyler

Seçilmiş izolatların ağır metal ve antibiyotik dirençliliği arasında var olan ilişkinin araştırılması amacıyla mikrotitre sıvı dilüsyon metotu (Microtitre Broth Dilution Method) kullanıldı Literatürde tercih edilmiş (Matyar ve ark., 2004; Matyar ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2008); 5 farklı ağır metalin [Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu), Krom (Cr), Kuşun (Pb), Mangan (Mn)] tuzlarını [$CdCl_2.2H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $CrCl_3$, $Pb(NO_3)_2$ ve $MnCl_2.2H_2O$] 10 farklı konsantrasyonda içeren (12,5 µg/ml - >3200 µg/mg) Mueller Hinton sıvı besiyeri (Bkz 2.2.1.1) 50 ml' lik steril Falkon tüplerine ilk tüpe 30 ml diğerlerine 15' er ml olacak şekilde dağıtıldı. Ağır metal tuzları aşağıdaki şekilde (Şekil 2.28) gösterildiği gibi final konsantrasyonu ilk tüp için 6400 µg/ml olacak şekilde tartılarak ilk tüpe ilave edildi. Elde edilen ağır metalli besiyeri çözeltisi steril etmek için 0,22 µm por çaplı filtreden steril 50 ml' lik başka bir steril falkon tüpe süzüldü.

İlk dilüsyon tüpünden 15 ml ağır metal-besiyeri karışımı çekilerek sıradaki dilüsyonu içerecek tüpe steril koşullarda ilave edilerek azalan seviyelerde sulandırıldı. Bu şekilde 10 farklı sulandırma oranında sıvı stok besiyeri hazırlandı. Bu şekilde 5 farklı ağır metal için 10 farklı konsantrasyonda sulandırılarak

hazırlanmış 50 adet steril ağır metalli besiyeri hazırlandı (Şekil 2.29). Bunlar kullanılana kadar -20 ºC' ta derin dondurucuda saklandılar.



Şekil 2.29. Mueller Hinton sıvı besiyerinin farklı ağır metal konsantrasyonlarına göre hazırlanışı.

Ekim için steril 96 kuyucuklu mikro plaklar kullanıldı. Her bir plak 8 farklı izolat için kullanıldı (Şekil 2.30). Her bir izolat için aynı anda 5 farklı ağır metalin (Cd, Cu, Cr, Pb, Mn) dilüsyonları denendi.

Her bir kuyucuğa yatay düzlemde besiyerinin 10 farklı dilüsyonu sıra ile 200' er µl eklendi. İlk kuyucuk ve ikinci kuyucuğa ağır metal içermeyen boş besiyeri (Mueller Hinton sıvı besiyeri) eklendi. Bu kuyucuklardan ilki boş bırakıldı. İkincisinden itibaren yatay düzlemde her kuyucuğa izolatların 24 saatlik taze kültürlerinden hazırandı ve steril FTS (% 0,9'luk) ile 0,5 Mac Farland'a (yaklaşık 10^8 cfu/ml) ayarlanmış bakteri süspansiyonundan mikropipet yardımı ile 2 µl (her bir kuyucuğa 10^3 bakteri) alınarak inoküle edildi. Ekim işlemi 8' li gruplar halinde yapıldı (Şekil 2.30).

İz. No *	(-) kont. **	(+) kont. ***	6400 µgr/ ml	3200 µgr/ ml	1600 µgr/ ml	800 µgr /ml	400 µgr/ ml	200 µgr/ ml	100 µgr/ ml	50 µgr/ ml	25 µgr/ ml	12,5 µgr/ ml
1	B. by.	42 /İK1-1										
2	B. by.	42 /İK1-2										
3	B. by.	42 /İK1-3										
4	B. by.	43/İK1										
5	B. by.	45 İK1										
6	B. by.	46 İK1										
7	B. by.	406 /İK4-1										
8	B. by.	406/İK4-2										

*İz. No=İzolat No

**(-) kontrol=Ağır metallerin herhangi birini içermeyen boş Mueller Hinton Besiyeri

**(+) kontrol= Ağır metallerin herhangi birini içermeyen sadece izolatın ekildiği Mueller Hinton Besiyeri

Şekil 2.30. İzolatların ve ağır metalli besiyerlerinin dilüsyonlarının plaklara dağılımının örnek yerleşim planı.

İnokülasyon işlemi biten plaklar topluca +30º C' ta sıcak odada 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrasında her bir plak 630 nm dalga boyundaki absorbansta mikroplak okuyucu da (ELISA Reader) okundu. Ayrıca her bir besiyerinin boş örnekleri de plaklara dağıtılarak aynı absorbansta okutuldu.

Kuyucuklarda üreme olup olmadığına, mikroplaklardaki kontrol kuyucukları ile ağır metalli boş besiyerlerinin absorbans değerleri ile karşılaştırıldıktan sonra, göz ile de kontrol edildikten sonra karar verildi.

2.2.13. İzolatların Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlanması

İlgili literatür bilgilerinin ışığında son yıllarda bilim çevreleri tarafından, sınıflandıma esaslarında temel alınan geleneksel kültür bağımlı mikrobiyolojik metotlara ek olarak, 16S rDNA geninin PCR ile çoğaltılmasını temel alan moleküler biyoloji temelli sınıflandırma yöntemlerinin sıklıkla tercih edildiği görülmektedir. Bu nedenle doktora tezi çalışması kapsamında klasik ve otomatik tanımlama yöntemlerinin yanı sıra moleküler biyolojik yöntemler içinde en güvenilir ve tercih edilen bir yöntem olması bakımından 16S rDNA dizilendirme yöntemi de kullanılmıştır.

Giriş bölümünde (1.4.2)' de yer alan literatür özetinden anlaşılacağı gibi, araştırıcılar gerek denizlerden ve gerekse diğer kaynaklardan izole edilen izolatların

tür seviyesinde tanımlanmasında ilk aşamada evrensel primerleri tercih etmişlerdir. Aynı genusa üye iki veya daha fazla türün ayırt edilmesinde ise moleküler seviyede tanımlama sorunları türe özel proteinleri kodlayan genler için özel olarak tasarlanmış primerlerle aşmayı önermektedirler. Bu aşamada dikkat çeken iki çalışma bu tez çalışması kapsamında seçilecek olan evrensel primerlere karar vermede yardımcı olmuştur. Weisburg ve arkadaşları, 1991' de yayınladığı çalışmalarında genel olarak öbakteriler için 27F – 1492R evrensel primerlerini kullanmayı farklı evrensel primerleri karşılaştırarak önermiştir. Benito ve arkadaşları (2004), deniz bakterilerinin moleküler seviyede tanımlanmasında 27F – 1492R evrensel primerlerini kullanmayı, Genomik DNA' nın görüntülenmesinde %0,8' lik agaroz jel (%1' lik EtBr ilave edilmiş) elektroforezini Wizard genomik DNA izolasyon ve jelden geri kazanım kitini önermektedir. Kullanılacak evrensel primerlere, literatürde deniz bakterileri için sıkça tercih edilmiş olması dikkate alınarak karar verilmiştir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında kullanılacak evrensel primer 27F YM (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA - 3' ve 1491R YM (5' – ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3') olarak tasarlanmıştır.

2.2.13.1. Genomik DNA izolasyonu

Çalışma kapsamında seçilmiş 53 izolatın genomik DNA izolasyonları Wizard® Genomik DNA saflaştırma kiti kullanılarak yapıldı. Genomik DNA izolasyonu için aşağıda detayları verilmiş protokol takip edildi (Wizard® Genomik DNA saflaştırma kit kullanıcı kitabı).

Bu amaçla seçilmiş izolatlar saf ve taze kültürleri hazırlandı. İzolatlar sıvı izolasyon besiyerlerine inoküle edilerek +30 ºC' ta sıcak odada büyümeye bırakıldılar. 24 Saatlik büyüme periyodunu takiben izolatların taze kültürlerinden 1' er ml 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Bunlar 14000 rpm/18000 rcf' te 2 dk santrüfüj edildi ve üst sıvı atıldı. Bu aşamada mikrosantrifüj tüplerindeki Gram negatif izolatlar ayrılarak kapakları parafilmle sarıldı ve izolasyon aşamasına kadar +4 ºC' ta buzdolabına kaldırıldı.

Gram (+) izolatlar için aşağıdaki aşamalar takip edildi (Kullanılan çözeltiler için Bkz. 2.2.1)

1- Hücre pelletleri üzerine 480 µl 50 mM EDTA (pH 8.0) eklendi.

2- Yukarıdaki karışımın üzerine 120 µl; lizozim (10 mg/µl) eklendi ve pipetle çekip-bırakarak, nazikçe karıştırıldı. Böylece hücre duvarları zayıflatıldı ve daha etkili bir parçalanma sağlandı.

3- Mikrosantrifüj tüpü içindeki karışım 37ºC'ta 45 dk inkübe edildi. İlk 32 örnek 14000 rpm/18000 rcf de 3 dk son 21 örnek ise 15000 rcf' te 4 dk santrifüjde çevrilerek çöktürüldü.

Bu basamakta Gram (+) ve Gram (-) izolatların genomik DNA izolasyonuna beraberce devam edildi.

4- Hücre pelletleri üzerine 600 µl; Nuklei Lizis solüsyonundan eklendi ve pipetle çekip-bırakarak, nazikçe karıştırıldı. Böylece pellet bu solüsyon içinde çözüldü.

5- Bu karışım 80ºC'ta 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

6- Parçalanmış hücrelere 3 µl; RNaz solüsyonundan eklendi. Tüp ters yüz edilerek 2-5 defa karıştırıldı.

7- Bu karışım 37ºC' ta 45 dk bekletildi ve örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

8- Karışım üzerine 200 µl Protein çöktürme solüsyonundan eklendi. Örnekler 20 sn yüksek hızda Vorteks yardımıyla karıştırıldı. Böylece protein çöktürme solüsyonu ile hücre lizatının iyice karışması sağlandı.

9- Bu karışımı buzda 5 dk inkübe edildikten sonra, ilk 32 örnek (1-32) 14000 rpm/18000 rcf de 3 dk son 21 örnek (33-53) ise 15000 rcf' te 4 dk santrifüjde çevrilerek çöktürüldü.

10- Üst sıvılar temiz ve steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 600 µl izopropanol (oda sıcaklığında) eklendi.

11- Temiz tüpe alınan üst sıvı ve izopropanol karışımı da tüp ters yüz edilerek DNA iplikleri görülene kadar karıştırıldı. İlk 32 (1-32) örnek 14000 rpm/18000 rcf de 3 dk son 21 (33-53) örnek ise 15000 rcf' te 4 dk santrifüjde çevrilerek çöktürüldü.

12- Üst sıvı dikkatlice ve tamamen, (gerekirse) temiz filtre kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 600 µl; %70 (w/w) etanol (oda sıcaklığında) eklendi. Karışımı içeren tüpler ters yüz edilerek karıştırıldı Böylece birkaç kez DNA pelleti yıkandı ve örnekler İlk 32 (1-32) örnek 14000 rpm/18000 rcf de 3 dk son 21 (33-53) örnek ise 15000 rcf' te 4 dk santrifüjde çevrilerek çöktürüldü.

13- Alkol dikkatlice ve tamamen, (gerekirse) temiz filtre kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldı ve mikrosantrifüj tüpleri içindeki pelletler Liyafilizatör sistemi kullanılarak yaklaşık 65 dk' da kurutuldu.

14- Kuruyan pelletin üzerine 100' er µl steril ampul su eklendi ve DNA solusyonu +4 ºC'ta buzdolabında koruma altına alındı.

İzolatlara ait tüm genomik DNA' lar %0,8 (w/v)' lik agaroz jelde 80-110 V' ta yaklaşık 1 saat yürütüldü ve uygun belirteçler (1 Kb DNA Ladder) kullanılarak varlıkları jel üzerinde UV görüntüleme sistemi kullanılarak gözlendi ve fotoğraflandı (Çizelge 2.4). Ek olarak UV spektrofotometrede 260 nm Absorbansta genomik DNA' ların miktarları belirlendi. Genomik DNA izolasyonundan emin olunduktan sonra 16S rDNA' nın Termal Döngü Cihazı tarafından PCR ile eldesi ve çoğaltılması aşamasına geçildi.

Çizelge 2.4 Seçilmiş izolatlardan elde edilen genomik DNA'ların miktarları

Örnek no:	**Genomik DNA OD_{260} değerleri**	**Genomik DNA miktarı (ng/µl)**
1	0,241	1205
2	0,242	1210
3	0,224	1120
4	0,349	1745
5	0,231	1155
6	0,230	1150
7	0,233	1165
8	0,381	1905
9	0,305	1525
10	0,243	1215
		Devamı arka sayfada

Çizelge 2.4’ ün devamı

Örnek no:	Genomik DNA OD_{260} değerleri	Genomik DNA miktarı (ng/µl)
11	0,305	1525
12	0,239	1195
13	0,236	1180
14	0,235	1175
15	0,244	1220
16	0,234	1170
17	0,253	1265
18	0,231	1155
19	0,236	1180
20	0,242	1210
21	0,390	1950
22	0,234	1170
23	0,236	1180
24	0,231	1155
25	0,233	1165
26	0,230	1150
27	0,231	1155
28	0,228	1140
29	0,226	1130
30	0,224	1120
31	0,298	1490
32	0,252	1260
33	0,241	1205
34	0,238	1190
35	0,230	1150
36	0,246	1230
37	0,236	1180
38	0,240	1200
39	0,247	1235
40	0,256	1280
41	0,270	1350
42	0,244	1220
43	0,232	1160
44	0,302	1510
45	0,258	1290
46	0,249	1245
47	0,251	1255
48	0,255	1275
49	0,247	1235
50	0,259	1295
51	0,238	1190
52	0,246	1230
53	0,247	1235

2.2.13.2. Kullanılan Termal Döngü Cihazı PCR Reaksiyon Karışımının Belirlenmesi ve Programının Oluşturulması

İzolatlardan elde edilen genomik DNA' lardan 16S rDNA bölgesinin eldesine ve çoğaltılmasına yönelik olarak hazırlanan Termal Döngü Cihazı reaksiyon karışımı ve programı oluşturulurken Bölüm 2.2.13.1' de verilen literatürler kapsamında sıklıkla tercih edilen protokoller ve kullanılan PCR sarf malzemelerinin reaksiyon karışım miktarlarının hesaplanmasında için ticari firma tarafından tavsiye edilen kullanıcı bilgileri esas alındı (GoTaq® Flexi Polymerase kullanıcı prospektüsü). Buna göre aşağıdaki Termal Döngü Cihazı reaksiyon karışımı ve programı oluşturuldu (Kullanılan sarf maddesi hazırlığı için Bkz. 2.2.1.4)

Reaksiyon miktarı toplam 50 µl olarak seçildi ve her örnekten 6 tüp olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı; PCR tamponu 1X, $MgCl_2$ (25 mM) 3mM, kalıp DNA (200 ng/µl) 0,5 µg, dNTP karışımı (10 mM) 200 µM, F ve R primer (10mM) 0,5 µM, Taq polimeraz (5u/ µl) 1,25 u/ µl ile hazırlandı ve 50 µl' ye steril ampul su ile tamamlandı.

Termal Döngü Cihazı Programı, ön denatürasyon 95 ºC' ta 5 dk, denatürasyon 95 ºC' ta 1 dk, bağlanma 58 ºC' ta 1 dk, uzama 72 ºC' ta 1.5 dk, son uzama 72 ºC' ta 10 dk ve toplam 30 döngü olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen PCR ürünleri %0,8 (w/v) 'lik agaroz jelde yaklaşık 45 dk 80-110 V' ta yürütüldü. Jelde kullanılan uygun belirteçlerle (1Kb ve 100 bp DNA Ladder) yaklaşık 1500 baz çiftlik 16S rDNA bölgesinin elde edildiği görüldü ve her örnek için fotoğraflandı.

2.2.13.3 PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması ve 16S rDNA Bölgesinin Dizilendirilmesi ve Filogenetik Sınıflandırma

Elde edilen PCR ürünlerinden 50'şer µl ayrılarak mikrosantrifüj tüpleri içinde, soğuk zincirin bozulmamasına dikkat edilerek RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Şirketi' ne gönderildi. Burada PCR ürünleri saflaştırıldı (Macherey-Nagel Nucleo Spin Extract II kit). Bigdye Cycle Sequencing kit v.3.1 ile dizi analizi, (ABI 3130XL Genetic Analyzer) cihazında 27F YM (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA - 3' ve 1491R YM (5' –

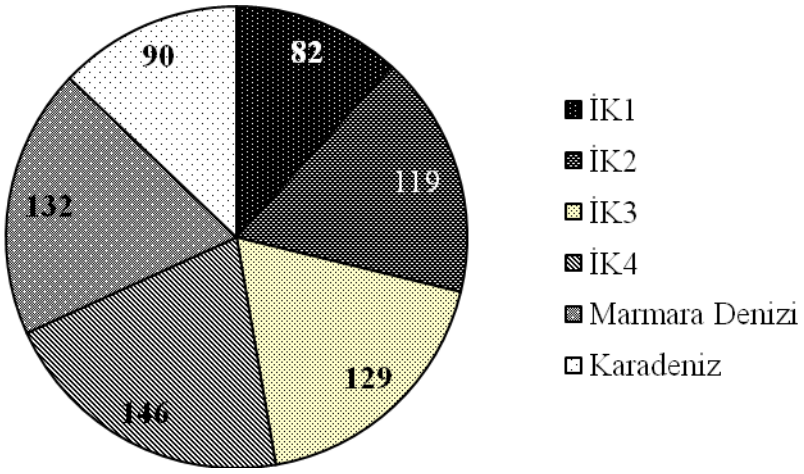
ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3') primerleri ile PCR' de elde edilen yaklaşık 1500 bç' lik DNA parçaları dizilendirildi. Dizi analiz ürünleri NaOAC-EtOH yöntemi ile saflaştırıldı.

Elde edilen dizilerin filogenetik analizi NCBI gen bankasındaki referans genomlarla ChromasPro Version1.5 kullanılarak BLASTN programı yardımı ile eşleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Deniz İzolatlarının Örnekleme Bölgelerine Göre Dağılımı

Bu doktora tezi kapsamında, İK 1. örneklemeden 82 adet, İK 2. örneklemeden 119 adet, İK 3. örneklemeden 129 adet ve İK 4. örneklemeden 146 adet, 132 adet M örneklemesinden, 90 adet K örneklemesinden olmak üzere toplam 698 adet bakteri izolatı elde edilmiştir. Elde edilen bakteri kültürü %80' lik saf gliserol içerisinde -20 ºC' ta (%33 final hacimde) derin dondurucuya kaldırılmışlardır.

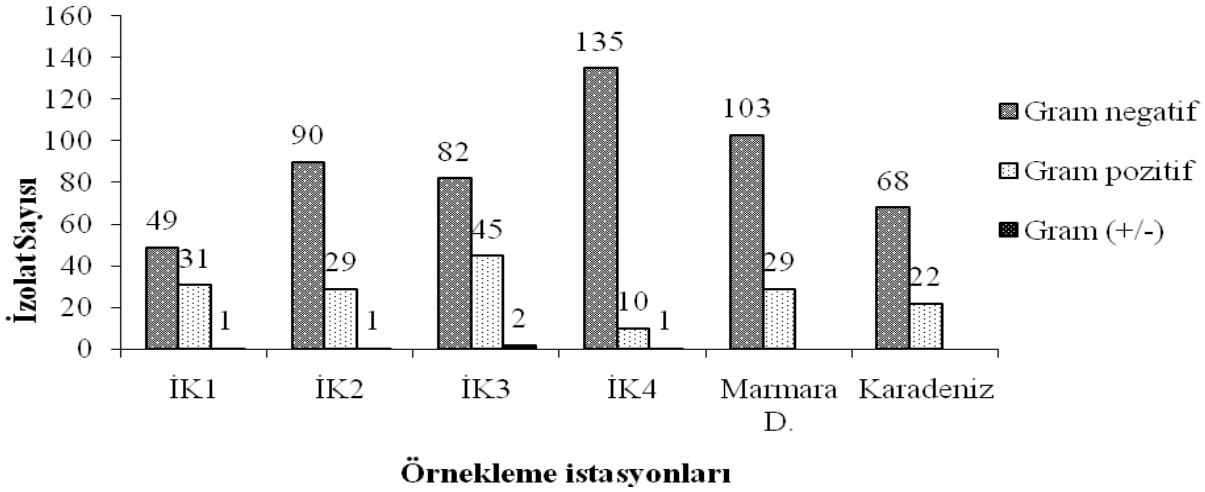


Şekil 3.1. Deniz izolatlarının örnekleme bölgelerine göre dağılımı.

3.2. İzolatların Ön Testlerine Ait Bulgular

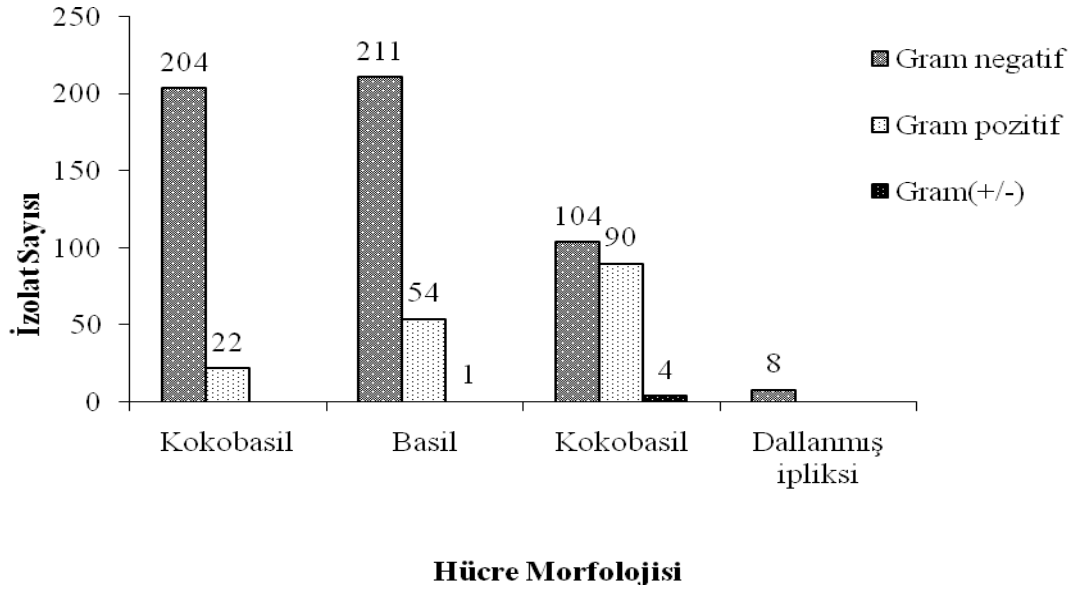
Adı geçen 698 adet izolatın tamamının temel mikrobiyolojik testlerinden 4'ü (koloni tekstürü, Gram Boyama, katalaz ve oksidaz testleri) tamamlanmıştır. Bu testlerin bir sonucu olarak elde edilen izolatlar içinde 49 adet İK 1'e, 90 adet İK 2' ye, 82 adet İK 3'e, 135 adet İK4' e, 68 adet K ve 103 adet M örneklemesine ait olmak üzere toplam 527 adet Gram negatif ve 31 adet İK 1'e, 29 adet İK 2' ye, 45 adet İK 3'e,10 adet İK4' e, 22 adet K ve 29 adet M örneklemesine ait olmak üzere

toplam 166 adet Gram pozitif, 5 adet de Gram değişken (+/-) saf bakteri kültürü tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İzolatların Gram boyama özelliklerine göre dağılımı.

Bu izolatların içinde Gram negatif kokobasil formuna 204 adet, basil formuna 211 adet, kok formuna da 104 adet olarak rastlanmıştır. Gram pozitif bakterilerde ise basil formu 54 adet, kok formu 90 adet, kokobasil formu da 22 adet olarak belirlenmiştir. Ayrıca Gr (+/-) 4 adet kok formu, 1 adet te basil formunda bakteri belirlenmiş, ek olarak da Gram negatif boyanan, bakteriler içinde sayılmış, dallanmış ipliksi çok iri hücrelerden oluşan 8 adet izolatta gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İzolatların hücre morfolojilerine göre dağılımı

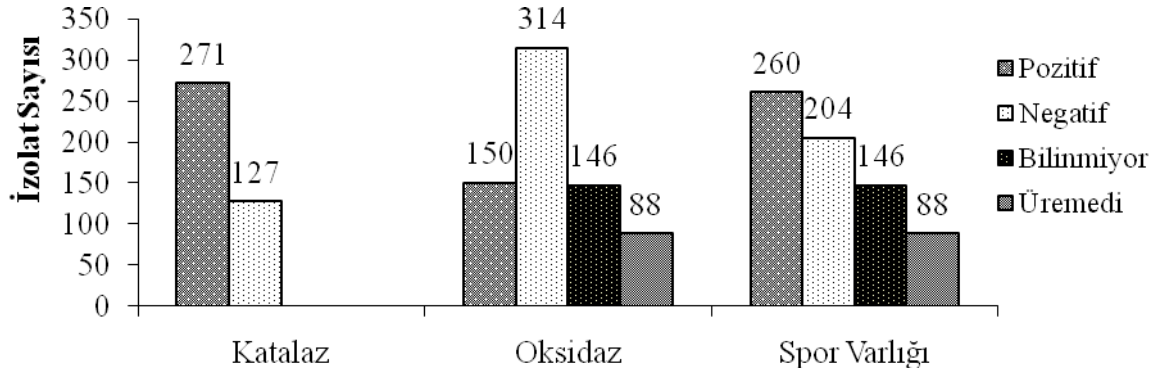
Çalışma boyunca yapılan örneklemelerden elde edilen izolatlar içerisinde sayıca Gram negatif izolatların ağırlıkta olması literatürlerle (Hutcheson ve arkadaşları 1999; Pujalte ve arkadaşları, 1999, Strohecker ve Sidie 1999) uyumlu olduğu görülmüştür.

Katalaz testi sonucunda ise 698 izolatın 127 tanesi katalaz (-) [52 tanesi +/– olmak üzere], 571 tanesi de çeşitli seviyelerde katalaz (+) olarak gözlenmiştir. Detayları burada açıklanmamış olan koloni tekstürleri ise oldukça farklı ve genelde birbirinden bağımsız çok sayıda görünüm arz etmiştir.

Oksidaz testine göre ise, 698 izolatın 150 tanesi oksidaz (+), 314 tanesi oksidaz (-) [15 tanesi (+/-) olmak üzere]' tir. Toplamda 146 tanesi test esnasında karışık bulunduğu için değerlendirmeye alınmamıştır ve buna ek olarak 88 tane izolat ise -20 ºC' taki derin dondurucu stoklarından yapılan ekimlerde üretememiştir.

Spor boyama testi sonuçlarına göre ise, tüm izolatların yapılan mikroskopi gözlemlerinde 260 tanesinde endospor varlığı gözlemlenmiş, 204 tanesinde endospor oluşumu tespit edilmemiş [45 tanesi (+/-) ve 17 tanesinde spor oluşumu

belirlenememiştir]' tir. Yukarıda da ifade edildiği gibi 146 izolat karışık olduğu, 88 izolat ise -20 ºC'ta ki derin dondurucu stoklarından yapılan ekimlerde üremediği için değerlendirme dışında tutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İzolatların katalaz, oksidaz testi sonuçları ve spor varlığı yönünden dağılımı.

3.3. Seçilmiş İzolatların Klasik Mikrobiyolojik Yöntemlerle Tür Düzeyinde Tanımlamasına Ait Bulgular

Tez çalışması kapsamında seçilen 53 bakteriye yapılan tüm testler sonucunda elde edilen verilerden her bir izolata özel (EK-1) çizelgeler oluşturulmuştur. Bu tablolara tüm testlerin sonuçları işlenmiştir. Ek olarak biyokimyasal test sonuçları gruplandırılmış ve çizelgeler halinde sunulmuştur (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6).

Çizelge 3.1. İzolatların büyüme ve koloni özellikleri, [İzolatlar oldukça farklı ve birbirinden bağımsız özellikler göstermiştir. Farklı bölgelerden alınan örnekler, farklı özellikler gösterdiği gibi (96 İK2, 235 İK3 vbg), benzer özellikler gösteren örneklerde görülmüştür (235 / İK3 ve 237 /İK3' te olduğu gibi). Bazen aynı bölgelerden izole edilen örnekler farklı hücre morfolojisi ve koloni özelliği gösterse de (A115 / M-1, A115 / M-2' de olduğu gibi), farklı koloni özelliklerinden dolayı farklı örnekler gibi düşünülen fakat benzer özellikler gösteren örnekler de vardır (406 /İK4-1, 406 /İK4-3' de olduğu gibi)].

İzolatın Adı	**İstasyon**	**Büyüme**		**Koloni görünümü**				
		24 saat	**48 saat**	**Rengi**	**Görünümü**	**Kenarı**	**Yüksekliği**	**Yüzeyi**
96 İK2	Orta-3/1	İyi	İyi	Sarımsı beyaz	Noktalı	-	Düz-yüksek	Dalgalı, parlak
235 İK3	İç/2	İyi	İyi	Mat beyaz	Düzensiz	Dalgalı	Düz-yüksek	Dalgalı
237 İK3	Orta-3/2	Orta / iyi	Orta / iyi	Mat beyaz	Düzensiz	Dalgalı	Düz, yüksek	Dalgalı
A115 / M-1	10m/2	İyi	İyi	Sarımsı, beyaz	Düzensiz	Dalgalı	Yüksek	Dalgalı
A115 / M-2	10m/2	İyi	İyi	Sarımsı, beyaz	Düzensiz	Dalgalı, loblu	Yüksek	Dalgalı, kıvrık
A118 / M-1	20m/3	İyi	İyi	Beyaz	Noktalı	Düz	Yüksek, konveks	Düz, parlak
A118 / M-2	20m/3	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz	Flamentli, dalgalı	Yüksek	Pürüzlü, dalgalı
257 / İK3-1	İç/2	İyi	İyi	Sarımsı beyaz	Düzensiz	Loblu, dalgalı	Yüksek	Dalgalı, kıvrık
257 / İK3-2	İç/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün, akışkan	Düz	Yüksek, konveks	Düz, parlak
42 / İK1-1	İç	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün akışkan	Dalgalı-düz	Yüksek, konveks	Düz parlak
42 / İK1-2	İç	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün akışkan	Düz	Konveks	Düz parlak
42 / İK1-3	İç	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün akışkan	Düz	Konveks	Düz parlak
43 İK1	Orta-3	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, dağınık	Loblu, flamentli	Yüksek, konveks	Pürüzlü
45 İK1	Orta-3/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, akışkan	Düz	Konveks	Düz, parlak
46 İK1	Dış-7	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, akışkan	Loblu, dalgalı	Konveks	Dalgalı, parlak
406 / İK4-1	Orta-3/1	İyi	İyi	Mat beyaz	Düzensiz, yayılan	Dalgalı, loblu	Konveks	Yünümsü, pürüzlü, mat

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.1.' in devamı

İzolatın Adı	İstasyon	Büyüme		Koloni görünümü				
		24 saat	48 saat	Rengi	Görünümü	Kenarı	Yüksekliği	Yüzeyi
406 / İK4-2	Orta-3/1	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün, akışkan	Dalgalı	Konveks	Dalgalı, parlak
406 / İK4-3	Orta-3/1	İyi	İyi	Mat beyaz	Düzensiz, yayılan	Dalgalı, loblu	Konveks	Yünümsü, pürüzlü, mat
A154 M	20m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, akışkan	Dalgalı	Konveks, yastıksı	Düz, parlak
A155 / M-1	20m/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün, akışkan	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü, parlak
A155 / M-2	20m/2	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, yayılan	Dalgalı, loblu	Yüksek	Yünümsü, pürüzlü
A156 M	20m/3	İyi	İyi	Beyaz	Pürüzlü, dalgalı	Loblu, dalgalı	Düz, yüksek	Yünümsü, pürüzlü, mat
421 İK4	İç/3	İyi	İyi	Sarı	Noktalı	-	Düz	Pürüzlü, noktalı
429 İK4	İç/3	İyi	İyi	Mat beyaz	Noktalı, yayılan	Flamentli, dalgalı,	Düz, yüksek	Pürüzlü
65 İK1	Orta-3	İyi	İyi	Beyaz	Dalgalı	Loblu, dalgalı	Yüksek, konveks	Dalgalı, pürüzlü, mat
301 / İK3-1	Orta-3/3	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, dağılan	Dalgalı	Yüksek	Pürüzlü, dalgalı
301 / İK3-2	Orta-3/3	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, dağılan	Dalgalı	Yüksek	Pürüzlü, dalgalı
447 İK4	Dış-7/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzenli, dağılan	Dalgalı	Yüksek	Dalgalı, parlak
171 İK2	Orta-3/1	İyi	İyi	Sarımsı beyaz	Dalgalı	Dalgalı, flamentli	Yüksek	Dalgalı, mat, yünümsü
181 İK2	Dış-7/2	İyi	İyi	Beyaz	Dalgalı, dağılan	Dalgalı	Yüksek	Yünümsü, mat, pürüzlü
461 İK4	Dış-7/1	İyi	İyi	Sarımsı, beyaz	Düzensiz, dağınık	Dalgalı, loblu	Konveks, yastıksı	Parlak, dalgalı
189 İK2	Dış-7/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Köksü, ipliksi	Flamentli	Yüksek	Dalgalı, pürüzlü
318 İK3	İç/3	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, dağınık	Loblu, dalgalı	Yüksek, konveks	Yünümsü, pürüzlü
193 / İK2-1	Orta-3/2	İyi	İyi	Beyaz, sarımsı	Noktalı	-	Düz, yüksek	Parlak, pürüzlü
193 / İK2-2	Orta-3/2	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz	Loblu, dalgalı	Yüksek	Pürüzlü, dalgalı, parlak
475 / İK4-1	Dış-7/2	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, köksü	Loblu, flamentli	Yüksek	Dalgalı, pürüzlü, mat

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.1.' in devamı

İzolatın Adı	İstasyon	Büyüme		Koloni görünümü				
		24 saat	48 saat	Rengi	Görünümü	Kenarı	Yüksekliği	Yüzeyi
332 İK3	Dış-7/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, dağılan	Loblu, dalgalı,	Yüksek, konveks	Dalgalı,
A27 / K-1	40m/1	İyi	İyi	Sarımsı beyaz	Düzgün, yayılan	Düz	Yüksek	Pürüzlü,
A31 / K-1	40m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, akışkan	Dalgalı	Konveks	Dalgalı,
A36 K	40m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, dağınık	Dalgalı	Yüksek, konveks	Düz,
A37 K	40m/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün	Düz	Yüksek, konveks	Düz,
A41 / K-2	30m	İyi	İyi	Limon sarısı	Noktalı	-	Yüksek	Kıvrık,
A73 / K-2	40m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün, akışkan	Dalgalı, loblu	Konveks	Dalgalı,
A73 / K-3	40m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün	Loblu, dalgalı	Konveks	Dalgalı,
A77 / K-1	40m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz, ipliksi	Loblu, flamentli	Yüksek	Kıvrık,
A78 / K-1	40m/2	İyi	İyi	Beyaz	Düzensiz	Loblu, dalgalı	Düz, yüksek	Pürüzlü,
A78 / K-2	40m/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzensiz	Loblu, dalgalı	Düz, yüksek	Pürüzlü,
A79 K	Dip/1	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düzgün	Düz	Yüksek	Düz,
A80 / K-1	Dip/2	İyi	İyi	Beyaz	Köksü, düzensiz,	Loblu, flamentli	Yüksek, konveks	Pürüzlü,
A80 / K-2	Dip/2	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Düz, dalgalı	Düz, dalgalı	Konveks, yastıksı	Dalgalı,
A106 / M-1	100m/1	İyi	İyi	Beyaz	Düzgün	Düz, dalgalı	Yüksek	Düz,
A125 M	20m/3	İyi	İyi	Yeşilimsi beyaz	Noktalı	-	Düz, yüksek	Pürüzlü,
A139 M	10m/3	Orta	Orta	Sarımsı, beyaz	Düzgün, dalgalı	Dalgalı, loblu	Yüksek, konveks	Pürüzlü,

Çizelge 3.2. İzolatların hücre şekli ve Gram, spor, lipit, kapsül boyama, oksidaz ve katalaz testi sonuçları, [İzolatların yukarıdaki çizelgede benzer özellikler gösterip sonrasında yapılan testlerde farklı özellikler göstermeleri çalışmada koloni ve mikroskopik olarak benzer özellik gösteren örneklerin birleştirilmeden incelenmesi fikrini güçlendirmiştir. Buna örnek olarak çizelge 3.2' deki 406 /İK4-1 ve 406 /İK4-3 katalaz testi sonuçları gösterilebilir].

İzolatın	Hücre şekli	Gram	Spor boyama	Katalaz	Oksidaz	Kapsül	Lipit Boyama
96 İK2	Basil	Gram (-)	+/C* sporlu	++	-	-	+
235 İK3	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
237 İK3	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	+?	-	+
A115 / M-1	Kok, kokobasil	Gram (-)	- sporsuz	++	-	-	-
A115 / M-2	Streptobasil	Gram (+)	+/C sporlu	+	+	-	+
A118 / M-1	Kok, kokobasil	Gram (-)	- sporsuz	++	-	-	-
A118 / M-2	Basil, kok	Gram (+)	+/C sporlu	++	+	-	+
257 / İK3-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+++	+?	-	+
257 / İK3-2	Kok-kokobasil	Gram (-)	- sporsuz	+++	-	-	-
42 / İK1-1	Kok-kokobasil	Gram (-)	- sporsuz	++	-	-	-
42 / İK1-2	Kok-diplokok	Gram (-)	+/C sporlu	+++	-	-	-
42 / İK1-3	Kok-kokobasil	Gram (-)	- sporsuz	+++	-	-	+
43 İK1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
45 İK1	Kok, Kokobasil	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	+
46 İK1	Kok	Gram (-)	- sporsuz	+	-	-	-
406 / İK4-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
406 / İK4-2	Kok	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	-
406 / İK4-3	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.2’ nin devamı

İzolatın Adı	Hücre şekli	Gram	Spor boyama	Katalaz	Oksidaz	Kapsül	Lipit Boyama
A154 M	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+ zayıf	-	-	+/-
A155 / M-1	Kok	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	-
A155 / M-2	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
A156 M	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
421 İK4	Basil	Gram (-)	- sporsuz	+	+	-	-
429 İK4	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
65 İK1	Basil	Gram (-)	+/C sporlu	++	+	-	-
301 / İK3-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
301 / İK3-2	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
447 İK4	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
171 İK2	Basil (streptobasil)	Gram (+)	+/C sporlu	++++	-	-	+
181 İK2	Basil (streptobasil)	Gram (+)	+/C sporlu	+++	-	-	+
461 İK4	Vibriobasil	Gram (-)	+/C sporlu	+	+	-	+/-
189 İK2	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
318 İK3	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+++	-	-	+
193 / İK2-1	Kok	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	-
193 / İK2-2	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
475 / İK4-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+++	-	-	+
332 İK3	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
A27 / K-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	+	-	-	+
A31 / K-1	Kok, kokobasil	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	-
A36 K	Kok (stafilokok)	Gram (-)	(-) sporsuz	+++	-	-	-

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.2' nin devamı

İzolatın Adı	Hücre şekli	Gram	Spor boyama	Katalaz	Oksidaz	Kapsül	Lipit Boyama
A37 K	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	++++	-	-	-
A41 / K-2	Kok (sarsina)	Gram (-)	(-) sporsuz	+	-	-	-
A73 / K-2	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+	-	-	-
A73 / K-3	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	-
A77 / K-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
A78 / K-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
A78 / K-2	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	++	-	-	-
A79 K	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+	-	-	-
A80 / K-1	Basil	Gram (+)	+/C sporlu	++	-	-	+
A80 / K-2	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+++	-	-	+
A106 / M-1	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+	-	-	+/-
A125 M	Kok, kokobasil	Gram (-)	+/C sporlu	+++	-	-	+
A139 M	Kok (stafilokok)	Gram (-)	+/C sporlu	+++	-	-	+

*C=(Central) Merkezi konumlanmış spor

Çizelge 3.3. Dekarboksilaz, Denitrifikasyon ve O/F testi sonuçları, [Klasik tanımlama için farklı testlere devam edilmiştir].

İzolatın Adı	Dekarboksilaz testi		Denitrifikasyon Testi		O/F Testi			%10 tuzlulukta büyüme özelliği	
	AD.	LD.	Nitratı nitrite indirgeme	N_2 Gaz oluşumu	Aerop	Fakültatif anaerop	Inert (etkisiz)	24sa**	48 sa
96 İK2	R.V.*	-	+	-	-	-	+	+/-	-
235 İK3	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
237 İK3	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
A115 / M-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	+/-	+/-
A115 / M-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
A118 / M-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	+/-	-
A118 / M-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
257 / İK3-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
257 / İK3-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	+/-	-
42 / İK1-1	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
42 / İK1-2	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
42 / İK1-3	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
43 İK1	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
45 İK1	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
46 İK1	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
406 / İK4-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
406 / İK4-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
406 / İK4-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-

A.D.=Arjinin dekarboksilaz; L.D.=Lizin dekarboksilaz; *R.V.= Reaksiyon vermedi; **sa=saat; ($+^z$)=zayıf üreme; ($+^y$)=yoğun üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (+)=üreme var; (-)=üreme yok

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.3.' ün devamı

İzolatın Adı	Dekarboksilaz testi		Denitrifikasyon Testi		O/F Testi			%10 tuzlulukta büyüme özelliği	
	AD.	LD.	Nitratı nitrite indirgeme	N_2 Gaz oluşumu	Aerop	Fakültatif anaerop	Inert (etkisiz)	24 sa**	48 sa
A154 M	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
A155 / M-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A155 / M-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
A156 M	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
421 İK4	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
429 İK4	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
65 İK1	R.V.	R.V.	+	-	-	-	+	+/-	-
301 / İK3-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
301 / İK3-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
447 İK4	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
171 İK2	R.V.	-	+	-	-	-	+	+/-	-
181 İK2	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
461 İK4	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
189 İK2	-	-	+	-	-	-	+	+/-	-
318 İK3	+	-	+	-	-	-	+	$+^z$	$+^z$
193 / İK2-	R.V.	-	+	-	-	+	-	$+^y$	$+^y$
193 / İK2-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
475 / İK4-	R.V.	R.V.	+	-	-	-	+	+/-	-
332 İK3	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-

A.D.=Arjinin dekarboksilaz; L.D.=Lizin dekarboksilaz; *R.V.= Reaksiyon vermedi; **sa=saat; ($+^z$)=zayıf üremeü; ($+^y$)=yoğun üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (+)=üreme var; (-)=üreme yok

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.3.' ün devamı

İzolatın Adı	Dekarboksilaz testi		Denitrifikasyon Testi		O/F Testi			%10 tuzlulukta büyüme özelliği	
	AD.	LD.	Nitratı nitrite indirgeme	N_2 Gaz oluşumu	Aerop	Fakültatif anaerop	Inert (etkisiz)	24 sa**	48 sa
A27 / K-1	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-
A31 / K-1	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A36 K	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A37 K	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
A41 / K-2	R.V.	R.V.	+	-	-	-	+	$+^y$	$+^y$
A73 / K-2	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A73 / K-3	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	+	+
A77 / K-1	+	-	+	-	-	-	+	+/-	+/-
A78 / K-1	+	-	+	-	-	-	+	+/-	+/-
A 78 / K-2	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	+/-	+/-
A79 K	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
A80 / K-1	+	-	+	-	-	-	+	$+^z$	$+^z$
A80 / K-2	R.V.	R.V.	+	-	+	-	-	$+^z$	$+^z$
A106 / M-	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A125 M	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$
A139 M	R.V.	R.V.	+	-	-	+	-	$+^z$	$+^z$

A.D.=Arjinin dekarboksilaz; L.D.=Lizin dekarboksilaz; *R.V.= Reaksiyon vermedi; **sa=saat; ($+^z$)=zayıf üreme; ($+^y$)=yoğun üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (+)=üreme var; (-)=üreme yok

Çizelge 3.4. Karbonhidrat kullanımı testi sonuçları [11 farklı şeker için yapılan bu test 24 ve 48 saat olarak ve glukozdan gaz üretimini içine alacak şekilde yapılmıştır].

İzolatın Adı	Karbonhidrat kullanımı																							
	Glukoz		G.G.O.*		Sukroz		Sorbitol		Mannitol		Ksiloz		Arabinoz		Mannoz		Sellobiyoz		Trehaloz		Galaktoz		Fruktoz	
	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa
96 İK2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	+/-	+
235 İK3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	+	+
237 İK3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	+	+
A115 / M-1	+[z]	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A115 / M-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
A118 / M-1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+[z]	+	+	+	-	+
A118 / M-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
257 / İK3-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
257 / İK3-2	+[z]	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
42 / İK1-1	+[z]	+[z]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
42 / İK1-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
42 / İK1-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
43 İK1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
45 İK1	+[z]	+[z]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
46 İK1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
406 / İK4-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
406 / İK4-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
406 / İK4-3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

*.G G.O.=glukozdan gaz oluşumu ; sa= saat

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.4.' ün devamı

İzolatın Adı	Karbonhidrat kullanımı																							
	Glukoz		G. G. O.*		Sukroz		Sorbitol		Mannitol		Ksiloz		Arabinoz		Mannoz		Sellobiyoz		Trehaloz		Galaktoz		Fruktoz	
	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa
A154 M	+z	+z	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
A155 / M-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A155 / M-2	+z	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
A156 M	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
421 İK4	+z	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
429 İK4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+/-	+	+	-	-	+	+
65 İK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
301 / İK3-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
301 / İK3-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
447 İK4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
171 İK2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
181 İK2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+/-	+	+	-	-	+	+
461 İK4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
189 İK2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+z	+	+	+/-	-	+/-	-
318 İK3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
193 / İK2-1	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
193 / İK2-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+z	+	+	-	-	+z	+	-	-	+	+	-	-	+	+
475 / İK4-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

*.G G.O.=glukozdan gaz oluşumu ; sa= saat

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.4.' ün devamı

İzolatın Adı	Karbonhidrat kullanımı																							
	Glukoz		G.G.O.*		Sukroz		Sorbitol		Mannitol		Ksiloz		Arabinoz		Mannoz		Sellobiyoz		Trehaloz		Galaktoz		Fruktoz	
	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa
332 İK3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
A27 / K-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	+	+
A31 / K-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+[z]	-	-
A36 K	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
A37 K	+[z]	+[z]	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+/-	+	-	+
A41 / K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A73 / K-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-
A73 / K-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-
A77 / K-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	+	+
A78 / K-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+/-	-	+	+
A78 / K-2	+[z]	+[z]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A79 K	+[z]	+[z]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A80 / K-1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
A80 / K-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A106 / M-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A125 M	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A139 M	+[z]	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

*G.G.O.=glukozdan gaz oluşumu; sa=saat

Çizelge 3.5. TSI agar, Hareketlilik, Hemoliz ve IMVIC testi sonuçları, [benzer şekilde diğer tanımlama testlerine devam edilmiştir].

İzolatın Adı	TSI Agar Testi					Hareketlilik Testi		Hemoliz Testi	IMVIC testi			
	Glukoz	Sukroz	Laktoz	H_2S Oluşumu	Gaz oluşumu	24 saat	48 saat	Hemoliz Türü	İndol	MR	VP	Sitrat
96 İK2	+	+	+	-	-	-	-	γ*	-	-	-	-
235 İK3	+	+	+	-	-	+	+	α**	-	+	+	-
237 İK3	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
A115 / M-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A115 / M-2	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
A118 / M-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A118 / M-2	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
257 / İK3-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
257 / İK3-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
42 / İK1-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
42 / İK1-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
42 / İK1-3	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
43 İK1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	-
45 İK1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
46 İK1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
406 / İK4-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	$+^z$
406 / İK4-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+

MR= (Methyl red) Metil kırmızısı; VP=Voges Proskauer; * γ =gama hemoliz; ** α = alfa hemoliz; ($+^z$)=zayıf üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (-)=üreme veya hareketlilik yok

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.5.' in devamı

İzolatın Adı	TSI Agar Testi					Hareketlilik testi		Hemoliz Testi	IMVIC testi			
	Glukoz	Sukroz	Laktoz	H_2S Oluşumu	Gaz oluşumu	24 saat	48 saat	Hemoliz Türü	İndol	MR	VP	Sitrat
406 / İK4-3	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	$+^z$
A154 M	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A155 / M-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A155 / M-2	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	-
A156 M	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	$+^z$
421 İK4	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
429 İK4	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	$+^z$
65 İK1	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
301 / İK3-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
301 / İK3-2	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
447 İK4	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
171 İK2	+	+	+	-	-	$+^z$	$+^z$	α	-	+	-	-
181 İK2	+	-	-	-	-	$+^z$	$+^z$	α	-	+	-	-
461 İK4	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
189 İK2	+	-	-	-	-	+	+	α	-	+	+	-
318 İK3	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	-
193 / İK2-1	+	-	-	-	-	-	-	γ	-	+	-	-
193 / İK2-2	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
475 / İK4-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
332 İK3	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+

MR= (Methyl red) Metil kırmızısı; VP=Voges Proskauer; * γ =gama hemoliz; ** α = alfa hemoliz; ($+^z$)=zayıf üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (-)=üreme veya hareketlilik yok

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.5.' in devamı

İzolatın Adı	TSI Agar Testi					Hareketlilik		Hemoliz Testi	IMVIC testi			
	Glukoz	Sukroz	Laktoz	H_2S Oluşumu	Gaz oluşumu	24 saat	48 saat	Hemoliz Türü	İndol	MR	VP	Sitrat
A27 / K-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	+	-
A31 / K-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A36 K	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A37 K	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A41 / K-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	-
A73 / K-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	+	-	+
A73 / K-3	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A77 / K-1	+	+/-	+/-	-	-	+	+	α	-	+	-	+
A78 / K-1	+	+/-	+/-	-	-	+	+	α	-	+	-	-
A78 / K-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A79 K	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A80 / K-1	+	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	+
A80 / K-2	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	+	-	+
A106 / M-1	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A125 M	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+
A139 M	-	-	-	-	-	-	-	γ	-	-	-	+

MR= (Methyl red) Metil kırmızısı; VP=Voges Proskauer; * γ =gama hemoliz; ** α = alfa hemoliz; ($+^z$)=zayıf üreme; (+/-)=şüpheli üreme; (-)=üreme veya hareketlilik yok

Çizelge 3.6. Jelatin, nişasta, lipit, protein selüloz hidrolizi testi sonuçları

İzolatın Adı	Jelatini Sıvılaştırm	Nişasta Hidrolizi	Lipit Hidrolizi	Protein Hidrolizi	Selüloz Hidrolizi
96 İK2	Tabakalı, +	+	-	+	-
235 İK3	Tabakalı, +	+	-	+	-
237 İK3	Tabakalı, +	+	-	+	-
A115 / M-1	-	-	-	-	-
A115 / M-2	Tabakalı, +	+	-	+	-
A118 / M-1	-	-	-	-	-
A118 / M-2	Tabakalı, +	+	-	+	-
257 / İK3-1	Tabakalı, +	+	-	+	+
257 / İK3-2	-	-	-	-	-
42 / İK1-1	-	-	-	-	-
42 / İK1-2	-	-	-	-	-
42 / İK1-3	-	-	-	-	-
43 İK1	Tabakalı, +	+	-	+	-
45 İK1	-	-	-	-	-
46 İK1	-	-	-	+	+
406 / İK4-1	Tabakalı, +	+	-	+	-
406 / İK4-2	-	-	-	-	-
406 / İK4-3	Tabakalı, +	+	-	+	-
A154 M	-	-	-	-	-
A155 / M-1	-	-	-	-	-
A155 / M-2	Tabakalı, +	+	-	+	-
A156 M	Tabakalı, +	+	-	+	-
421 İK4	-	-	-	-	-
429 İK4	Tabakalı, +	+	-	+	+
65 İK1	Üremedi	-	-	-	-
301 / İK3-1	Tabakalı,+	+	-	+	-
301 / İK3-2	Tabakalı, +	+	-	+	-
447 İK4	Tabakalı, +	+	-	+	-
171 İK2	Tabakalı, +	+	-	+	-
181 İK2	Tabakalı, +	+	-	+	-
461 İK4	-	-	-	-	-
189 İK2	Tamamı sıvı,	+	-	+	-
318 İK3	Tabakalı, +	+	-	+	+
193 / İK2-1	Üremedi	-	-	-	-
193 / İK2-2	Tabakalı, +	+	-	+	-
475 / İK4-1	Tabakalı, +	+	-	+	+
332 İK3	Tabakalı, +	+	-	+	+
A27 / K-1	Tabakalı, +	+	-	+	+
A31 / K-1	Tamamı sıvı,	+	-	+	-

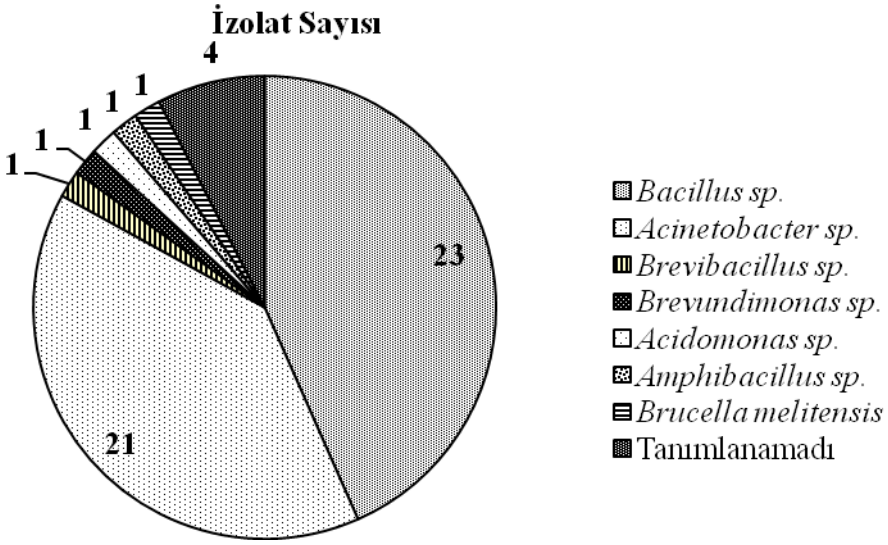
Devamı arka sayfada

Çizelge 3.6.' nın devamı

İzolatın Adı	Jelatini Sıvılaştırma	Nişasta Hidroli	Lipit Hidrolizi	Protein Hidrolizi	Selüloz Hidrolizi
A36 K	Tamamı sıvı, +	-	-	+	-
A37 K	Tamamı sıvı, +	-	-	+	-
A41 / K-2	Üremedi	-	-	+	-
A73 / K-2	Tamamı sıvı, +	-	-	+	-
A73 / K-3	Tamamı sıvı, +	-	-	+	-
A77 / K-1	Tabakalı ,+	+	-	+	+
A78 / K-1	Tabakalı, +	+	-	+	+
A78 / K-2	Tabakalı, +	-	-	+	-
A79 K	Tabakalı, +	-	-	-	-
A80 / K-1	Tabakalı, +	+	-	+	+
A80 / K-2	-	-	-	-	-
A106 / M-1	-	-	-	-	-
A125 M	-	-	-	-	-
A139 M	-	-	-	-	-

Elde edilen veriler ışığında sonuçlar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referans kitabı (Claus ve Berkeley, 1984) ile değerlendirilmiştir. Tür düzeyinde belirleme kullanılan kitabın 1984 basımı olması (25 yıllık) ve yeni ve/veya dijital kopyalarına ulaşılamaması nedeniyle eldeki veriler ışığında gerçekleştirilmiştir.

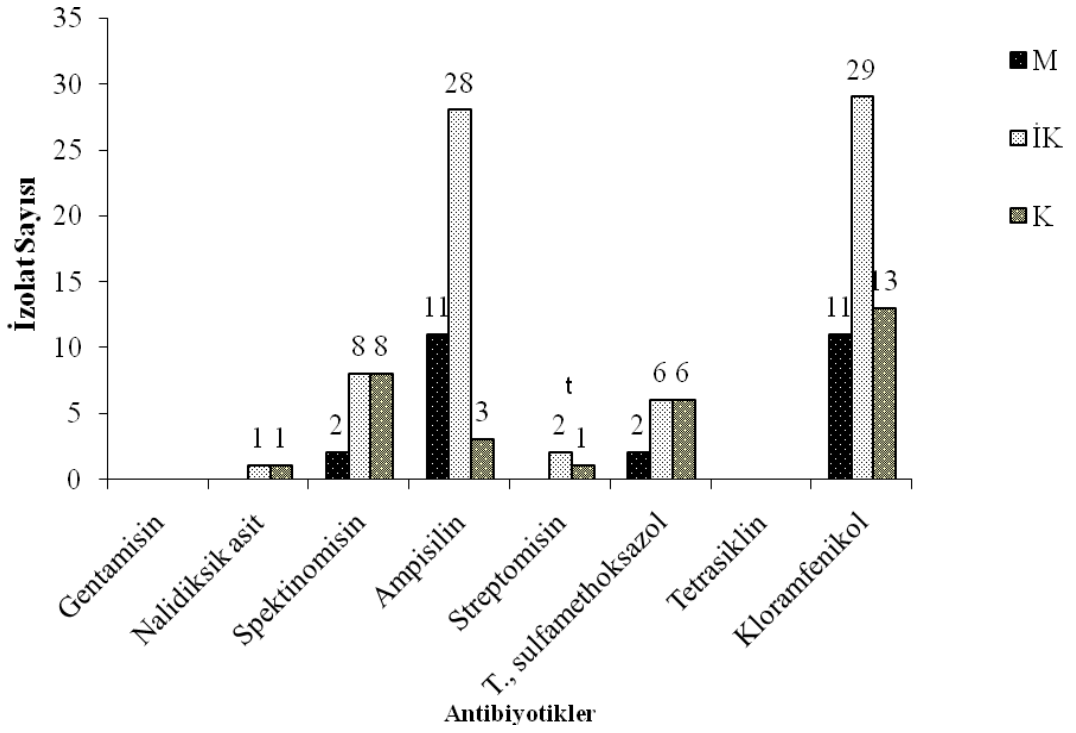
Buna göre elde edilen sonuçları özetlemek gerekirse; 23 bakteri örneği *Bacillus sp.*, 21 tane bakteri örneği *Acinetobacter sp.*, 1' er bakteri örneği ise *Brevibacillus sp.*, *Brevundimonas sp., Acidomonas sp.*, *Amphibacillus sp.* olarak cins düzeyinde ve *Brucella melitensis* olarak tür düzeyinde belirlenmiştir. 4 bakteri örneği ise tanımlanamamıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Klasik tanımlama sonuçlarının cinslere göre dağılımı.

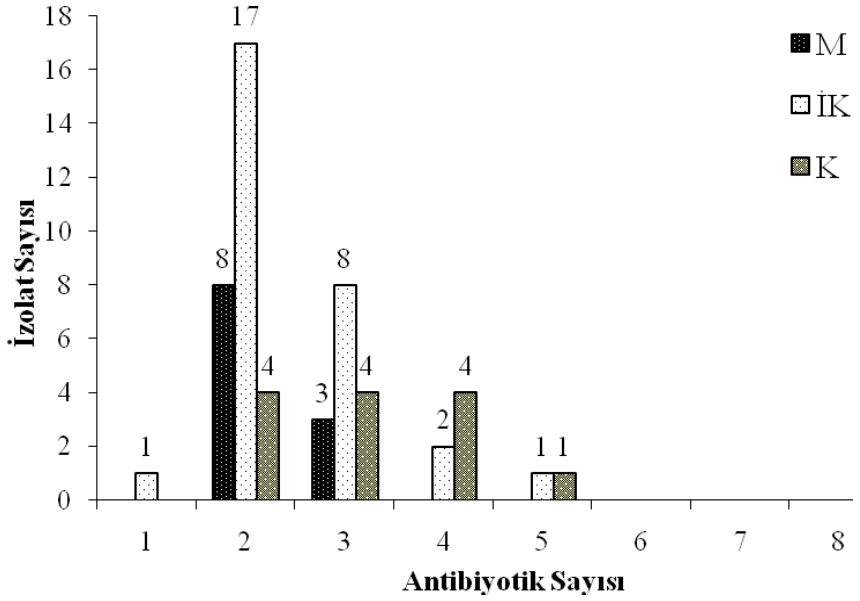
3.3.1. Antibiyotik Dirençliliklerine Göre Seçilmiş İzolatların Dağılımı

Antibiyotik dirençlilikleri yönünden tüm izolatlar, nalidiksik asit (Na^{30}), spektinomisin ($Se^{10\ \ 0}$), ampisilin (A^{10}), streptomisin (S^{10}), trimentoprim-sulfamethoksazol (Co^{25}) ve kloramfenikol (C^{30})' a çeşitli oranlarda direnç göstermişlerdir (Şekil 3.1). Seçilmiş izolatlar en fazla kloramfenikole direnç göstermiştir. Bunu sırası ile ampisilin, spektinomisin, trimentoprim-sulfamethoksazol, streptomisin ve nalidiksik asit takip etmiştir. Gentamisin ve tetrasikline, örnek toplama bölgelerine bakılmaksızın izolatların tamamı duyarlı olarak gözlenmiştir. Şekil 3.6' da da görüleceği gibi, İzmit Körfezi ve Karadeniz izolatları Marmara Denizi izolatlarına göre spektinomisin, streptomisin ve trimentop rim-sulfamethoksazol' e oldukça dirençlidirler. Marmara Denizi izolatlarının tamamı ise nalidiksik asit ve streptomisine ek olarak gentamisin ve tetrasikline de duyarlıdırlar.



Şekil 3.6. İzmit Körfezi, Boğazın Marmara ve Karadeniz girişinden gelen antibiyotiklere dirençli izolatların sayısı ve dağılımı (M=Marmara Denizi, K=Karadeniz, İK= İzmit Körfezi).

Şekil 3.7' de görüldüğü gibi Marmara Denizi ve İzmit Körfezi izolatları ağırlıklı olarak 2 antibiyotiğe [8 izolat (%72,2) ve 17 izolat (%58,6)] dirençli iken, Karadeniz izolatlarının % 36,7' si 4 antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. İzmit Körfezi ve Karadeniz izolatları 5 antibiyotiğe kadar direnç gösterirken Marmara Denizi izolatları 3 veya daha az antibiyotiğe direnç göstermiştir.



Şekil 3.7. İzmit Körfezi, Boğazın Marmara ve Karadeniz girişinden gelen çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren izolatların sayısı ve dağılımı (M=Marmara Denizi, K=Karadeniz, İK= İzmit Körfezi).

Seçilmiş izolatlarda antibiyotik dirençliliğinin ortaya konması, doktora çalışması kapsamında örnek toplama bölgesinde adı geçen antibiyotiklerin nadir ya da yaygın kullanılıp kullanılmadığını ortaya çıkarmak üzere örneklerimizin MAR indeksinin hesaplanmasına da olanak sağlamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki İzmit Körfezi' nden gelen izolatların MAR indeksi 0,125 -0,625 arasında değişirken, Karadeniz' den gelen izolatlarınki 0,250-0,625 arasında bulunmuştur. Marmara Denizi örnekleri ise 0,250-0,375 arasında değerlere sahip oldukları görülmüştür (Çizelge 3.7).

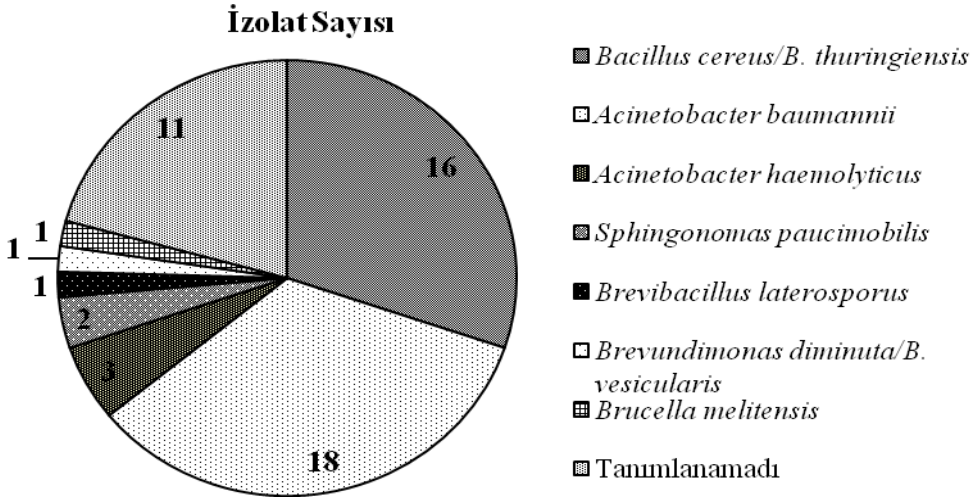
Çizelge 3.7. Seçilmiş izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve MAR indeks değerlerinin hesaplanması (a= İzolatın Direnç gösterdiği antibiyotik sayısı; b=antibiyotik sayısı=8; a/b=MAR indeks değeri).

İzolat No:	**Gm^{10}**	**Na^{30}**	**Se^{100}**	**A^{10}**	**S^{10}**	**Co^{25}**	**T^{30}**	**C^{30}**	**a**	**a/b**
42 / İK1-1	S	I	I	R	I	I	S	R	2	0,25
42 / İK1-2	S	I	S	R	S	I	S	R	2	0,25
42 / İK1-3	S	I	S	R	S	I	S	R	2	0,25
43 İK1	S	S	S	R	S	I	S	R	2	0,25
45 İK1	S	S	S	R	S	I	S	R	2	0,25
46 İK1	S	S	I	R	S	I	S	R	2	0,25
65 İK1	S	R	S	R	S	S	S	R	3	0,375
96 İK2	S	S	S	I	S	S	S	R	1	0,125
171 İK2	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
181 İK2	S	S	R	R	S	I	S	R	3	0,375
189 İK2	S	I	S	R	S	R	S	R	2	0,25
193 / İK2-1	S	I	R	R	R	S	S	R	4	0,5
193 / İK2-2	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
235 İK3	S	S	I	R	S	I	S	R	2	0,25
237 İK3	S	S	R	R	S	S	S	R	3	0,375
257 / İK3-1	S	S	I	R	S	I	S	R	2	0,25
257 / İK3-2	S	I	R	R	S	I	S	R	3	0,375
301 / İK3-1	S	S	S	R	S	S	S	R	2	0,25
301 / İK3-2	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
318 İK3	S	I	I	R	S	R	S	R	3	0,375
332 İK3	S	I	R	R	S	R	S	R	4	0,5
406 / İK4-1	S	I	I	R	S	R	I	R	3	0,375
406 / İK4-2	S	I	R	R	S	I	S	R	3	0,375
406 / İK4-3	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
421 İK4	I	S	R	R	R	R	S	R	5	0,625
429 İK4	S	S	S	R	S	S	S	R	2	0,25
447 İK4	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
461 İK4	S	I	R	R	I	I	S	R	3	0,375
475 / İK4-1	S	I	I	R	S	R	I	R	2	0,25
A27 / K-1	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
A31 / K-1	I	S	R	R	I	R	S	R	4	0,5
A36 K	I	I	R	R	R	R	I	R	5	0,625
A37 K	I	S	R	R	I	I	S	R	3	0,375
A41 / K-2	S	R	S	S	S	I	S	R	2	0,25
A73 / K-2	I	I	R	R	I	R	I	R	4	0,5
A73 / K-3	S	I	R	R	I	R	I	R	4	0,5
A77 / K-1	S	I	S	R	S	S	S	R	2	0,25
A78 / K-2	I	I	R	R	I	R	I	R	4	0,5
A79 K	S	I	R	R	I	I	S	R	3	0,375
A80 / K-1	S	I	R	R	S	I	S	R	3	0,375
A80 / K-2	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
A106 / M-1	S	S	I	R	S	I	S	R	2	0,25
A115 / M-1	S	I	S	R	S	I	S	R	2	0,25
A115 / M-2	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
A118 / M-1	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
A118 / M-2	S	S	I	R	S	S	S	R	2	0,25
A125 M	S	S	R	R	S	I	S	R	3	0,375
A139 M	S	I	R	R	S	I	S	R	3	0,375
A154 M	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
A155 / M-1	S	I	I	R	S	I	S	R	2	0,25
A155 / M-2	S	I	I	R	S	R	S	R	2	0,25

İzmit Körfezi izolatlarından en düşük MAR indeksi değerine 0,125 ile 1 izolat (*Sphingomonas paucimobilis)* sahip olmasına rağmen diğer İzmit Körfezi örneklerinin büyük bir çoğunluğunun MAR indeksleri 0,250 ve 0,625 arasında değişmektedir. Seçilmiş 53 izolatın 52' si 0,2 sınır MAR indeks değerini geçmiştir. Bu sonuçlarda göstermektedir ki, bu izolatlar izole edildikleri denize bakılmaksızın yaygın antibiyotik kullanımı olduğundan insan ve hayvan sağlığı için ciddi bir risk kaynağı oluşturmaktadırlar.

3.4. İzolatların Otomatik Tanımlama Sistemi ile Tür Düzeyinde Tanımlanmasına Ait Bulgular

Vitek 2 Otomatik Tanımlama Sistemi ile 53 bakteri örneğinden 16 tanesi, *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*, 18 tanesi *Acinetobacter baumannii*, 3 tanesi *Acinetobacter haemolyticus,* 2 tanesi *Sphingomonas paucimobilis* 1' er tanesi de *Brevibacillus laterosporus*, *Brevundimonas diminuta / Brevundimonas vesicularis*, *Brucella melitensis* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.8). 11 bakteri örneği ise Vitek 2 Otomatik Tanımlama Sistemi tarafından tanımlanamamıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemine göre izolatların dağılımı.

Çizelge 3.8. Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemine göre tür seviyesinde tanımlanmış izolatlar.

İz. No	İzolatın adı	Vitek tanısı	Yüzdesi *	Özelliği
1	96/İK1	*Sphingomonas paucimobilis*	% 91	Gellan sentezliyor (Bir tür zamk)
2	235/İK3	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
3	237/İK3	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
4	A115/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
5	A115/M-2	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 88	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
6	A118/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
7	A118/M-2	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 88	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
8	257/İK3-1	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
9	257/İK3-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
10	42/İK1-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
11	42/İK1-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
12	42/İK1-3	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
13	43/İK1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
14	45/İK1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
15	46/İK1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
16	406/İK4-1	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 86	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
17	406/İK4-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
18	406/İK4-3	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 90	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
19	A154/M	*Acinetobacter haemolyticus*	% 94	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
20	A155/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
21	A155/M-2	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 90	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
22	A156/M	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 86	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
23	421/İK4	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.8' in devamı

İz. No	İzolatın adı	Vitek tanısı	Yüzdesi *	Özelliği
24	429/İK4	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	%86	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
25	65/İK1	*Sphingomonas paucimobilis*	% 89	Gellan sentezliyor
26	301/İK3-1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
27	301/İK3-2	*Brevibacillus laterosporus*	% 85	*Aedes aegypti, Anophales stephani, Culex pipiens* sivrisinek larvalarını öldürerek biyokontrolde kullanılıyor
28	447/İK4	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
29	171/İK2	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
30	181/İK2	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
31	461/İK4	*Brevundimonas diminuta / B.vesicularis*	% 99	Endüstride su filtrelerinin kalitelerinin belirlenmesinde kullanılıyor. Normal bakterinin 1/3'ü boyunda
32	189/İK2	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
33	318/İK3	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
34	193/İK2-1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
35	193/İK2-2	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
36	475/İK4-1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
37	332/İK3	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
38	A27/K-1	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
39	A31/K-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
40	A36/K	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
41	A37/K	*Acinetobacter haemolyticus*	% 93	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
42	A41/K-2	*Brucella melitensis*	% 91	Koyun ve keçilerde Brusellöz yapıyor bazen insana bulaşıyor
43	A73/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
44	A73/K-3	*Acinetobacter haemolyticus*	% 98	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
45	A77/K-1	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.8' in devamı

İz. No	İzolatın adı	Vitek tanısı	Yüzdesi *	Özelliği
46	A78/K-1	*Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*	% 85	Toksin üreten, sporlu, çoğunlukla toprakta bulunan basil türleri
47	A78/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
48	A79/K	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
49	A80/K-1	**TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)**		
50	A80/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
51	A106/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 98	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
52	A125/M	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni
53	A139/M	*Acinetobacter baumannii*	% 99	Çoklu antibiyotik direncine sahip fırsatçı patojen / hastane enfeksiyonu etkeni

*Mükemmel tanımlama (Excellent identification) % 96-99, çok iyi tanımlama (Very good identification) % 92-95, iyi tanımlama (Good identification) % 89-91, kabul edilebilir tanımlama (Acceptable identification) % 85-88

Seçilmiş ve Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanmış 53 izolatın izole edildikleri noktalarına ve derinliklerine göre dağılımı incelendiğinde (Çizelge 3.9), *Acinetobacter baumannii* izolatlarının İzmit Körfezi Dış istasyonu ve Karadeniz 30 m örneği hariç diğer tüm örnekeleme bölgelerinden ve derinliklerinden izole edilmiştir. Burada 100 m ile en derin örnek alma bölgesi olan Marmara Denizi' nden izole edilen tek izolatın *A. baumannii* olması dikkat çekicidir.

Bacillus cereus / *B. thuringiensis* izolatları incelendiğinde, bu izolatların genelde 10 ile 40 m arasındaki derinliklerden izole edildiği görülmektedir. Bu izolatlar Karadeniz örneklemesinde 40 m dışındaki derinliklerden izole edilmemiştir.

Acinetobacter haemolyticus izolatları ise İzmit Körfezi örneklemeleri dışında, 1 adet Marmara Denizi 20 m örneklemesinden, 2 adet te Karadeniz 40 m örneklemesinden izole edilmiştir.

Sphingonomas paucimobilis izolatları, sadece İzmit Körfezi Orta ve Dış örnekleme istasyonlarından sadece 1' er adet olarak, *Brucella melitensis* izolatı Karadeniz 30 m örneklemesinden, *Brevundimonas diminuta* / *B. vesicularis* izolatı İzmit Körfezi Dış örneklemesinden, *Brevibacillus laterosporus* ise İzmit Körfezi Orta örnekleme istasyonundan izole edilmişlerdir.

Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanamamış 11 izolatın izolasyon nokta ve derinlikleri ise İzmit Körfezi' nde (1 adet İç Körfez 22 m derinlikten, 4 adet Orta Körfez 35 m derinlikten, 5 adet ise Dış Körfez 44 m derinlikten) yoğunlaşmış olup Karadeniz 44 m örneklemesinden sadece 1 adet izole (A80 K-1 izolatı) edildiği görülmektedir.

Çizelge 3.9. Örnekleme istasyonları ve derinliklerine göre Vitek 2 ile tanımlanmış ve tanımlanmamış izolatların dağılımı.

İstasyon adı		*A. baumannii*	*B. cereus/ B. thuringiensis*	*A. haemolyticus*	*S. paucimobilis*	*B. melitensis*	*B. diminuta/ B. vesicularis*	*B. laterosporus*	T**	Toplam
M*	10 m	2	1	-	-	-	-	-	-	3
	20 m	3	3	1	-	-	-	-	-	7
	100 m	1	-	-	-	-	-	-	-	1
İK*	İç (22 m)	4	4	-	-	-	-	-	1	9
	Orta (35 m)	2	5	-	1	-	-	1	3	13
	Dış (44 m)	-	-	-	1	-	1	-	6	7
K*	30 m	-	-	-	-	1	-	-	-	1
	40 m	4	3	2	-	-	-	-	-	9
	44 m	2	-	-	-	-	-	-	1	3
Toplam		18	16	3	2	1	1	1	11	53

* M=Boğazın Marmara girişi; İK= İzmit Körfezi; K, Boğazın Karadeniz girişi

** T= Tanımlanmamış izolat sayısı.

3.5. Seçilmiş İzolatların Çeşitli Ağır Metaller Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Minimal Inhibition Concentration-MIC) Değerlerine Ait Bulgular

Bu deneyde seçilmiş 53 izolatın ağır metal (Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Pb^{2+} ve Mn^{2+}) dirençliliği araştırılmış ve denenen ağır metallerin farklı konsantrasyonlarına dirençli oldukları görülmüştür. İzolatların adı geçen 5 farklı ağır metalin 25 µg/ml - >3200 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarına ait MIC değerleri Çizelge 3.9' da verilmiştir. Elde edilen MIC değerleri incelendiğinde, en yüksek MIC değeri (>3200 µg/ml) Pb^{2+} için, en düşük MIC değeri (25 µgr/ml) ise Cd^{2+} için İzmit Körfezinden elde edilen izolatlarda tespit edilmiştir. Ancak tüm izolatlar içinde sadece yine İzmit Körfezi' nden izole edilen tek bir izolatın her bir ağır metal konsantrasyonunda üreyebildiği de görülmektedir. Marmara Denizi' nden elde edilen izolatlar %100, %100 ve %72 oranlarında sırası ile 3 ağır metale (Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Cr^{+3}) maksimum direnç göstermişlerdir. Bununla beraber, aynı izolatlar (%27,3) Pb^{+2}' a oldukça duyarlıdırlar ve *E. coli* K-12 kontrol mikroorganizmasının MIC değerlerini geçen tüm Mn^{+2} konsantrasyonlarında ölmüşlerdir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. İstanbul Boğazı' nın Marmara Denizi ve Karadeniz girişi ile İzmit Körfezi' nden izole edilen bakterilerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) değerleri.

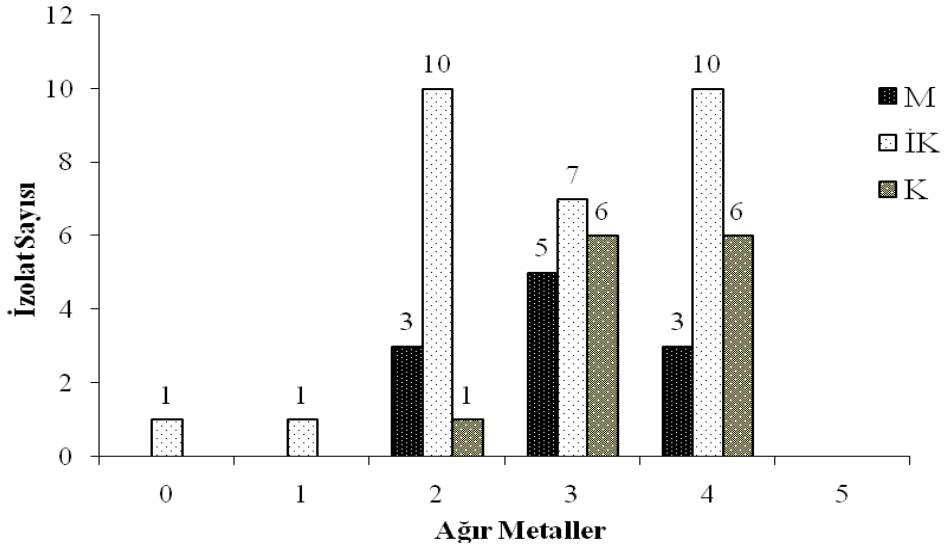
Ağır metal/ Örnek alınan istasyonlar	n***	Ağır metal konsantrasyonuna (µg/ml) direnç gösteren izolat sayısı										Direçli izolatlar	
		12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	>3200	n	%
Kadmiyum					*								
M**	11	-	-	-	-	1	6	-	4	-	-	11	100
İK**	29	-	1	2	-	3	5	2	16	-	-	26	89.7
K**	13	-	-	-	-	-	-	8	4	1	-	13	100
Bakır						*							
M	11	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	11	100
İK	29	-	-	-	1	1	27	-	-	-	-	27	93.1
K	13	-	-	-	-	1	12	-	-	-	-	12	92.3
Krom								*					
M	11	-	-	-	-	-	-	3	-	8	-	8	72.7
İK	29	-	-	-	-	-	-	11	1	17	-	18	62.0
K	13	-	-	-	-	-	1	-	-	12	-	12	92.3
Kurşun									*				
M	11	-	-	-	-	-	-	-	8	3	-	3	27.3
İK	29	-	-	-	-	-	-	3	16	9	1	10	34.5
K	13	-	-	-	-	-	-	-	6	7	-	7	53.8
Mangan									*				
M	11	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	0	0
İK	29	-	-	-	-	-	-	4	24	1	-	1	3.4
K	13	-	-	-	-	-	-	1	12	-	-	0	0

* Kontrol mikroorganizma *Escherichia coli* K12' nin minimum inhibisyon konsantrasyonu

** M: Marmara Denizi, İK: İzmit Körfezi, K:Karadeniz' den alınan örnekler

*** n: İzolat sayısı, **** İzolatlar eğer *E. coli* K12 kontrol soyunun MIC değerlerini aşıyorlarsa, dirençli kabul edilmişlerdir

Ağır metallere dirençlilikte yönelim, $Cd^{+2} = Cu^{+2} > Cr^{+3} > Pb^{+2} > Mn^{+2}$ şeklindedir. Karadeniz izolatları benzer bir şekilde %100, %92,3 ve %92,3 oranlarında sırası ile Cd^{2+}, Cu^{2+} ve Cr^{3+}' a oldukça dayanıklı ve göreceli olarak Pb^{+2}' a az dayanıklı (%53,8), Mn^{+2}' a ise dayanıksız bulunmuştur. İzmit Körfezi' nden izole edilen izolatlarin tamamı test edilen ağır metallere dirençli bulunmuşlardır. Bunların dirençlilik yönelimi $Cu^{+2} > Cd^{+2} > Cr^{+3} > Pb^{+2} > Mn^{+2}$ şeklindedir. İzmit Körfezi izolatları %93,1 ile Cu^{+2}' ye en yüksek direnci gösterirken %89,7 ile Cd^{+2}' ye, %62 ile Cr^{+3}' e ve %34,5 ile de Pb^{+2}' ye direnç göstermişlerdir. 29 adet İzmit Körfezi izolatı içinden bir tanesi (*Sphingomonas paucimobilis*) Mn^{+2}' ye de direnç göstermiştir. Bu izolat haricinde Mn^{+2} örnek toplama istasyonlarından gelen diğer izolatlar için oldukça toksik bulunan tek ağır metal olmuştur. Ek olarak, İzmit Körfezi izolatları ağır metallere oldukça yüksek oranda direnç gösteren izolatlardır (Şekil 3.9).



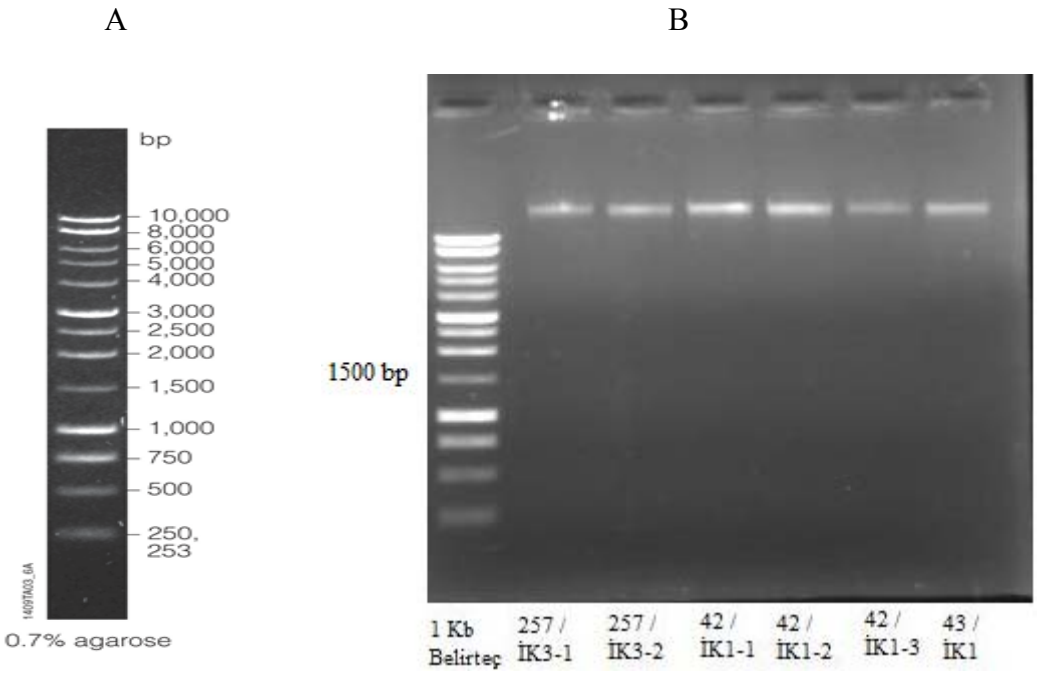
Şekil 3.9. İstanbul Boğazı' nın Marmara ve Karadeniz girişi ile İzmit Körfezi' nden elde edilen ağır metallere dirençli izolatların sayısı (M=Marmara Denizi, K=Karadeniz, İK= İzmit Körfezi).

Şekil 3.9' da görüldüğü gibi 29 izolatın 10' u (%34) 4 ağır metale (9' u Cd^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve Pb^{+2}'e, 1' i Cd^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve Mn^{+2}' a) direnç gösterirken, 7 izolat (%24) 3' er ağır metale (6' sı Cd^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve 1' i Cu^{+2}, Cr^{3+} ve Pb^{+2}' a), 10 izolat (%34) 2' şer ağır metale (1' i Cd^{+2} ve Cr^{+3}' a ve 9' u Cd^{+2} ve Cu^{+2}' a) ve 1 izolatta (%3,4) 1 ağır metale (Cu^{+2}) direnç göstermiştir. İzmit Körfezi' nden gelen 2 *Sphingomonas paucimobilis* izolatından 1' i çalışmada kullanılan bütün ağır metallere hassas bulunmuştur. Marmara Denizi ve Karadeniz izolatlarında ise göreceli, olarak benzer oranlarda çoklu ağır metal dirençliliği göstermişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, 11 Marmara izolatının 3' ünün (%27) 4 (Cd^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve Pb^{+2}' a), 5' inin (%45) 3 (Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Cr^{+3}' a), 3' ünün (%27) ise 2 (Cd^{+2} ve Cu^{+2}) ağır metale dirençli olduğunu gösterirken, 13 Karadeniz izolatının 6' sı (%46) 4 (Cd^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve Pb^{+2}), diğer 6' sı ise 3 (Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Cr^{+3}) ağır metale ve 1 izolatında (*Brucella melitensis,* 7,6%) 2 (Cd^{+2} ve Pb^{+2}) ağır metale dirençli olduğunu göstermiştir.

3.6. İzolatların Moleküler Biyolojik Yöntemler İle Tanımlanmasına Ait Bulgular

3.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bu aşamada Bölüm 2.2.13.3' te detayları verilen basamaklar izlenerek seçilmiş izolatların genomik DNA' lar izole edilmiş ve genomik DNA'ların varlığı, % 0,8'lik agaroz jel üzerinde 80 V' ta yürütülmüş, UV jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır (Şekil 3.10).



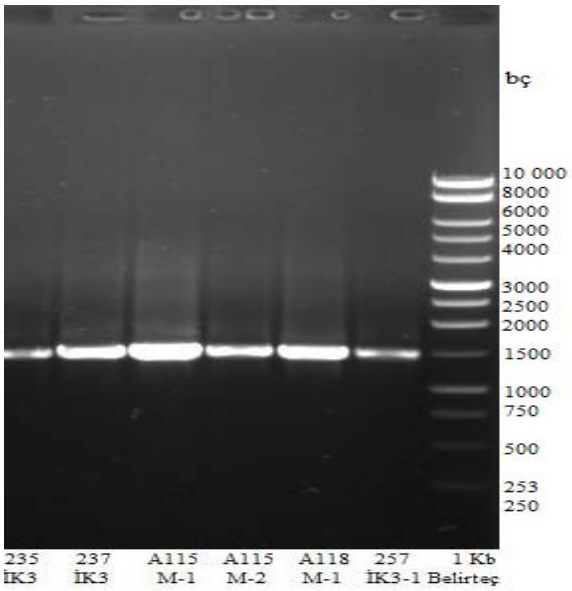
Şekil 3.10. 1Kb belirtece ait farklı büyüklükteki DNA' ların dizilişi (A) [kaynak: http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_646]; Genomik DNA izolasyonu örnek fotoğraf (%0,8 agaroz jelde) (B).

3.6.2. PCR Ürünleri

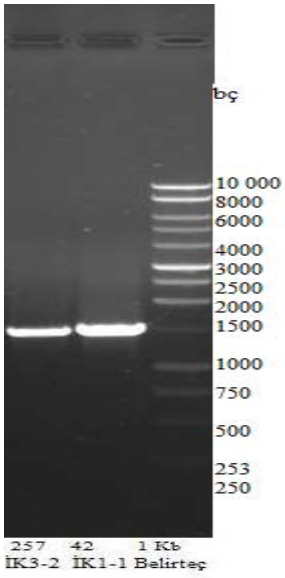
Elde edilen PCR ürünleri, %0,8' lik agaroz jelde 80-110 V' ta yürütüldü ve UV Jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı (Şekil 3.11) .

Şekil 3. 11. PCR ürünlerine ait jel fotoğrafları (%0,8 agaroz jelde) (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) [Tüm jel fotoğraflarında 1Kb DNA belirteci kullanılmıştır].

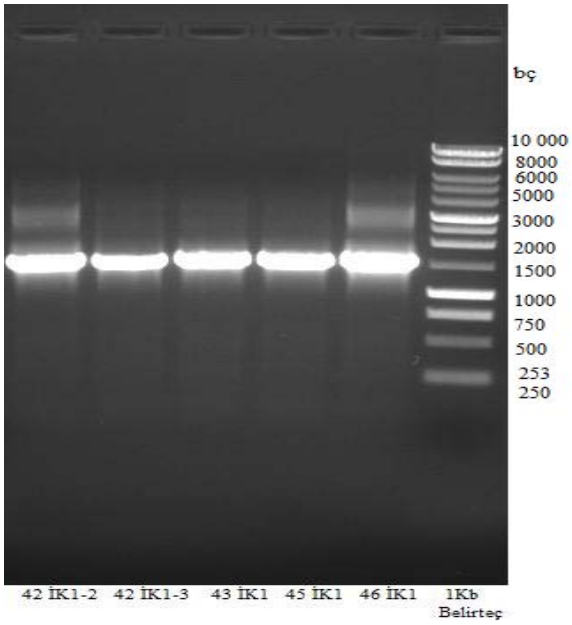
A



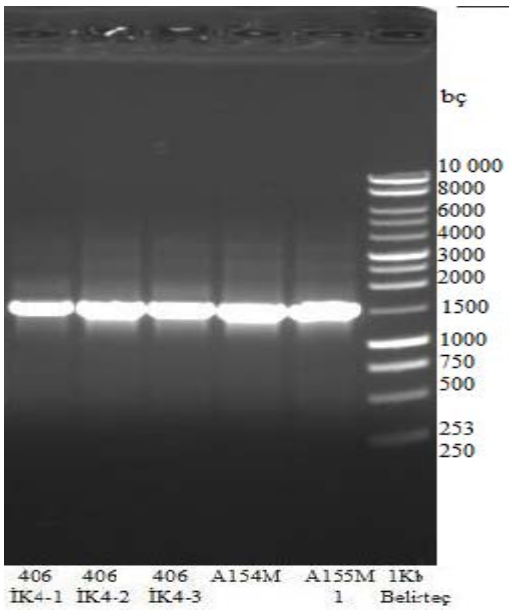
B



C



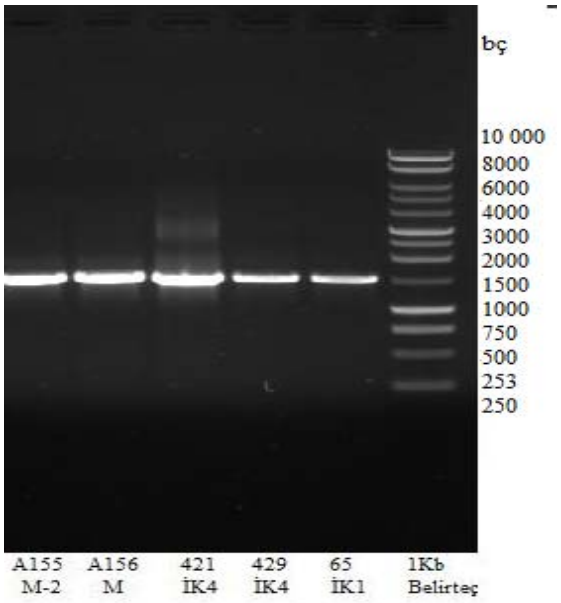
D



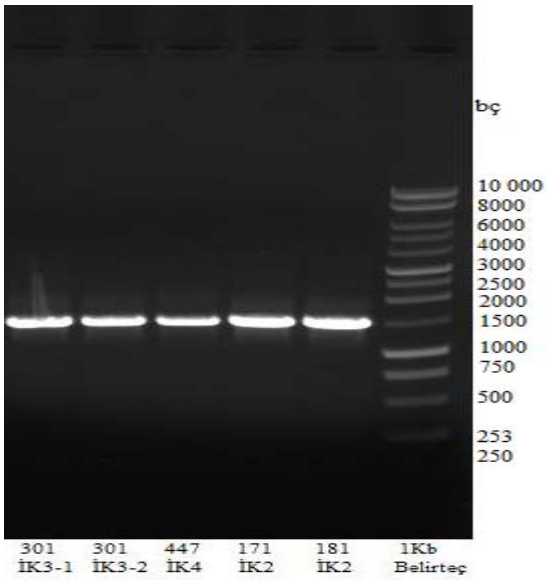
Devamı arka sayfada

Şekil 3.11’ in devamı

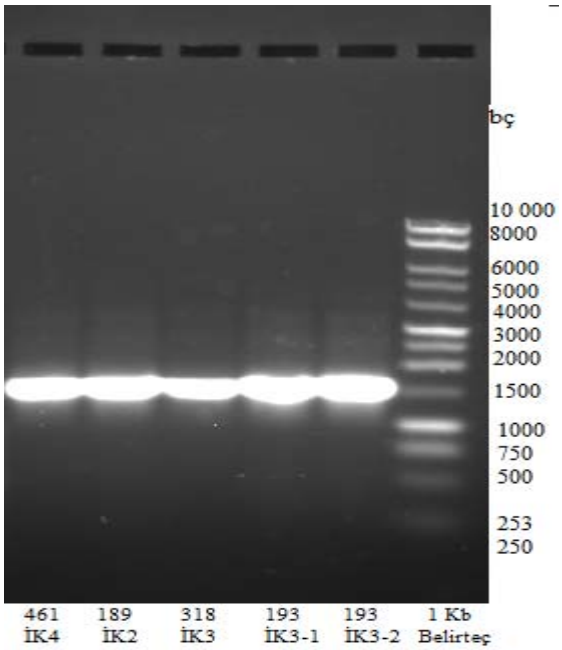
E



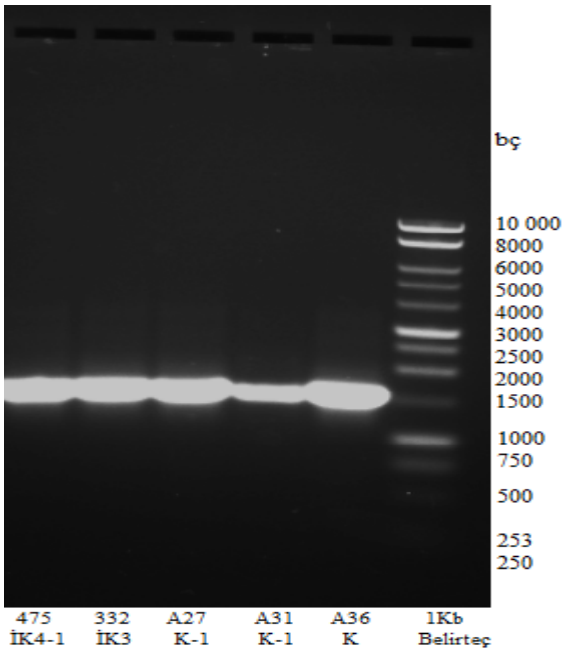
F



G



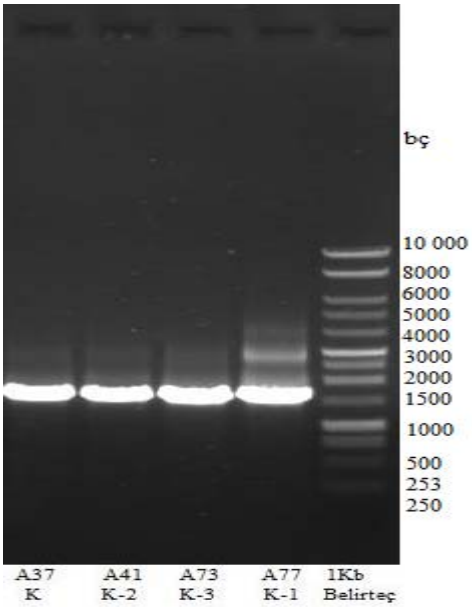
H



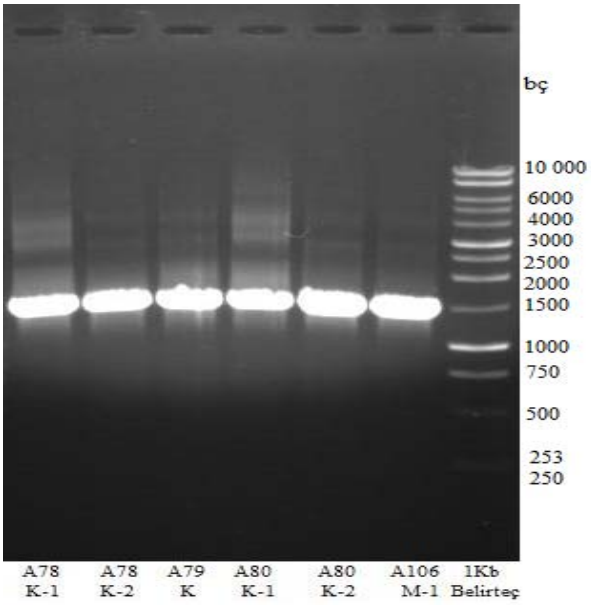
Devamı arka sayfada

Şekil 3.11.’ in devamı

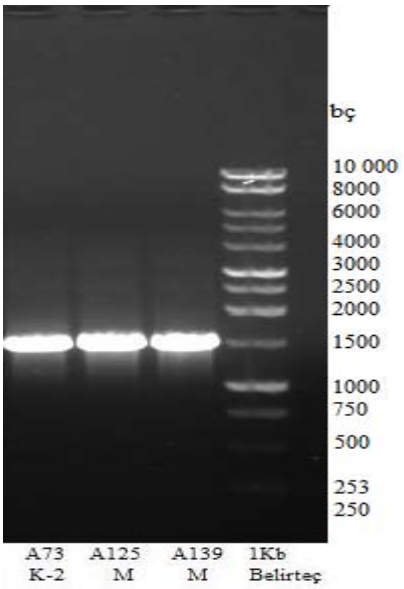
I



J



K



3.6.3. PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması, 16S rDNA Bölgesinin Dizilendirilmesi ve Filogenetik Sınıflandırma Bulguları

PCR ürünlerinin jelden saflaştırılması ve 16Sr DNA bölgesinin dizilendirilmesi RefGen firması tarafından yapılmıştır. Elde edilen diziler, ChromasPro (Version 1.5) programı kullanılarak internet üzerinden NCBI/Blast (**B**asic **L**ocal **A**ligment **S**earch **T**ool) programı ile tarandı. Bu program diziler arasındaki bölgesel benzerlikleri olan dizileri bulmak üzere geliştirilmiştir. BLAST nukleotit (BLASTN) veya protein (BLASTP) dizilerini dizi veritabanı ile karşılaştırır ve yaptığı karşılaştırmaların istatiksel anlamını hesaplar. Ayrıca bu program, gen ailelerinin üyelerini tanımlamaya yardım ettiği gibi diziler arasında evrimsel ve fonksiyonel akrabalıkları ortaya çıkarmakta da kullanılmaktadır (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

NCBI' ın kendi veribankasında daha önceden tanımlanmış bakterilerin 16S rDNA dizileri ile çalışma kapsamında seçilen izolatlarımıza ait elde edilen 16S rDNA dizileri karşılaştırılmıştır. BLASTN programında en iyi benzerlik yüzdesi veren ilk 100 sonuçtan ilk ikisi değerlendirmeye alınmıştır. Elde edilen dizilere ait BLASTN programı ile analiz sonuçları Çizelge 3.11' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.11. İzolatlara ait 16S rDNA dizilerinin BLASTN programı ile elde edilen sorgulama sonuçları ve tanımlama yüzdeleri.

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
1	96 İK1	FM207522.1	*Acinetobacter calcoaceticus* partial 16S rRNA gene, strain CWS20	154	299	%64	2e-34	%100
		EU921470.1	*Acinetobacter calcoaceticus* strain LRFP38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	154	419	%95	2e-34	%100
2	235 İK3	FJ601635.1	*Bacillus sp.* enrichment culture clone SYW5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	3014	%98	0.0	%99
		AY663662.1	*Bacillus cereus* strain DS16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	2135	%99	0.0	%98
3	237 İK3	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	3118	%99	0.0	%99
		EU439414.1	*Bacillus sp*. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	3106	%99	0.0	%99
4	A115 M-1	AJ303012.1	*Acinetobacter sp*. RUH53T 16S rRNA gene	1496	2803	%97	0.0	%99
		AJ303010.1	*Acinetobacter sp.* LUH3790 16S rRNA gene	1487	2790	%97	0.0	%99
5	A115 M-2	EU584535.1	*Bacillus sp.* cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	3016	%100	0.0	%98
		EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	3026	%99	0.0	%98
6	A118 M-1	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1564	3019	%99	0.0	%99
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp*. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1564	3061	%99	0.0	%99
7	A118 M-2	DQ177478.1	*Massilia sp*. Tibet-IIU22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1232	2182	%97	0.0	%97
		DQ257420.1	*Massilia sp.* CAI-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1232	2191	%96	0.0	%97

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
8	257 İK3-1	FJ227312.1	*Bacillus cereus* strain bh11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1420	2815	%98	0.0	%98
		EU835563.1	*Bacillus sp*. KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1420	2833	%99	0.0	%98
9	257 İK3-2	AJ303012.1	*Acinetobacter sp*. RUH53T 16S rRNA gene	1494	2940	%99	0.0	%99
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	2931	%99	0.0	%99
10	42 İK1-1	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	2907	%98	0.0	%97
		FJ860877.1	Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	2951	%98	0.0	%98
11	42 İK1-2	FJ816065.1	*Acinetobacter sp*. PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1463	2832	%99	0.0	%97
		EU770263.1	*Acinetobacter sp.* A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1463	2797	%99	0.0	%97
12	42 İK1-3	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1626	3048	%99	0.0	%99
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1626	3089	%99	0.0	%99
13	43 İK1	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3035	%99	0.0	%98
		EU439414.1	*Bacillus sp.* DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3023	%99	0.0	%98

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
14	45 İK 1	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1575	3005	%98	0.0	%99
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1575	3048	%98	0.0	%99
15	46 İK1	AJ303012.1	*Acinetobacter sp.* RUH53T 16S rRNA gene	1447	2846	%98	0.0	%98
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1438	2837	%98	0.0	%98
16	406 İK4-1	EF584539.1	*Bacillus sp.* JDM-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1406	2743	%98	0.0	%97
		DQ990026.1	Bacterium 1-gw3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1406	2713	%98	0.0	%97
17	406 İK4-2	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1559	2983	%99	0.0	%98
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1559	3025	%99	0.0	%99
18	406 İK4-3	EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1591	3055	%99	0.0	%99
		EU584535.1	*Bacillus sp.* cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1591	3041	%99	0.0	%99
19	A154 M	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1519	2934	%99	0.0	%97
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1519	2978	%99	0.0	%98

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
20	A155 M-1	FJ816065.1	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1599	3017	%99	0.0	%98
		FJ816067.1	*Acinetobacter calcoaceticus* strain PUCM1020 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1593	2745	%89	0.0	%98
21	A155 M-2	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1496	2911	%98	0.0	%99
		EF612721.1	*Bacillus sp.* TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1496	2911	%98	0.0	%99
22	A156 M	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1492	2841	%97	0.0	%99
		EF612721.1	*Bacillus sp*. TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1492	2841	%97	0.0	%99
23	421 İK4	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	2974	%99	0.0	%98
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	3017	%99	0.0	%99
24	429 İK4	FJ601658.1	*Bacillus sp.* enrichment culture clone SYW28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1454	2850	%99	0.0	%98
		FJ601633.1	*Bacillus sp.* enrichment culture clone SYW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	2837	%99	0.0	%98
25	65 İK1	DQ416313.1	Uncultured bacterium clone s2uc8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	152	152	%32	7e-34	%94
		DQ129592.1	Uncultured bacterium clone AKIW445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	152	342	%86	7e-34	%94

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
26	301 İK3-1	EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1539	2970	%99	0.0	%98
		EU584535.1	*Bacillus sp*. cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1539	2954	%99	0.0	%98
27	301 İK3-2	EU584535.1	*Bacillus sp*. cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1564	3048	%99	0.0	%99
		DQ870690.1	*Bacillus cereus* strain KSC_SF6e 16S ribosomal RNA (rrn) gene, partial sequence	1564	3014	%97	0.0	%99
28	447 İK4	DQ990037.1	Bacterium 8-gw1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1508	2972	%99	0.0	%98
		FJ601633.1	*Bacillus sp*. enrichment culture clone SYW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1507	2960	%98	0.0	%99
29	171 İK2	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1503	2963	%99	0.0	%99
		EF612721.1	*Bacillus sp.* TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1503	2963	%99	0.0	%99
30	181 İK2	AY461762.2	*Bacillus thuringiensis* serovar israelensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	2419	%93	0.0	%95
		FM178868.1	*Acetobacter pasteurianus* 16S rRNA gene, strain CCM 3614	1220	2413	%93	0.0	%95
31	461 İK4	FJ867362.1	*Acinetobacter genomosp*. 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1566	2990	%99	0.0	%98
		FJ860877.1	*Acinetobacter sp.* LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1566	3032	%99	0.0	%98

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
32	189 İK2	FJ613545.1	*Bacillus thuringiensis* strain EI-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	2485	%87	0.0	%98
		FJ501984.1	*Bacillus cereus* strain ATCC 21281 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	2805	%99	0.0	%98
33	318 İK3	EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1577	3097	%99	0.0	%99
		DQ279740.1	*Bacillus sp.* c333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1575	3021	%99	0.0	%98
34	193 İK2-1	FJ613560.1	*Staphylococcus pasteuri* strain EIV-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1508	2563	%85	0.0	%98
		FJ871049.1	*Staphylococcus sp*. DJ11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1503	2159	%82	0.0	%98
35	193 İK2-2	EU584534.1	*Bacillus sp.* cp-h16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1597	3070	%99	0.0	%98
		FJ824088.1	*Bacillus sp.* GV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1593	3046	%98	0.0	%98
36	475 İK4-1	EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	3003	%99	0.0	%98
		AM422128.1	*Bacillus cereus* partial 16S rRNA gene, isolate GMX6	1539	2961	%98	0.0	%98
37	332 İK3	EU584538.1	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	3003	%99	0.0	%98
		AM422128.1	*Bacillus cereus* partial 16S rRNA gene, isolate GMX6	1539	2961	%98	0.0	%98

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplamp uan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
38	A27 K-1	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3017	%99	0.0	%98
		EU439414.1	*Bacillus sp.* DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3005	%99	0.0	%98
39	A31 K-1	FJ263930.1	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1539	2851	%93	0.0	%98
		EU231604.1	*Acinetobacter sp.* TCCC11051 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	2976	%99	0.0	%97
40	A36 K	FJ263930.1	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1467	2666	%93	0.0	%99
		AF467306.1	Uncultured Acinetobacter sp. clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1462	2835	%99	0.0	%99
41	A37 K	FJ263930.1	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1481	2646	%92	0.0	%99
		AF467306.1	Uncultured Acinetobacter sp. clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	2819	%99	0.0	%98
42	A41 K-2	EF371492.1	Uncultured Acinetobacter sp. clone MRT-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1597	3089	%99	0.0	%99
		FM213385.1	*Acinetobacter sp.* MN33 partial 16S rRNA gene, strain MN33	1593	3003	%99	0.0	%99
43	A73 K-2	FM213386.1	*Acinetobacter sp.* MN37 partial 16S rRNA gene, strain MN37	1557	2940	%99	0.0	%98
		FM213385.1	*Acinetobacter sp.* MN33 partial 16S rRNA gene, strain MN33	1557	2936	%98	0.0	%98

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanma sonuçları	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplam puan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlanma yüzdesi
44	A73 K-3	FJ263930.1	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1563	2882	%92	0.0	99%
		AF467306.1	Uncultured Acinetobacter sp. clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	3053	%98	0.0	98%
45	A77 K-1	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	2101	%98	0.0	98%
		EU439414.1	*Bacillus sp.* DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	2105	%98	0.0	98%
46	A78 K-1	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	2101	%98	0.0	98%
		EU439414.1	*Bacillus sp.* DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	2105	%98	0.0	98%
47	A78 K-2	FJ263930.1	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1472	2570	%93	0.0	98%
		EU231604.1	*Acinetobacter sp.* TCCC11051 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1463	2685	%99	0.0	97%
48	A79 K	FM207485.1	*Acinetobacter calcoaceticus* partial 16S rRNA gene, strain CWS9	675	675	%98	0.0	94%
		FM207522.1	*Acinetobacter calcoaceticus* partial 16S rRNA gene, strain CWS20	675	675	%98	0.0	94%
49	A80 K-1	EU835563.1	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3017	%99	0.0	98%
		EU439414.1	*Bacillus sp.* DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1573	3005	%99	0.0	98%

İ. no= İzolat no

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11' in devamı

İ. no	İzolatın adı	NCBI erişim numarası	BLASTN' e dayalı tanımlanması	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	Toplamp uan	Sorgu kapsamı	E (Hata) değeri	Tanımlama yüzdesi
50	A80 K-2	FJ816065.1	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1451	2667	%99	0.0	%97
		EU770263.1	*Acinetobacter sp.* A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1451	2649	%99	0.0	%97
51	A106 M-1	FJ816065.1	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1512	2877	%98	0.0	%98
		EU770263.1	*Acinetobacter sp.* A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1512	2877	%98	0.0	%98
52	A125 M	CU151872.4	Pig DNA sequence from clone CH242-290P9 on chromosome 4, complete sequence	44.6	44.6	%26	0.12	%85
		AP007925.1	Lotus japonicus genomic DNA, chromosome 2, clone: LjT57N07, TM1246, complete sequence	41.0	41.0	%16	1.5	%96
53	A139 M	FJ816065.1	*Acinetobacter sp*. PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1532	2970	%99	0.0	%98
		EU828623.1	*Acinetobacter sp.* AQ5NOL 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	2958	%98	0.0	%98

Çizelge 3.11 incelendiğinde, tanımlama şeklinin genelde cins (genus) seviyesinde kaldığı görülmektedir. Her bir izolat için yapılan BLASTN analizi sonucu için sitede ulaşılabilecek bir erişim numarası ve BLASTN programı ile veribankasında karşılaştırma yaptığı nukleotit dizi sayısı ve benzerlik yüzdeleri de bu çizelgeye eklenmiştir. Bu program karşılaştırma yaptığı dizilerin sonuçlarını belli analitik istatiksel analizlerden (Karlin-Altschul istatistikleri) geçirerek verdiği için elde edilen sonuçlar diziler arasındaki benzerlik yüzdeleri ve rastgele yapılmış karşılaştırmalardan oluşabilecek hataları en aza indirgemektedir. Buna göre programın verdiği hata değeri (E value) yapılan karşılaştırmanın doğruluğunu da ifade etmektedir. Bu değer sıfır ve sıfıra çok yakın olduğunda, sonuçların istatiksel olarak doğruluğu onaylanmaktadır. Bu nedenle yüksek hata değeri veren 1, 7, 25, 48, 52 numaralı izolatlar (96 İK1, A118 M-2, 65İK1, A79K ve A125M) yeniden değerlendirilmelidir. Diğer örneklerde sıfır hata değeri ile istatiksel olarak anlamlı (genel olarak %97-%99 oranlarında) BLASTN tanımlama sonuçlarının alındığı görülmektedir.

Çizelge 3.11'e ait bulguları içeren bir özet tablo (Çizelge 3.12) oluşturularak bulgular bunun üzerinden aşağıda özetlenmiştir.

Çizelge 3.12. BLASTN bulgularının özeti.

Cins düzeyinde tanımlama	İzolat sayısı	En iyi benzerlik yüzdesi veren ilk iki sonuç	İzolat sayısı
Bacillus sp.	24	*Bacillus sp / B. cereus*	4
		Bacillus sp / Bacillus sp	15
		Bacillus cereus / Bacillus sp	1
		Bacillus cereus / Bacterium 1-gw3-4	1
		Bacterium 8gw1-9 / Bacillus sp.	1
		B. thuringiensis / Acetobacter pasteurianus	1
		Bacillus thuringiensis / B. cereus	1
Acinetobacter sp.	23	*Acinetobacter sp /Acinetobacter sp.*	7
		Acinetobacter genomosp3 / Acinetobacter sp.	8
		Acinetobacter sp / A. calcoaceticus	1
		Acinetobacter haemolyticus / Acinetobacter sp	3
		Acinetobacter haemolyticus / kültüre edilememiş *Acinetobacter sp.*	3
		kültüre edilememiş *Acinetobacter sp. / Acinetobacter sp.*	1
Staphylococcus sp.	1	*Staphylococcus pasteuri / Staphylococcus sp.*	1
Tanımlanamadı	5	-	5

Çizelge 3.11' e göre, 53 izolattan 24 tane bakteri örneği, *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 1 tanesi hem *B. cereus* ve *B. thuringiensis* ikilisine, 4 tanesi *Bacillus sp.* ve *Bacillus cereus* ikilisi olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 19 örnekten 15 tanesi *Bacillus sp.* olarak cins düzeyinde 3 tanesi *Bacillus cereus / Bacillus sp.*', *Bacillus cereus / Bacterium 1-gw3-4* ve *Bacterium8gwl-9 / Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır. 1 izolat ise *Bacillus thuringiensis/ Acetobacter pasteurianus* olarak tanımlanmıştır. Genel olarak bakıldığında 22 *Bacillus* örneği tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

23 örnek *Acinetobacter sp.* olarak tanımlanırken bunlardan 7 tanesi *Acinetobacter sp. / Acinetobacter sp.*, 8 örnek *Acinetobacter genomosp3 / Acinetobacter sp.*, 1 tanesi *Acinetobacter sp. / Acinetobacter calcoaceticus*, 3 örnek *A. haemolyticus / Acinetobacter sp.,* 3 örnek *Acinetobacter haemolyticus* / kültüre

edilememiş *Acinetobacter sp.,* 1 örnek kültüre edilememiş *Acinetobacter sp. / Acinetobacter sp*. olarak tanımlanmıştır.

Son olarak 1 örnek ise *Staphylococcus pasteuri* vedya *Staphylococcus sp.* olarak tanımlanmıştır. Kalan 5 örnek yukarıda ifade edildiği gibi hata değeri (E value) yüksek olduğu için tanımlanmamış kabul edilmiştir. Bu örneklere ait tüm hazırlayıcı testlerin (DNA izolasyonu, PCR ile 16S rDNA dizisinin elde edilmesi ve DNA dizi analiz cihazı ile 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi) tekrar edilmeleri gerekmektedir (Çizelge 3.12).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1. VİTEK 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Sistemi, Klasik Tanımlama Yöntemi ve 16S rDNA Dizisi ile Tanımlama Sonuçlarının Karşılaştırılması

Farklı yollardan yapılan tanımlamalar genel olarak benzer fakat özdeş (identical) olmayan sonuçlar vermiştir. Yapılan tüm tanımlama sonuçları Çizelge 4.1' te özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi, klasik yöntem ve 16S rDNA dizilerinin BLASTN programı ile tanımlanma sonuçlarının karşılaştırılması.

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T %
1	96/İK1	*Sphingomonas paucimobilis*	% 91	TANIMLANAMADI	*Acinetobacter calcoaceticus* partial 16S rRNA gene, strain CWS20	309	154	%100
					Acinetobacter calcoaceticus strain LRFP38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		154	%100
2	235/İK3	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp,*	*Bacillus sp.* enrichment culture clone SYW5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1758	1544	%99
					Bacillus cereus strain DS16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1544	%98
3	237/İK3	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1791	1609	%99
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1609	%99
4	A115/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* RUH53T 16S rRNA gene	1756	1496	%99
					Acinetobacter sp. LUH3790 16S rRNA gene		1487	%99
5	A115/M-2	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 88	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1743	1544	%98
					Bacillus sp. cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1541	%98
6	A118/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp*. 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	3019	%99
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		3061	%99
7	A118/M-2	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 88	*Bacillus sp.*	*Massilia sp.* Tibet-IIU22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1351	2182	%97
					Massilia sp. CAI-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2191	%97

*İ. no= İzolat no; V. T %=Vitek tanımlama yüzdesi ; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı ; B.T. % =BLASTN tanımlama yüzdesi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T. (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. %
8	257/İK3-1	*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus cereus* strain bh11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1695	1420	%98
					Bacillus sp. KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1420	%98
9	257/İK3-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* RUH53T 16S rRNA gene	1751	1494	%99
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1485	%99
10	42/İK1-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	1528	%97
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1528	%98
11	42/İK1-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1749	1463	%97
					Acinetobacter sp. A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1463	%97
12	42/İK1-3	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1787	1626	%99
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1626	%99
13	43/İK1	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1573	%98
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1573	%98
14	45/İK1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1751	1575	%99
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1575	%99

*İ. no= İzolat no; V. T %=Vitek tanımlama yüzdesi ; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı ; B.T. % =BLASTN tanımlama yüzdesi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. %
15	46/İK1	TANIMLANAMADI		TANIMLANAMADI	*Acinetobacter sp.* RUH53T 16S rRNA gene	1739	1447	%98
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1438	%98
16	406/İK4-1	*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	% 86	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* JDM-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1699	1406	%97
					Bacterium 1-gw3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1406	%97
17	406/İK4-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp*. 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1758	1559	%98
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1559	%99
18	406/İK4-3	*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	% 90	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1591	%99
					Bacillus sp. cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1591	%99
19	A154/M	*Acinetobacter haemolyticus*	% 94	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1793	1519	%97
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1519	%98
20	A155/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1599	%98
					Acinetobacter calcoaceticus strain PUCM1020 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1593	%98

*İ. no= İzolat no; V. T %=Vitek tanımlama yüzdesi ; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı ; B.T. % =BLASTN tanımlama yüzdesi Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B.T. %
21	A155/M-2	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 90	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp*. KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1496	%99
					Bacillus sp. TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1496	%99
22	A156/M	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 86	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1805	1492	%99
					Bacillus sp. TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1492	%99
23	421/İK4	TANIMLANAMADI		TANIMLANAMADI	*Acinetobacter genomosp.* 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1530	%98
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1530	%99
24	429/İK4	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	%86	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* enrichment culture clone SYW28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1711	1454	%98
					Bacillus sp. enrichment culture clone SYW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1452	%98
25	65/İK1	*Sphingomonas paucimobilis*	% 89	*Acidomonas sp.*	Uncultured bacterium clone s2uc8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	303	152	%94
					Uncultured bacterium clone AKIW445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		152	%94
26	301/İK3-1	TANIMLANAMADI		*Amphibacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1539	%98
					Bacillus sp. cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1539	%98

*İ. no= İzolat no; V. T %=Vitek tanımlama yüzdesi ; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; B.T. % =BLASTN tanımlama yüzdesi Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. (%)
27	301/İK3-2	*Brevibacillus laterosporus*	% 85	*Brevibacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1756	1564	%99
					Bacillus cereus strain KSC_SF6e 16S ribosomal RNA (rrn) gene, partial sequence		1564	%99
28	447/İK4	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacterium* 8-gw1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1782	1508	%98
					Bacillus sp. enrichment culture clone SYW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1507	%99
29	171/İK2	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1783	1503	%99
					Bacillus sp. TBM353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1503	%99
30	181/İK2	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1225	%95
					Acetobacter pasteurianus 16S rRNA gene, strain CCM 3614		1220	%95
31	461/İK4	*Brevundimonas diminuta / vesicularis*	% 99	*Brevundimonas sp.*	*Acinetobacter genomosp*. 3 strain LUH 6127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1566	%98
					Acinetobacter sp. LUH 1469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1566	%98
32	189/İK2	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacillus thuringiensis* strain EI-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1728	1458	%98
					Bacillus cereus strain ATCC 21281 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1452	%98

**İ. no= İzolat no; V.T.%=Vitek tanımlama yüzdesi; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; B.T.% = BLASTN tanımlama yüzdesi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. (%)
33	318/İK3	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1782	1577	%99
					Bacillus sp. c333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1575	%98
34	193/İK2-1	TANIMLANAMADI		TANIMLANAMADI	*Staphylococcus pasteuri* strain EIV-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1771	1508	%98
					Staphylococcus sp. DJ11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1503	%98
35	193/İK2-2	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1817	1597	%98
					Bacillus thuringiensis strain EI-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1458	%98
36	475/İK4-1	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp..*	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1751	1541	%98
					Bacillus cereus partial 16S rRNA gene, isolate GMX6		1539	%98
37	332/İK3	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* cp-h34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1751	1541	%98
					Bacillus cereus partial 16S rRNA gene, isolate GMX6		1539	%98
38	A27/K-1	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	%85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1782	1573	%98
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1573	%98

**İ. no= İzolat no; V.T%.=Vitek tanımlama yüzdesi; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; B.T.% = BLASTN tanımlama yüzdesi Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. (%)
39	A31/K-1	*Acinetobacter baumannii*	%89	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1855	1539	%98
					Acinetobacter sp. TCCC11051 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1530	%97
40	A36/K	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1723	1467	%99
					Uncultured *Acinetobacter sp.* clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1462	%99
41	A37/K	*Acinetobacter haemolyticus*	% 93	*Acinetobacter sp..*	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1692	1481	%99
					Uncultured *Acinetobacter sp.* clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1476	%98
42	A41/K-2	*Brucella melitensis*	% 91	*Brucella melitensis*	Uncultured *Acinetobacter sp.* clone MRT-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1597	%99
					Acinetobacter sp. MN33 partial 16S rRNA gene, strain MN33		1593	%99
43	A73/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* MN37 partial 16S rRNA gene, strain MN37	1775	1557	%98
					Acinetobacter sp. MN33 partial 16S rRNA gene, strain MN33		1557	%98
44	A73/K-3	*Acinetobacter haemolyticus*	% 98	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1842	1563	%99
					Uncultured *Acinetobacter sp.* clone 91_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1557	%98

*İ. no= İzolat no; % V.T.=Vitek tanımlama; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; %B.T. =BLASTN tanımlama yüzdesi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. (%)
45	A77/K-1	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1823	1573	%98
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1573	%98
46	A78/K-1	*Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*	% 85	*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1820	1573	%98
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1573	%98
47	A78/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter haemolyticus* strain BA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1729	1472	%98
					Acinetobacter sp. TCCC11051 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1463	%97
48	A79/K	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter calcoaceticus* partial 16S rRNA gene, strain CWS9	439	675	%94
					Acinetobacter calcoaceticus partial 16S rRNA gene, strain CWS20		675	%94
49	A80/K-1	TANIMLANAMADI		*Bacillus sp.*	*Bacillus sp.* KDNB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1782	1573	%98
					Bacillus sp. DB-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1573	%98
50	A80/K-2	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1451	%97
					Acinetobacter sp. A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1451	%97

**İ. no= İzolat no; V.T.%=Vitek tanımlama yüzdesi; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; B.T.% = BLASTN tanımlama yüzdesi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.1' in devamı

İ. no *	İzolatın adı	Vitek tanımlaması	V. T (%)	Bergey' s Manuel of Sytematic Bacteriology (1984)	BLASTN programına göre 16S rDNA tanımlama sonucu	O. N. S.**	Karşılaştırılan nukleotit sayısı	B. T. (%)
51	A106/M-1	*Acinetobacter baumannii*	% 98	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1696	1512	%98
					Acinetobacter sp. A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1512	%98
52	A125/M	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	Pig DNA sequence from clone CH242-290P9 on chromosome 4, complete sequence	152	44.6	%85
					Lotus japonicus genomic DNA, chromosome 2, clone: LjT57N07, TM1246, complete sequence		41.0	%96
53	A139/M	*Acinetobacter baumannii*	% 99	*Acinetobacter sp.*	*Acinetobacter sp.* PUCM1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1532	%98
					Acinetobacter sp. AQ5NOL 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1530	%98

**İ. no= İzolat no; V.T. %.=Vitek tanımlama yüzdesi; **O.N.S.= DNA dizi analiz cihazı tarafından okunan nukleotit sayısı; B.T. %= BLASTN tanımlama yüzdesi

Çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere dayalı olarak yapılan klasik tanımlama yöntemi ile seçilmiş 53 izolatın 4 tanesi tanımlanamadığı Çizelge 4.1' de görülmektedir. Tanımlanamayan bu 4 izolattan biri [96 İK1 (1 no' lu izolat)] Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile *Sphigonomas paucimobilis*, 16S rDNA dizisine dayalı olarak BLASTN programı ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmış olsa da dizi analiz cihazı tarafından bu izolata ait 16S rDNA dizilendirmesi yetersiz (309 baz) olduğundan alınan sonuç güvenilir bulunmamıştır. Klasik tanımlama yöntemi ile tanımlanmayan diğer 3 bakteri örneği 2 tanesi [46 İK1 (15 no' lu izolat) ve 421 İK4 (23 no' lu izolat)] Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile de tanımlanamamıştır. 16S rDNA dizilendirmesine dayalı BLASTN programı ile her iki örnek te %98 benzerlik oranı ile *Acinetobacter sp*. olarak ancak cins düzeyinde tanımlanabilmiştir. Bu bağlamda adı geçen bu iki izolatın *Acinetobacter* cinsine ait soylar olduğu güçlü bir olasılıktır. Aynı şekilde klasik yöntemler eliyle tanımlanamayan 4. bakteri örneği [193 / İK2-1(34 no' lu izolat)] ise, Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile de tanımlanamamıştır. Bu izolata ait BLASTN sonucu ise %98 benzerlik oranı *Staphylococcus pasteuri* ve *Stapyhlococcus sp.*' ye benzetilmiştir.

Bunlara ek olarak Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanamamış 11 izolatın 6 tanesi [43 İK1 (13 no' lu izolat), 301 / İK3-1 (26 no' lu izolat), 189 / İK2 (32 no' lu izolat), 475 / İK4-1 (36 no' lu izolat), 332 / İK3 (37 no'lu izolat), A80K-1 (49 no' lu izolat)] hem klasik ve hem de BLASTN sonucunda %98 benzerlik oranı ile genel olarak *Bacillus sp.* olarak ancak cins düzeyinde, 189 / İK2 (32 no' lu izolat) ise yine eşit benzerlik yüzdesi ile (%98) *Bacillus thuringiensis* ırkı EI-17'ye ve *Bacillus cereus* ırkı ATCC 21281' e benzetilmiştir. Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanamayan diğer 2 izolat [447 / İK4 (28 no' lu izolat) ve 181 / İK2 (30 no' lu izolat)] ise klasik yöntem ile *Bacillus sp.* olarak cins düzeyinde tanımlanırken, BLASTN sonucu 181 / İK2 (30 no' lu izolat) 2 farklı bakteri türüne (*Bacillus thuringiensis* serovar *israilensis* ve *Acetobacter pasteurianus* ırkı CCM 3614) aynı benzerlik oranında (%95) benzetilmiştir. Bu iki bakteri türünün farklı Gram boyanma özelliği (*Bacillus thuringiensis* Gram pozitif, *Acetobacter pasteurianus* Gram negatif) göstermesi izolatımız Gram pozitif olduğundan ikinci şık

değerlendirme dışı bırakılsa da düşündürücü bulunmuştur. 447 / İK4 (28 no' lu izolat) ise BLASTN sonucu *Bacterium* 8-gwl-9' a ve *Bacillus sp.*' ye cins düzeyinde sırası ile %98 ve %99 benzerlik oranında benzetilmiştir (Adı geçen ilk bakteri türünün özelliklerine dair yayınlara ulaşılamamıştır). Aynı şekilde Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi tarafından tanımlanamamış olan son 3 izolat [46 / İK1 (15 no' lu örnek) ve 421 / İK4 (23 no' lu örnek), 193 / İK3-1 (34 no' lu örnek)] klasik yöntem ile de tanımlanamamıştır. Bunlardan iki tanesi (15 ve 23 no' lu izolatlar) BLASTN sonucuna göre % 98 benzerlik oranı ile *Acinetobacter sp.* cinsi bakterilere üçüncü izolat (34 no' lu izolat) ise %98 benzerlik oranı ile *Staphylococcus pasteuri* ırkı EIV-2' ye ve % 99 benzerlik oranı ile *Staphylococcus sp*.' ye benzetilmiştir.

Aynı çizelge (Çizelge 4.1) incelendiğinde, 2, 3, 5, 8, 16, 18, 21, 22, 24, 29, 33, 35, 38, 45, 46 no' lu izolatlar her üç tanımlama yöntemine göre de *Bacillus* cinsine dahil edilirken 4, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 19, 20, 39, 40, 41, 43, 44, 47, 50, 51 ve 53 no' lu izolatların ise *Acinetobacter* cinsine dahil edildiği görülmektedir. Her iki cins için tüm tanımlama sonuçları cins düzeyinde birbirini doğrular nitelikte bulunmuştur. Sonuçların detayları incelendiğinde Vitek 2 Kompakt tarafından *Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis* olarak tanımlanan 2, 3, 8, 29, 33, 35, 38, 45 ve 46 no' lu izolatların (%85), 5 ve 7 no' lu izolatların (%88), 22, 24 ve 26 no' lu izolatların (%86), 18 ve 21 no' lu izolatların ise (%90) oranında bu bakterilere benzetildiği görülmektedir. Bu izolatların BLASTN sonuçları incelendiğinde; genelde *Bacillus sp.*' ye ait çeşitli türlere %97-99 arasındaki oranlarda benzetildiği görülmektedir. Bunların hiçbirisi belirli bir *Bacillus* türüne işaret etmemektedir. Bu türlere ait 16S rDNA tanımlamaları cins seviyesinde kalmıştır. Bizim izolatlarımız içinde Vitek 2 Kompakt tarafından bu şekilde tanımlanmış 16 tane izolat vardır. Çizelge 4.1 incelendiğinde BLASTN karşılaştırması ile tanımlama sonuçlarına göre, bunlardan yalnız 2 no' lu izolatın %98 benzerlik oranı ile *Bacillus cereus* ırkı DS16' ya, 8 no' lu izolatın %98 benzerlik oranı ile *Bacillus cereus* ırkı bh11' e, 35 no' lu izolatın ise %98 benzerlik oranı ile *Bacillus thuringiensis* ırkı EI-17' ye benzetildiği görülmektedir. Bu benzerlik oranları Vitek 2 otomatik tanımlama sisteminde önerilen benzerlik oranlarına (%85) göre daha yüksektir. Bu nedenle de adı geçen izolatın bu türe ait olduğu güçlü bir şekilde öne çıkmaktadır. BLASTN programı tarafından

%97-99 benzerlik oranları ile *Bacillus sp.* olarak tanımlanan diğer izolatlar (3, 5, 16, 18, 21, 22, 24, 29, 33, 38, 45, 46 no' lu izolatlar) ise Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile %85-90 arasındaki oranlarda *Bacillus cereus* / *B. thuringiensis* ikilisine benzetilmiştir.

Ayrıca elde edilen sonuçlar içinde 27 no' lu izolatın Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ve klasik tanımlama yöntemi ile *Brevibacillus* cinsine dahil edilirken BLASTN analizi sonucunda *Bacillus sp.* veya *B. cereus* olarak tanımlanmıştır. Bu örneğin ara ve yeni bir form ve/veya *Bacillus* cinsine ait yeni bir tür olma olasılığı yüksektir. 31 no' lu izolat için de benzer bir sonuçtan bahsedilebilir. Vitek 2 sistemi ve klasik tanımlama yöntemi ile *Brevundimonas sp.* olan bu izolat BLASTN ile *Acinetobacter sp*. olarak tanımlanmıştır. Bu izolatın da bir ara form ve/veya *Acinetobacter* cinsi için yeni bir tür olma olasılığı çok yüksektir. Bu şekilde olduğu düşünülen son örnek ise, 42 no' lu izolatımızdır. Bu izolat yine Vitek 2 ve klasik yöntemle *Brucella melitensis.* olarak tanımlanırken BLASTN sonucu kültüre edilememiş *Acinetobacter sp*. olarak belirlenmiştir. Yüksek olasılıkla bu türün de yeni bir *Acinetobecter sp.* olduğu düşünülmektedir.

Yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referans kitabının (Claus ve Berkeley, 1984) ilgili bölümü (sf.1128-1129) ile karşılaştırıldığında her iki türün yapılan biyokimyasal testler ile aynı sonuçları verdikleri için iki tür arasında ayırımının yapılamadığı görülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Bacillus sp.* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*'in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması.

İ. no	İzolatın adı	Gram boyama /Hücre şekli	Spor boyama	Kat.	Oks.	A. D.	L. D.	β-PHB	Protein hidrolizi	Jelatin kullanımı	Nişasta kulllanımı	Nitratı nitrite indirgeme
Bergey's Manual, (1984)' e göre	*Bacillus cereus*	Gr +/basil	Sporlu	+	-	d	-	+	+	+	+	+
	Bacillus thuringiensis	Gr +/basil	Sporlu	+	d	d	-	+	+	+	+	+
2	235 /İK3	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
3	237 / İK3	Gr +/basil	Sporlu	+	+?	+	-	+	+	+	+	+
5	A115 M-2	Gr +/basil	Sporlu	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7	A118 M-2	Gr +/basil	Sporlu	+	+	+	-	+	+	+	+	+
8	257 / İK3-1	Gr +/basil	Sporlu	+	+?	+	-	+	+	+	+	+
13	43 / İK1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
16	406 / İK4-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
18	406 / İK4-3	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
21	A155 / M-2	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
22	A 156 M	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
24	429 / İK4	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
26	301 / İK3-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
28	447 / İK4	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
29	171 / İK2	Gr +/basil	Sporlu	+	-	R.V	-	+	+	+	+	+
30	181 / İK2	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
32	189 / İK2	Gr +/basil	Sporlu	+	-	-	-	+	+	+	+	+
33	318 / İK3	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
35	193 / İK2-2	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
36	475 / İK4-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	R.V	R.V	+	+	+	+	+
37	332 İK3	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
38	A27 / K-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
45	A77 / K-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
46	A78 / K-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+
49	A80 / K-1	Gr +/basil	Sporlu	+	-	+	-	+	+	+	+	+

İ.no= izolat no; Kat.=katalaz , Oks.=Oksidaz; A.D.=Arjinin dekarboksilaz; L.D.=Lizin Dekarboksilaz; β-PHB=beta polihidroksi butirat; R.V.=Reaksiyon vermedi; d= %11-89 pozitif; +? =Şüpheli pozitif

Çizelge 4.2' nin devamı

İ. no	İzolatın adı	VP testi	Sitrat kullanımı	Glukozdan asit oluşturma	G.G.O.*	Arabinoz	Ksiloz	Mann.	Sorbitol	Sukroz	Laktoz
Bergey's Manual (1984)' e göre	*Bacillus cereus*	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	Bacillus thuringiensis	d	+	+	-	-	-	-	θ	θ	θ
2	235 /İK3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
3	237 / İK3	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
5	A115 M-2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
7	A118 M-2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
8	257 / İK3-1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
13	43 / İK1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
16	406 / İK4-1	+	+^{z}	+	-	-	-	+	-	+	+
18	406 / İK4-3	+	+^{z}	+	-	-	-	+	-	+	+
21	A155 / M-2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
22	A 156 M	-	+^{z}	+	-	-	-	+	-	+	+
24	429 / İK4	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
26	301 / İK3-1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
28	447 / İK4	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
29	171 / İK2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
30	181 / İK2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
32	189 / İK2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
33	318 / İK3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
35	193 / İK2-2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
36	475 / İK4-1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
37	332 İK3	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
38	A27 / K-1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
45	A77 / K-1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
46	A78 / K-1	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
49	A80 / K-1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+

İ. no= izolat no; *G.G.O.=Glukozdan gaz oluşturma; θ=belirlenmiş değil; VP=Voges Prokauer; +^{z}= zayıf üreme

Bizim izolatlarımız ile bu türlere ait testler kıyaslandığında; elde edilen sonuçlar içinde şeker kullanımı, sitrat kullanımı, mannoz kullanımı sonuçları referans sonuçlar ile genelde uyumlu değilken, çizelgede özetlenen diğer testler arasında büyük bir uyum gözlenmiştir. Ancak meydana gelen farklılık iki türü birbirinden ayırmaktan çok iki türden farklılaşmış özellikleri öne çıkarmaktadır. Bizim izolatlarımız ile bu türlere ait özellikler karşılaştırıldığında, Vitek 2 Kompakt tarafından *Bacillus cereus / Bacillus thurungiensis* olarak tanımlanan bu izolatların birbirinden farklı kılacak ayırt edici testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da eğer *cry* genlerini taşıyan plazmitleri kaybetmedilerse parasporal kristaller literatürde önerilen çeşitli yöntemler ile (elektron mikroskopi yöntemleri, SDS page vbg., Koni ve Ellar, 1994; delta endotoksinlerin antikorlar ile serolojik olarak tiplendirilmesi, Amstrong ve ark., 1985) belirlenmesine dayalı teknikler olarak özetlenebilir.

Bacillus cinsi genel olarak değerlendirildiğinde Gram pozitif, çomak şaklinde, aerop, endospor formunda bakterilerdir (Claus ve Berkeley, 1984). *Bacillus cereus* grup olarak adlandırılan oldukça homojen bir topluluğu oluşturan ve birbiriyle oldukça yakın akraba 6 türü (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* ve *Bacillus weihenstephanensis*) içermektedir. Bunların filogenetik ve taksonomik olarak birbirlerinden kesin bir şekilde ayrımı hala tartışmalı bir konudur (Jensen ve ark., 2003).

Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis' u tür seviyesinde tanımlamaya dayalı literatür incelendiğinde gerçekten de bu iki türü birbirinden moleküler ve klasik yöntemlerle ve dolayısıyla otomatik tanımlama sistemine dayalı tanımlamada çeşitli zorlukların öne çıktığı görülmektedir. *Bacillus thuringiensis* diğer *Bacillus* türlerinden sporulasyon esnasında sentezlediği parasporal inklüzyon cisimcikleri (kristal) nedeniyle farklıdır. Bu cinsin bazı soylarında bulunan kristal yapılar, bazı böcekler üzerinde zehir etkisine sahiptir. Bu nedenle eskiden beri lepidopter, diptera veya koleopteronların biyolojik kontrolünde böcek öldürücü olarak kullanılmaktadır (Höfte ve Whiteley, 1989; Glare ve O'Callaghan, 2000). Ancak bu ayırt edici özelliği sağlayan *cry* genleri transfer edilebilir bir plazmit üzerinde bulunur ve ilgili soy bu

plazmitini kaybederse tanımlanma konusundaki ayırt edici özelliğini kaybeder (Thorne, 1993). Bu hali ile de *B. cereus*'tan ayırt edilemez. Bu noktada komozomal genler üzerinden moleküler tanımlama metotları literatürde önerilmektedir. Ancak bu yöntemler eliylede yanlış sonuçlar elde edilebildiği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Chen ve Tsen, 2002; Ki ve ark., 2009). Adı geçen bu iki türün birbirinden ayırt edilmesi konusu zor ve tartışmalı bir konudur. Geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ile ya da yağ asiti metil ester profillerinin çıkarılması ile daha net bir ayırıma gidilebileceği önerilmektedir (Bobbie ve White, 1980; Vaerewijck ve ark., 2001).

Acinetobacter sp. üyeleri ile ilgili Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994), referans kitabı incelendiğinde, bu genusun Gram negatif, sporsuz, hareketli, (polar fimbriyaları olan), aerobik, katalaz pozitif (+) ve oksidaz negatif (-) bakteriler olarak tanımlanmaktadırlar (Claus ve Berkeley, 1994).

Buna dayalı olarak çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarda, Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi ile 4, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 20, 39, 40, 43, 47, 48, 50, 52, ve 53 no' lu izolatlar %99 benzerlik oranı ile 51 no' lu izolat ise % 98 benzerlik oranı ile *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar BLASTN programı ile tanımlama sonuçları ile karşılaştırıldığında adı geçen izolatlar içinden 20 no' lu izolat %98, 48 no' lu izolat %94 benzerlik yüzdesi ile *Acinetobacter calcoaceticus*'a, 39 ve 47 no'lu izolatlar %98, 40 no' lu izolat ise %99, benzerlik oranı ile *Acinetobacter haemolyticus*'a benzetilmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan otomatik tanımlama ve 16S rDNA dizi analizine dayalı BLASTN sonuçları bazı örneklerde tür düzeyinde farklı olsa da cins düzeyinde % 100 uyum göstermiştir. Tür düzeyinde bu şekilde bir farklılığın olması, her iki sisteme ait veri bankasındaki tanımlı bakterilere ait özelliklere bağımlı kalınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu izolatlara ait bizim yaptığımız biyokimyasal testler ile Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından bu iki bakteriye ait sonuçlar karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Acinetobacter sp.* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *A. baumannii / A. haemolyticus / A. calcoaceticus*' un Bergey's Manual of Systematic Bacterology referans kitabından karşılaştırılması.

İzolat No	İzolatın Adı	Gram boyama / Hücre şekli	Katalaz	Oksidaz	Glukozdan asit oluşumu	Sitrat kullanımı	Hemoliz	Gelatin kullanımı
Bergey's Manual (1994) kitabına göre	*Acinetobacter baumannii*	Gram- / basil	+	-	95[a]	+	-	-
	Acinetobacter haemolyticus	Gram- / basil	+	-	52[a]	91[a]	+	+
	Acinetobacter calcoaceticus	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 3	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 6	Gram- / basil	+	-	66[a]	+[b]	+	+
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 10	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 11	Gram- / basil	+	-	-	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 12	Gram- / basil	+	-	33[a]	-	-	-
4	A115 M-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
6	A118 M-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
9	257 / İK3-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
10	42 / İK1-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
11	42 / İK1-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
12	42 / İK1-3	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
14	45 İK1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
17	406 / İK4-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
20	A155 / M-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
39	A31 / K-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	+
40	A36 K	Gram- / basil	+	-	+	+	-	+
43	A73 / K-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	+
47	A78 / K-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	+
48	A79 K	Gram- / basil	+	-	+	+	-	+
50	A80 / K-2	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
51	A106 / M-1	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
52	A125 M	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
53	A139 M	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-

a= sayısal ifadeler pozitif suşların sayısal oranını ifade etmektedir, b= bir yada iki ototrofik suş haricinde hepsi pozitif anlamındadır

Bu bakterilerin genel biyokimyasal testlerine Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabında bakıldığında *A. baumannii* [glukoz kullanımı (+) (%95' inde), sitrat (+,), hemoliz (-), jelatin kullanımı (-)], *A. haemolyticus* [glukoz kullanımı (+) (%52' sinde), sitrat (+) (%94' ünde), hemoliz (+), jelatin kullanımı (+) ve *A. calcoaceticus'* un (glukoz kullanımı (+) , sitrat (+), hemoliz (-), jelatin kullanımı (-)] sonuçlarını bizim izolatlarımızın sonuçları ile benzediği ve 20 ve 48 no' lu izolatların *Acinetobacter calcoaceticus* (glukoz kullanımı (+), sitrat (+), hemoliz (-), jelatin kullanımı (-)] olma ihtimalinin yüksek olduğu görülmüştür (Claus ve Berkeley, 1994). Ancak 39, 40 ve 47 no' lu izolatların moleküler teknikler ile (16S rDNA dizi analizine dayalı BLASTN sonucu) her ne kadar *A. haemolyticus'*a benzetilse de hemoliz testinde negatif (γ hemoliz) davranış gösterdiklerinden bu ihtimalden uzaklaşmamıza neden olmuşlardır. Yani *A. haemolyticus* kanlı agarda hemolitik iken adı geçen bu üç izolat hemolitik olarak belirlenmemiştir. Ancak bu üç izolatın tıpkı *A. haemolyticus* gibi jelatini kullanabilmesi düşündürücüdür. Bu nedenle 39 ve 40 no' lu izolatlar için Vitek 2 sisteminin daha fazla benzerlik yüzdesi vermesi (%99) ve biyokimyasal testler ile desteklenmesi nedeniyle *A. baumannii* olabileceği düşünülse de yukarıdaki özellik ayırımın güç olduğunun göstergesidir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde, Vitek 2 sistemine göre %99 benzerlik oranı ile *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanan diğer izolatlarımızın (4, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 43, 50, 51, 52, 53 no'lu izolatlar) BLASTN sonucu *Acinetobacter sp.*' ye genus seviyesinde %97-99 benzerlik oranında benzetildiği görülmektedir. Ayrıca bu bakteri türü için bizim yaptığımız biyokimyasal test sonuçlarına göre 4, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 51, 52 ve 53 no' lu izolatlar glukoz kullanımı, sitrat, hemoliz testi ve jelatin kullanımı testi sonuçlarına göre [hepsi glukoz kullanımı (+), sitrat kullanımı (+), hemoliz (–) ve jelatin kullanımı (–) dir], *A. baumannii* ve *A. calcoaceticus*' un sonuçlarına oldukça yakın bulunmuştur. Tür seviyesinde ayırım konusunda bu izolatlar için Vitek 2 sistemi daha başarılı görülmektedir. Adı geçen bu bakterilerin *A.baumannii* olma ihtimali daha yüksek görünmektedir. Ek olarak 39, 40, 43, 47 ve 48 no' lu izolatlar ise yukarıda adı geçen özellikler bakımından *A.baumannii* ve *A. calcoaceticus*' a benzemekle beraber her birinin jelatin kullanımı (+) olması

düşündürcü bulunmuştur. Bu özelikleri ile *A. haemolyticus'* a ve isimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 6' ya da benzemektedirler.

Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanmayan izolatlar içinde 15 ve 23 no' lu izolatlar da BLASTN sonucu %98-99 benzerlik oranı ile *Acinetobacter sp.* olarak tanımlanmıştır. Bu iki izolatın da Glukozdan asit oluşumu (+), sitrat (+), hemoliz (-) ve jelatin kullanımı (-) olmaları nedeniyle hem *A. baumannii* ve hem de *A. calcoaceticus*' a eşit dercede benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 4.1' de Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi tarafından 19, 41 ve 44 no' lu üç izolat sırası ile %94, %93 ve %98 benzerlik oranında *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. BLASTN programı ile de aynı izolatlardan 41 ve 44 no' lu izolatlar sırası ile %99 ve %98 benzerlik oranı ile yine aynı bakteriye benzetilirken, yine sırası ile %98 ve %98 benzerlik oranı ile kültüre edilememiş *Acinetobacter sp*. klonu 91_11' e benzetilmiştir. 19 no' lu izolatımız ise %97 benzerlik oranı ile *Acinetobacter genomosp*. 3 ırkı LUH 6127'ye %98 benzerlik yüzdesi ile benzetilmiştir. Bu iki izolatımıza (41 ve 44 no' lu izolatlar) ait Vitek 2 ve BLASTN sonuçları oldukça özdeş görünmektedir. Hatta BLASTN sonuçlarının daha yüksek benzerlik oranında olması da bu bakteri için daha başarılı tanımlama yapmış olduğunu göstermiştir.

Adı geçen bu üç izolata ait bizim yaptığımız biyokimyasal test sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) referans kitabında ilgili türe ait sonuçlarla karşılaştırılarak aşağıdaki çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Acinetobacter haemolyticus* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *A. haemolyticus* 'un biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması.

İzolat No	**İzolatın Adı**	**Gram boyama / Hücre şekli**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**Glukozdan asit oluşumu**	**Sitrat kullanımı**	**Hemoliz**	**Gelatin kullanımı**
Bergey's Manual (1994) kitabına göre	*Acinetobacter baumannii*	Gram- / basil	+	-	95[a]	+	-	-
	Acinetobacter haemolyticus	Gram- / basil	+	-	52[a]	91a	+	+
	Acinetobacter calcoaceticus	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 3	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 6	Gram- / basil	+	-	66[a]	+[b]	+	+
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 10	Gram- / basil	+	-	+	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 11	Gram- / basil	+	-	-	+	-	-
	İsimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 12	Gram- / basil	+	-	33[a]	-	-	-
19	A154 M	Gram - / basil	+	-	+[z]	+	-	-
41	A37K	Gram - /basil	+	-	+[z]	+	-	+
44	A73 / K-3	Gram - / basil	+	-	+	+	-	+

a= sayısal ifadeler pozitif suşların sayısal oranını iface etmektedir, b= bir yada iki ototrofik suş haricinde hepsi pozitif anlamındadır

Bizim yaptığımız biyokimyasal test sonuçlarına göre, bu üç izolat içinde 19 no' lu izolatımız Glukoz (+), Sitrat (+), hemoliz ve jelatin kullanımı (-) olması ile *Acinetobacter calcoaceticus*' ün adı geçen özelliklerine yakın bulunmuştur. 41 ve 44 no' lu izolatlarımız ise tıpkı diğer *Acinetobacter sp*. izolatları gibi, yukarıda adı geçen özellikler bakımından *A.baumannii* ve *A. calcoaceticus*' a benzemekle beraber her birinin jelatin kullanımı + olması düşündürcü bulunmuştur. Bu özelikleri ile *A. haemolyticus'* a ve isimlendirilmemiş *Acinetobacter* türü 6' ya da benzemektedirler.

Bu bakış açısı ile literatür incelendiğinde *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* ve *A. haemolyticus*' un çok yakın akraba olmaları nedeniyle fenotipik olarak tanımlanmasının güç olduğu ifade edilmektedir (Misbah ve ark., 2005). Bu nedenle son yıllarda, bakteriler, floresan işaretli hedeflendirilmiş rRNA oligonukleotit proplar yardımı ile mikroskopik olarak tanımlamaktadır ve *Acinetobacter sp.* türleri için bu yöntemle (Wagner ve ark., 1994) ve pek çok farklı moleküler yöntem ile yapılmış (Lu ve ark., 2000; Vanbroekhoven ve ark., 2004) çalışmalar vardır.

Yine Çizelge 4.1. incelendiğinde 27 no' lu izolatımızın Vitek 2 sistemi tarafından *Brevibacillus laterosporus'* a % 85 benzerlik oranı ile benzetildiği görülmektedir. BLASTN sonucunda ise aynı bakteri *Bacillus sp.* cp-h19' a ve *Bacillus cereus* ırkı KSC_SF6 e' ye aynı benzerlik oranı (%99) ile benzetildiği görülmektedir. *Brevibacillus laterosporus* ilk defa Laubach (1916) tarfından *Bacillus laterosporus* olarak tanımlanmış ve Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Claus ve Berkeley, 1984) referans kitabında da bu isimle yer almaktadır. Ancak bu bakteri Shida ve arkadaşları (1996) tarafından *Brevibacillus laterosporus* olarak önerilmiş ve 2006 yılından beri bu adla kullanılmaktadır. Gram pozitif, basil formunda tıpkı diğer *Bacillus sp*. genusu üyeleri gibi spor oluşturan bir bakteri türüdür. Bu bakterinin sporları kanoid şekilli olup lateral konumludurlar. Ayrıca bu türün parasporal kristallerinin varlığı da bilinmektedir. Dolayısı ile bu türün diğer *Bacillus sp.*' lerden ayırımı hem moleküler ve hem de otomatik tanımlama sistemi için karmaşa yaratabilmektedir. Bergey's Manual of Determinative Bacteriolgy (1984)' de bu bakteriye ait özellikler araştırılmış ve aşağıdaki çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *Brevibacillus laterosporus* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Bacillus laterosporus* / *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*'in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması.

İzolat no	İzolatın adı	Gram boyama / Hücre şekli	Spor boyama	Kat.	Oks.	A. D.	L. D.	β-PHB	%10 tuzlulukta büyüme	Protein hidrolizi	Jelatin kullanımı	Nişasta kulllanımı	Nitratı nitrite indirgeme
Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology (1994) kitabına göre	*Bacillus cereus*	Gr +/basil	Sporlu	+	-	d	-	+	ND	+	+	+	+
	Bacillus thuringiensis	Gr +/basil	Sporlu	+	d	d	-	+	ND	+	+	+	+
	Bacillus laterosporus	Gr +/Basil	Sporlu	+	-	θ	θ	θ	-	+	d	-	+
27	301 / İK3-2	Gr+/Basil	Sporlu	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+

Kat.=katalaz testi, Oks.=Oksidaz; A.D.=Arjinin dekarboksilaz; L.D.= Lizin dekarboksilaz; β-PHB_beta polihidroksi butirat; d= %11-89 pozitif; θ= bilinmiyor; ND= bilinen bir veri yok

Çizelge 4.5' in devamı

İzolat no	İzolatın adı	VP testi	Sitrat kullanımı	Glukozdan asit oluşturma	G.G.O.*	Arabinoz	Ksiloz	Mannitol	Sorbitol	Sukroz	Laktoz
Bergey's Manual (1994) kitabına göre	*Bacillus cereus*	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	Bacillus thuringiensis	d	+	+	-	-	-	-	θ	θ	θ
	Bacillus laterosporus	-	-	+	-	-	-	+	θ	θ	θ
27	301 / İK3-2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+

G.G.O.= Glukozdan Gaz Oluşumu; VP=Voges Prokauer; d= %11-89 pozitif; θ= bilinmiyor

Çizelge 4.5 incelendiğinde 27 no' lu izolatımızın Nişasta kullanımı (+) , sukroz (+) ve laktoz (+) olması ile *B. cereus'*a diğer özellikleri ile de *Brevibacillus laterosporus'* a benzemektedir. BLASTN sonucu %99 benzerlik oranında *Bacillus sp.*' ye benzetilmiş olsa da biyokimyasal test sonuçlarımız, bu izolatın *Brevibacillus laterosporus* olduğunu desteklemektedir.

Çizelge 4.1' de Vitek 2 tanımlama sistemi tarafından %99 benzerlik oranı ile *Brevundimonas diminuta* / *Brevundimonas vesicularis* olarak tanımlanan 31 no' lu izolatımız BLASTN programı tarafından *Acinetobacter genomosp*. 3 strain LUH 6127' ye ve *Acinetobacter sp*. LUH 1469' a aynı benzerlik oranı (%98) ile benzetilmiştir.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) referans kitabında *Brevundimonas diminuta* / *Brevundimonas vesicularis* Gram negatif, oksidaz (+), yarı viroid veya viroid şekilli, hareketsiz, sporsuz ve bazen sarı-turuncu pigmentli bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Claus ve Berkeley, 1994). Bu bakteriye ait bizim yaptığımız biyokimyasal testlerle Bergey's Manual Determinative Bacteriology referans kitabından alınan bu türe ait biyokimyasal test sonuçlarını içeren bir çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *Brevundimonas diminuta / B. vesicularis* izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Brevundimonas diminuta / B. vesicularis'* in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması.

İzolat No	**İzolatın Adı**	**Gram boyama / Hücre şekli**	**Spor Boyama**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**Glukozdan asit oluşumu**	**A.D.**	**Jelatin Kullanımı**	**Ksiloz**	**Laktoz**	**Sukroz**	**Mannitol**
Bergey's Manual (1994) kitabına göre	*Brevudimonas diminuta*	Gr -/Vibriobasil	Sporsuz	+	+	d	-	d	-	-	-	-
	Brevundimonas vesicularis	Gr -/Vibriobasil	Sporsuz	+	+	d	-	d	d	-	-	-
31	461 / İK4	Gr -/Vibriobasil	Sporsuz	+	+	+	R.V.	-	+	-	-	-
d= %11-89 pozitif; R.V.= Reaksiyon vermedi; A.D.= Arjinin dekarboksilaz												

Bizim yaptığımız biyokimyasal testler ile karşılaştırıldığında 31 no' lu izolatın *Acinetobacter sp.*'den çok *Brevundimonas diminuta / vesicularis* ikilisinin sonuçlarına benzediği görülmektedir. Ancak bu ikiliden içinden glukoz ve ksiloz (+) oluşu nedeniyle *Brevundimonas vesicularis*' e benzetilmiştir. BLASTN sonucu elde edilen *Acinetobacter sp.* ihtimalinden uzaklaşılmasının en büyük nedeni 31 no' lu izolatın oksidaz (+) oluşudur. Çünkü *Acinetobacter sp.* türleri oksidaz (-)' tirler.

Çizelge 4.1' de görüleceği gibi 42 no' lu izolat, Vitek 2 sistemi ile tanımlama sonucu % 91 benzerlik oranı ile *Brucella melitensis* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatın BLASTN sonucu incelendiğinde aynı benzerlik oranı (%99) ile kültüre edilemeyen *Acinetobacter sp*. klonu MRT-87 ve *Acinetobacter sp*. MN33' e benzetilmiştir.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabına göre, *Brucella melitensis* Gram negatif, kok-kokobasil formunda, mikroskopta kısa zincirli ya da tek tek konumlanmış olarak görülürler (Claus ve Berkeley., 1994). Bu ve benzeri özellikleri ve yapılan biyokimyasal test sonuçlarını içeren bir çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *Brucella melitensis* izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Brucella melitensis'* in biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology referans kitabından karşılaştırılması.

İzolat No	**İzolatın Adı**	**Gram Boyama / Hücre Şekli**	**Spor Boyama**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**Glukozdan asit oluşumu**	**Hareketlilik**	**Jelatin Kullanımı**	**Ksiloz**	**MR**	**VP**
Bergey's Manual (1994) kitabına göre	*Brucella melitensis*	Gram -/kokobasil	sporsuz	+	d	+	-	-	-	-	-
42	A41 /K-2	Gram -/kokobasil	sposuz	+	-	-	-	-	-	-	-
d= %11-89 pozitif; A.D.= Arjinin dekarboksilaz											

Çizelge 4.7 incelendiğinde 42 no' lu izolatın *Brucella melitensis'* e jelatin kullanımı (-), MR (-), VP (-), Ksiloz (-), hareketlilik (–) oluşu ile büyük ölçüde benzediği görülmektedir. Tür seviyesinde tanımlama seviyesinde bu izolatımız için de Vitek2 daha başarılı bulunmuştur.

Bu doktora tez çalışması kapsamında tanımlanan son izolat 34 no' lu izolattır. Bu izolat Vitek 2 sistemi ile tanımlanamamış izolatlarımız arasında yer almaktadır. BLASTN sonucu ise bu izolatımız %98 eşit benzerlik oranı, *Staphylococcus pasteuri* strain EIV-2 ve *Staphylococcus sp*. DJ11'ye benzetilmiştir. Bu bakteri ilk defa 1993 yılında Chesneau ve arkadaşları (1993) tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle elimizde bulunan Bergey's Manual Systematic Bacteriology (Claus ve Berkeley, 1984) ve Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Claus ve Berkeley.,1994) referans kitaplarında yer almamaktadır. Bu referanslarda *Staphylococccus sp.*' ye ait genel özellikler incelendiğinde bu cinsin Gram pozitif, kok formunda, sporsuz, hareketsiz, fakültatif anaerop ve katalaz (+), oksidaz (d= %11-89 +), % 10 tuzlulukta büyüme özelliği olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Claus ve Berkeley 1994). 34 no' lu bu izolatımız tüm bu özellikleri üzerinde toplamakla birlikte BLASTN ile tanımlama ile benzetildiği *Staphylococcus pasteuri'*ye ait ayırt edici biyokimyasal testlere ulaşılması gerekliliği oluşmuştur. Yapılan literatür araştıması ile Chesneau ve arkadaşlarının (1993) çalışmalarına ulaşılmış ve bu yeni türü tanımlama kriterleri temel alınarak bir çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. 193 / İK2-2 izolatına ait biyokimyasal test sonuçları ile *Staphylococcus pasteuri'* nin biyokimyasal özelliklerinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ve Chesneau ve ark. (1993)' e göre tanımlanması.

İzolat No	**İzolatın Adı**	**Gram boyama / Hücre şekli**	**Spor boyama**	**Katalaz**	**Oksidaz**	**Nitratı nitrite indirgeme**	**Hareketlilik**	**% 10 tuzlulukta büyüme**	**FA/ A**	**A.D.**
Bergey's Manual (1994)' e göre	*Staphylococcus sp.*	Gram + / Kok	Sporsuz	+	d	+	-	+	FA	d, z, b.
34	193 /İK2-1	Gram + / Kok	Sporsuz	+	-	+	-	$+^{y}$	FA	b
d= %11-89 pozitif; A.D.= Arjinin dekarboksilaz; $+^{z}$=zayıf üreme; +y= yoğun üreme; b=belirlenemedi										

Çizelge 4.8' in devamı

İzolat No	**İzolatın Adı**	**Pigment oluşumu**	**Jelatin kullanımı**	**Kazein Hidrolizi**	**A.D.**	**FA /A**	**Trehaloz**	**Mannoz**	**Laktoz**	**Mannitol**	**V.P.**
Chesneau ve ark. (1993)' e göre *Staphylococcus pasterui suşları*	BM 9357	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	BM 9359	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	BM 9363	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
	BM 10507	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
	BM 10425	-	+	+	+	+	+	-	$+^{z}$	+	+
	BM 10426	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	BM 10 427	-	+	+	+	+	+	-	$+^{z}$	+	+
34	193 /İK2-1	-	-	-	b.	+	+	+	-	-	-
A.D.= Arjinin dekarboksilaz, b=belirlenemedi; FA / A= Fakültatif anaerop /Aerop; V.P.=Voges-Preskauer											

Çizelge 4.8 incelendiğinde 34 no' lu izolatın *S. pasteuri'* nin farklı suşlarına benzemekle birlikte farklı bir alt tür olma olasılığının yüksek olduğu görülmektedir. BLASTN tarafından %98 benzerlik oranı ile benzetildiği *Staphylococcus pasteuri* strain EIV-2' ye ait ayırt edici biyokimyasal testlere herhangi bir şekilde yayınlanmadığı için ulaşılamamıştır. Sadece Rhee ve arkadaşları tarafından bitki kök hücrelerinden endofitik bir bakteri olarak izola edildiği ve 08.Ocak.2009' ta NCBI' a dizi girişinin yapıldığı bilgisine ulaşılmıştır. Bu bakteri soyu ile ilgili henüz yayınlanmış bir veri bulunmamaktadır. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&RID=1SBRGFTH013&log%24=nucltop&blast_rank=1&list_uids=223016874).

4.2. Antibiyotik ile Ağır Metal Dirençliliği Arasındaki Etkileşim

İzmit Körfezi' nden izole edilen 1 izolat (*Sphingomonas paucimobilis*) hariç diğer izolatların tamamının en az 2 ağır metale ve antibiyotiğe dirençli olması çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği arasındaki etkileşime işaret etmektedir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Marmara Denizi, İzmit Körfezi ve Karadeniz izolatlarında çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliğinin karşılaştırılması (M=Marmara Denizi, K=Karadeniz, İK= İzmit Körfezi).

Ağır Metaller	Antibiyotikler	İzolat Sayısı			Toplam
		M	İK	K	
1	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	1	-	1
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
2	1	-	-	-	-
	2	2	8	1	11
	3	1	1	-	2
	4	-	-	-	-
	5	-	1	-	1
3	1	-	-	-	-
	2	3	4	1	8
	3	2	2	3	7
	4	-	1	2	3
	5	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	3	5	2	10
	3	-	4	1	5
	4	-	1	2	3
	5	-	-	1	1
Toplam		11	28	13	52*

*53 izolattan 1' i (İzmit Körfezi' nden izole edilen *Sphingomonas paucimobilis*) tüm ağır metallere karşı hassas olduğu için bu çizelgede yer almamıştır.

Ağır metal dirençliliğine sahip İzmit Körfezi ve Karadeniz izolatları 5 antibiyotiğe (spektinomisin, ampisilin, trimentoprim-sulfamethoksazol, streptomisin ve kloramfenikol) kadar direnç gösterirken, ağır metal dirençliliğine sahip Marmara Denizi izolatları ampisilin, kloramfenikol ve spektinomisin adlı 3 antibiyotiğe (*Acinetobacter baumannii* örneğinde olduğu gibi) veya trimentoprim-sulfamethoksazol (*Bacillus cereus / B. thuringiensis*) dayanıklılık göstermiştir. Örnek toplama istasyonlarına bakılmaksızın test edilen tüm ağır metaller ile en az 2 antibiyotiğe (ampisilin ve kloramfenikol) dirençlilik, ağır metal dirençliliği gösteren izolatların çoğunda gözlenmiştir.

4.3. Hücre Dışı Enzim Üretimi ile Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği Arasındaki Etkileşim

Hücre dışı enzim üreticisi izolatların büyük çoğunluğu Gram pozitif *Bacillus* cinsine aittir. Çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliğine sahip bu cinsin test edilen enzimler içinde en az 5 tanesinin (katalaz, nitrat redüktaz, jelatinaz, amilaz ve proteaz %47,3 oranında) üreticisi olduğu görülmektedir. İçlerinden 5 izolat selülaz üreticisi iken tamamı hem amilaz ve hem de proteaz üreticisidirler. Üstelik İzmit Körfezi' nden izole edilen *B. cereus / B. thuringiensis* izolatlarından 1 tanesinin (257 / İK3-1 adlı izolat) test edilen tüm enzimleri ürettiği görülmektedir. Ek olarak, Vitek 2 Kompakt otomatik tanımlama sistemi tarafından tanımlanamamış Gram pozitif özellikte ve en az 5 enzimin üreticisi izolatların çoğunda, çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği bulunmaktadır. Gram negatif izolatlar arasında *Acinetobacter sp.* cinsini temsil eden grup doktora çalışması kapsamında örnekleme istasyonlarından çok sayıda izole edilmiş, seçilmiş izolatlar içinde en baskın cinsi oluşturmuştur. İzmit Körfezi ve Marmara Denizi çoklu ağır metal ve antibiyotik dayanıklılığına sahip izolatları en az 2 enzim (katalaz ve nitrat redüktaz %61,9 oranında) üretebilen bu cinse aittirler. Bununla beraber, çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençli Karadeniz izolatlarının içinde bu genusa ait olanların ise 5 enzimin üreticisi olduğu görülmektedir. Çoğu endüstüriyel öneme sahip bu enzimler arasında *Acinetobacter* cinsine ait izolatların 6 tanesi proteaz, ve 1 tanesi de amilaz üreticisidir. Bu genusa ait izolatların hiçbiri selülaz enzimi üreticisi değildir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Seçilmiş 53 izolatın hücre dışı enzim üretimi, antibiyotik ve çoklu ağır metal dirençliliği arasındaki etkileşim.

İzolatın Adı	Antibiyotik Dirençliliği (toplam 8 adet)	Ağır Metal Dirençliliği (toplam 5 adet)	Vitek 2 Kompakt ile Tanımlanma Adı	Gram boyama	Hücre Dışı Enzim Varlığı						
					Katalaz	Oksidaz	Nitrat redüktaz	Jelatinaz	Amilaz	Proteaz	Selülaz
42 / İK1-1	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
42 / İK1-2	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
42 / İK1-3	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
43 İK1	2	3	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	-
45 İK1	2	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
46 İK1	2	4	Tanımlanamadı	-	+	-	+	-	-	-	-
65 İK1	3	1	*Sphingomonas paucimobilis*	-	+	+	+	B.*	-	-	-
96 İK2	1	0	*Sphingomonas paucimobilis*	-	+	-	+	+	+	+	-
171 İK2	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
181 İK2	3	4	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	-
189 İK2	2	4	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	-
193 / İK2-1	4	3	Tanımlanamadı	+	+	-	+	B.*	-	-	-
193 / İK2-2	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
235 İK3	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
237 İK3	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	-
257 / İK3-1	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	+
257 / İK3-2	3	3	Tanımlanamadı	-	+	-	+	-	-	-	-
301 / İK3-1	2	2	*Acinetobacter baumannii*	+	+	-	+	+	+	+	-
301 / İK3-2	2	2	*Brevibacillus laterosporus*	+	+	-	+	+	+	+	-
318 İK3	3	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
332 İK3	4	4	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	+
406 / İK4-1	3	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-

*B.=Belirlenemedi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.10' un devamı

İzolatın Adı	Antibiyotik Dirençliliği (toplam 8 adet)	Ağır Metal Dirençliliği (toplam 5 adet)	Vitek 2 Kompakt ile Tanımlanma Adı	Gram boyama	Hücre Dışı Enzim Varlığı						
					Katalaz	Oksidaz	Nitrat redüktaz	Jelatinaz	Amilaz	Proteaz	Selülaz
406 / İK4-2	3	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
406 / İK4-3	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
421 İK4	5	2	Tanımlanamadı	-	+	+	+	-	-	-	-
429 İK4	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
447 İK4	2	2	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	-
461 İK4	3	4	*Brevundimonas*	-	+	+	+	-	-	-	-
475 / İK4-1	2	4	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	+
A27 / K-1	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
A31 / K-1	4	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	+	+	-
A36 K	5	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
A37 K	3	4	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	+	-	+	-
A41 / K-2	2	2	*Brucella melitensis*	-	+	-	+	B.	-	+	-
A73 / K-2	4	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
A73 / K-3	4	3	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	+	-	+	-
A77 / K-1	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
A78 / K-1	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
A78 / K-2	4	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
A79 K	3	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	-	-
A80 / K-1	3	3	Tanımlanamadı	+	+	-	+	+	+	+	+
A80 / K-2	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
A106 / M-1	2	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-

*B.=Belirlenemedi

Devamı arka sayfada

Çizelge 4.10’ un devamı

İzolatın Adı	Antibiyotik Dirençliliği (toplam 8 adet)	Ağır Metal Dirençliliği (toplam 5 adet)	Vitek 2 Kompakt ile Tanımlanma Adı	Gram boyama	Hücre Dışı Enzim Varlığı						
					Katalaz	Oksidaz	Nitrat redüktaz	Jelatinaz	Amilaz	Proteaz	Selülaz
A115 / M-1	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
A115 / M-2	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	-
A118 / M-1	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
A118 / M-2	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
A125 M	3	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	+	+	-	-	-	-
A139 M	3	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
A154 M	2	4	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	-	-	-	-
A155 / M-1	2	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
A155 / M-2	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
A156 M	3	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-

Bu aşamaya kadar seçilmiş 53 izolat için irdelenen çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği, çeşitli hücre dışı enzimlerin üreticisi olma gibi özelliklerin arasında herhangi bir etkileşimin olup olmadığına ilişkin elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış, bu ve benzeri çalışmalar ile karşılaştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

Toksik bileşenlerin varlığında mikroorganizmalar, seçime zorlanır ve sahip oldukları direnç geliştirme yeteneğine bağlı olarak hayatta kalabilirler (Hideomi ve ark., 1997; Mudryk, 2002; Mudryk 2005). Bu bakımdan İzmit Körfezi, Marmara Denizi ve Karadeniz' den elde edilen izolatlar, örnekleme bölgelerinde var olan şartlara direnç kazanmışlar ya da kazanmak zorunda kalmışlardır. Vitek 2 Otomatik tanımlama sistemine göre tanımlanan izolatların büyük çoğunluğunun *Acinetobacter sp.* (%50), ve *Bacillus sp.* (%38)' ye ait olduğu görülmektedir. Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar Galler Bölgesindeki kirletilmiş Taff Nehri' nden (Rochelle ve ark., 1988) ve Tel Aviv sahillerinde yapılan çalışmalardan (Reisfeld ve ark., 1972) elde edilen sonuçlar ile benzerdir. Daha önce yapılmış çalışmalarda da özellikle metal bulaşı olan çevrelerde *Bacillus sp.*' lerin varlığı (Hassan ve ark., 1996; Olukaya ve ark., 1997; Narita ve ark., 2003; Kamala-Kannan and Jea Lee, 2008) ve muhtemelen baskın olduğu (Kamala-Kannan and Jea Lee, 2008) rapor edilmiştir.

Beraber görülen metal ve antibiyotik dirençliliği, temel biyolojik bileşen (bio-esansiyel) olmaları nedeniyle veya metal ve/veya antibiyotiklerin yanlış kullanımı nedeniyle bakterilerin kazanmış olduğu en yaygın özelliklerdendir (DeSouza ve ark., 2006). Test edilen ağır metaller arasında, Pb^{+2} ve Cd^{+2} iz miktarda olsa bile biyolojik sistemler için zehirli (toksik) ve gerekli değilken, Cu^{+2}, Cr^{+3} ve Mn^{+2} gerekli (esansiyel) metaldirler (Türkmen ve ark., 2005). Mevcut çalışmada örnek toplama bölgelerine bakılmaksızın Cu^{+2}>Cd^{+2}>Cr^{+3}' ün göreceli olarak yüksek miktarlarına dirençli izolatlar gözlenmiştir. Sonuçlar, bu ağır metallerin örnek toplama bölgelerinde oldukça yoğun bir şekilde birikmiş olduğunu göstermektedir. Cd^{+2} ve Pb^{+2} boya endüstürisinde belirteç (markers) olarak bilinirken (Aksu ve ark., 1998; Lin ve ark., 2002), Cr^{+3} ve Cu^{+2}' nin metal sanayiinde izleyici (tracers) ve belirteç olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Jervis ve ark.,1993; Gallego ve ark., 2002; Loska

ve ark., 2004). Boya, petrol, plastik endüstürisinde ve böcek öldürücülerde kullanılan farklı ve çeşitli çözücülerin depolandığı tanklar, özellikle İzmit Körfezi civarında konumlanmıştır (Pekey ve ark., 2004) ve bu bölge kömür yakıtlı demir ve çelik endüstürisinden etkilenmektedir (Pekey 2006 a,b). Bu bağlamda tez çalışması kapsamında elde edilen ağır metal dayanıklılığı olan izolatlardan elde edilen sonuçlar ile İzmit Körfezi' nde daha önce yapılmış balıklar veya sediment üzerinde yapılan çalışmalarda (Tolun ve ark.; 2001, Pekey ve ark., 2004; Pekey 2006a,b) elde edilen sonuçlar ile ilişkilendirilebilir.

Örnek toplama istasyonlarına bakılmaksızın tüm izolatlar incelendiğinde, en yüksek antibiyotik dirençliliği yüzdesi kloramfenikol (%52,8) ve ampisilin (%50,9) için bulunmuştur. Kloramfenikol kullanımı çok ciddi yan etkilere (aplastik anemi vbg) sahip olmasına rağmen düşük maliyeti nedeniyle özellikle gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Penisilin grubu antibiyotiklere ait bir ilaç olan ampisilin, bakteriye bağlı infeksiyonlarda yaygın olarak kullanılan aynı zamanda yoğun tüketilen bir antibiyotiktir ve bu antibiyotiğe yüksek direnç başka çalışmalarda (Zemelman ve ark., 1980, De Souza ve ark., 2006) da rapor edilmiştir. İzolatlarımızda antibiyotiklere karşı göreceli olarak yüksek dirençliliğin varlığı, ülkemiz hastanelerinde bu antibiyotiğin çok yaygın olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Matyar ve ark., 2004) ve bunların atıkları şehir kanalizasyon sistemi ile denize akıtılmaktadır. Üstelik bu varsayımla ilişkili olarak, mevcut çalışma, baskın olarak izole edilen *Acinetobacter sp.*' nin yaygın antibiyotik kullanımına karşı gösterdiği dirençliliğe ve özellikle hastane ortamlarında antibiyotik dirençlilik genlerinin kaynağı olabilmesine dair yeteneğine dikkat çeken literatürde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Towner ve ark., 1991).

Son zamanlarda yayınlanmış bir çok çalışmada (Alonso ve ark., 2001, Summers 2002), doğal çevrede metal kirliliğinin olmasının, antibiyotik dirençliliğinde değişmeye ve bu değişimin devamlılığı üzerinde bir role sahip olabileceğini ifade edilmektedir. Mevcut çalışmada izolatların %25,4' ünde Cd^{+2} ve Cu^{+2}' a karşı çok yoğun dirençlilik gözlenmiştir. Ek olarak; metal-antibiyotik çifte dirençliliğinin görülme sıklığı, test edilen diğer antibiyotikler (sırası ile spektinomisin, trimentoprim-sulfamethoksazol ve streptomisin) için göreceli olarak

oldukça düşük (%16,7, %16,7, %8,3) iken, bu iki metal ve kloramfenikol ve ampisilin antibiyotikleri arasında %100 olarak hesaplanmıştır.

Muhtemelen ağır metal ve / veya antibiyotik dirençliliğine ilişkin plazmid ve / veya transpozonları kodlayan genlerin varlığının sağladığı avantajlar (De Souza ve ark., 2006) sayesinde, bu çalışma için seçilen izolatlarda, hem ağır metallere, hem de antibiyotiklere veya her ikisine birden dirençliliğin bulunduğu gözlenmiştir. Mevcut çalışmada en yoğun izole edilen tür olan *Acinetobacter sp.*' nin ağır metal ve antibiyotik dirençliliğine ilişkin kendinde doğal olarak bulunan plazmitlerin varlığına dikkat çeken (Towner ve ark., 1991) çalışmalar vardır. Ek olarak, bir izolat hariç kloramfenikole dirençli izolatların büyük bir çoğunluğunun, ampisiline de dayanıklılık göstermesi, (tıpkı ampisilin, kloramfenikol, co-trimethoksazol ve tetrasiklin dirençliliğine ait genetik kodları bir arada taşıyan ACCoT plazmiti gibi), kloramfenikol ve ampisiline dirençli genlerin de bir plazmit üzerinde taşınabileceğine işaret etmektedir. Çoklu antibiyotik ve ağır metal dirençliliğine dair benzer sonuçlar sadece İskenderun Körfezi' nde (Matyar ve ark., 2008) değil aynı zamanda Providence Nehri ve Narragansett Körfezi (Traxler and Wood, 1981) ve Antartika Denizi' nde de (De Souza ve ark., 2006) rapor edilmiştir.

Büyümenin durdurulması (inhibisyon), bir mikroorganizmaya kimyasal veya antibiyotiğin zehirleyici etkisinin ortaya çıkarılması için kullanılan bir yöntemdir ve mevcut çalışmada İzmit Körfezi, Marmara Denizi ve Karadeniz' den elde edilen izolatların metal ve antibiyotiklere dayanıklılığının ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır. Bununla beraber oksijen tüketimi (Slabbert ve Grabow, 1986), ATP seviyesi (Parker ve Pribly, 1984) veya enzim aktivitesi (Dutka ve Bitton, 1986) gibi diğer özellikler bir mikroorganizmaya bir ajanın zehirli etkisinin de olabileceğine işaret edebilmektedir. Bu son yaklaşımlar, mevcut çalışmada kullanılmış, izolatların sadece enzim üreticisi olup olmadığı değil, aynı zamanda eğer varsa enzim üretici olma özeliği ile ağır metal ve/veya antibiyotik dirençliliği arasında bir bağlantının varlığı araştırılmıştır. Bu çalışma dirençli izolatların enzim profilleri arasında bir çeşitlilik olduğunu göstermiştir. Özellikle Marmara Denizi ve İzmit Körfezi' nden elde edilen *Acinetobacter sp.* izolatları, diğer çoklu direnç gösteren izolatlar ile karşılaştırıldığında enzim üretecisi olma özelliği daha düşüktür. Bununla birlikte,

mevcut çalışmada iki izolatın dışında (96 / İK2 ve 65 /İK1) izolatların tamamı en az 2 veya daha fazla ağır metal ve antibiyotiğe direnç göstermiştir. Ancak çoklu direnç gösteren izolatlar ile yalnız bir antibiyotik veya ağır metale direnç gösteren izolatların enzim üreticisi olma yönünden karşılaştırılmaları mümkün değildir. Ancak çoklu enzim üreticisi izolatların içinde en az 5 enzimin hepsinin üreticisi olmaları dikkate değer bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

4.4. Tanımlanan İzolatların Çeşitli Özellikleri ve Yeni Araştırma Konuları İçin Sahip Oldukları Potansiyel

Elde edilen ve tanımlanan bakterilerin örnekleme istasyonları ve derinliklerine göre yapılmış dağılımı incelendiğinde (Çizelge 3.9) *A. baumanii*' nin 10-100 m arasında her derinlikte bulunabildiği, *B. cereus / B. thuringiensis'* in 10-40 m arasında sığ ve orta sularda, *A.haemolyticus, S.paucimobilis, B. melitensis, B. diminuta / B. vesicularis, B. laterosporus* ve Vitek 2 Kompakt ile tanımlanamayan bakterilerin ise 20-45 m arasında orta derinlikteki sularda bulunduğu gözlenmiştir. Bu da çalışma alanı kapsamında orta derinliklerdeki sularda bakterilerin yoğun bir şekilde bulunduğunun bir göstergesidir. Ayrıca 100 m derinlikte dahi bakteri izolasyonu yapılmış olması ise basınca ve laboratuvar koşullarına dayanıklılığı ile geniş bir yaşam yelpazesine sahip türlerin varlığına işaret etmesi bakımından önemlidir.

Bu açıdan tek tek izolatlara dair literatür incelendiğinde, *Acinetobacter baumannii* bakterisi çoklu ilaç dayanıklılığına sahip insanda dahil pek çok canlıda öldürücü olan bir patojendir (Nitzan ve Ashkenazi, 2001). Buna ek olarak lipolitik *Acinetobacter* sp. ırklarının var olduğu ve çeşitli kaynaklardan izole edildiği bildirilmiştir (Snellman ve ark., 2004). Son 10 yıl içinde yapılan çalışmalarda polisilik aromatik hidrokarbon (PAH)'ları parçalayabilen, özellikle küçük molekül ağırlığına sahip naftalen ve fenanteren bileşenlere çeviren bakteri cinsleri keşfedilmiştir. Bu bakteri cinsleri arasında *Acinetobacter* sp*., Bacillu* sp. ve *Sphingomonas sp.*'ler vardır (Zhang ve ark., 2004). Ayrıca *Penaeus stylirostris*

karidesinde hemolenf sıvısında sadece *Acinetobacter sp*. türlerine rastlanıldığı ifade edilmektedir (Buller, 2004). Bununla birlikte denizden elde edilmiş *Acinetobacter baumannii* türleri ile yapılmış bu anlamda herhangi bir biyoteknolojik çalışmayı içeren yayına rastlanmamıştır. Marmara denizden izole ettiğimiz *Acinetobacter baumannii* türleri, yaşadığı doğal ortam gereği farklı tuz, ısı ve pH şartlarına da dayanıklı olmalıdır. Marmara denizinde 100 metreden alınan örneğimizden bile izole edilebilmesi tüm yukarıdaki özelliklere ek olarak yüksek bir basınç dayanıklılığı olması gerektiğini düşündürmektedir. Elbette tüm bu özellikleri gerekli biyoteknolojik uygulamaları takiben, başta İstanbul Boğazı olmak üzere farklı denizlerde özellikle polisiklik aromatik hidrokarbon bileşiklerinin ve/veya kirliliğinin temizlenmesi için doğal bir kaynak olarak kullanılabilir.

Bacillus thuringiensis (Bt), bugüne değin toprak, çeşitli sivrisinek larvası yataklarından, Diptera, Koleoptera, Hemiptera gibi pek çok böcek cinsinden, stoklanmış ürünlerden ve çeşitli yiyeceklerden izole edildiği bildirilmiştir (Charles ve ark., 2000). Biyoteknolojik olarak önemi, sporulasyon sırasında üretilen protein yapılı δ-endotoxinlerin insektisidal etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu toksinleri kodlayan genler *Bt*' nin sahip olduğu plazmidler üzerinde kodlandığı bildirilmektedir (Knowles, 1994). Bu toksinlere kristal (Cry) sitolitik (Cyt) toksinler de denmektedir. Bu endotoksinler, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera takımına ait türler üzerinde özgül bir etkiye sahiptir (Broderick ve ark., 2006). Bu nedenle genetik mühendisliğinde *cry* genlerini içeren ve kanatlılara dayanıklı mısır, patates, soya fasülyesi türlerinin geliştirilmesi, biyolojik insektisitlerin yapımı çalışmaları önemlidir ve bu çalışmaları içeren yayınlara sıkça rastlandığı rapor edilmiştir (Charles ve ark., 2000). Bununla birlikte dünya literatüründe denizden elde edilmiş *Bacillus thuringiensis* türleri ile yapılmış bu anlamda herhangi bir biyoteknolojik çalışmayı içeren yayına rastlanmamıştır. Doğada çok sık bulunan bu bakterinin denizel şartlardan elde edilmesi şaşırtıcı bulunmamıştır. Burada ilginç olan topraktan kolaylıkla elde edilen *Bacillus thuringiensis* türlerine göre elbette denizden izole edilen türlerin, yaşadığı doğal ortam gereği başta tuz direnci olmasına ek olarak farklı ısı, basınç ve pH şartlarına da dayanıklı olmasının beklenmesidir.

Sphingomonas paucimobilis' in nozokomiyal hastane enfeksiyonu etkeni olduğu ve seftazidim ve amikasine dirençli olduğu ve tedavisi güç bir patojen olduğu bilinmektedir (Yalçın, 2000). Doğal habitatları bilinmemekle beraber (Reinhardt ve ark., 1979) sulardan izole edildiklerine de işaret edilmektedir (Smalley 1982). Neden olduğu hastane enfeksiyonları arasında bacaklarda oluşan ülserler de gösterilmektedir (Peel ve ark., 1979; Slotnick ve ark., 1979; Southern ve ark., 1981). Smalley (1982), bu bakteriyi sahip olduğu enzim profili nedeniyle fırsatçı bir patojen olarak tanımlamaktadır. Ayrıca *Sphingomonas paucimobilis'* in mukoid varyantları tarafından üretilen bir ekzopolisakkarit olan ve ticari olarak Gellan sakızı olarak adlandırılan bir madde üretir (Sá- Correia ve ark., 2002). Gellan sakızının mikrobiyolojik besiyerlerinin katılaştırılmasında agara eş değer bir özellik gösterdiğine (Shungu ve ark., 1983) ve yüksek büyüme sıcaklığına sahip hipertermofilik bakteriler için, normal agarın yüksek sıcaklıkta yumuşaması nedeniyle alternatif bir besiyeri katılaştırıcısı olduğuna dair çalışmalar vardır (Lin ve Casida, 1984). Bunlara ek olarak DNA izolasyonu ve elektrofez için hazırlanan agaroz (Cole, 1999) ve patojenlerin PCR temelli tayini için kullanılan taşıyıcı agar için de uygun bir bileşen olduğu bildirilmektedir (Rath ve Schmidt, 2001). Ülkemizde kendi denizel kaynaklarımızdan elde ettiğimiz ve/veya edebileceğimiz bu bakteri suşunu, benzer şekilde agara alternatif katılaştırıcı olarak kullanmak mümkün olabilir.

Pek çok *Brucella sp*. üyesi evcil ve vahşi hayvanlarda ciddi sonuçlar doğuran zoonotik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Whatmore ve ark., 2006). Şişe burunlu yunuslarda (*Tursiops truncatus*) yapılan bir araştırmada düşüklere yol açan Gram negatif, kokobasil formunda bir bakteri izole edilmiştir. Koloni morfolojisine bakıldığında tipik bir *Brucella sp*. özelliği gösteren bu bakteri 37ºC'ta 72 saatte iyi gelişen koloni *Brucella sp* olarak tanımlanmış fakat bilinen türlerinden farklı özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bunun yeni bir alttür yada serovar olduğu düşünülmüştür (Ewalt ve ark., 1994). Günümüzde çeşitli deniz memelilerinden izole edilen Gram negatif bakteri izolatları *Brucella sp*. olarak tanımlanmaktadır (Bricker ve ark., 2000). Bunların hızla tanımlanması için moleküler alt tipleme yapılması ve moleküler tanımlama yöntemlerinin ortaya konması önemlidir (Whatmore ve ark.,

2006). Farklı çalışmalarda, küçük Gram negatif kokobasiller foklardan, domuz balıklarından, su samurlarına kadar pek çok canlıda (Jahans ve ark., 1997), Minke balinasının dalak ve karaciğerinde (Clavareau ve ark., 1998) *Brucella sp*. olarak tanımlanmışlardır. İskoçya sularındaki memelilerden elde edilen izolatlar da *Brucella sp*. olarak rapor edilmiştir (Foster ve ark., 2002). Ayrıca geleneksel bir *Brucella sp*. türü 1995'te Kanada - Pangnirtung yakınlarından toplanan halkalı fokların (*Phoca hispida*) lenf nodüllerinden izole edilmiştir. 1996 yıllında Kanada-Magdelan adası yakınlarından toplanan bir kutup fokundan (*Phoca groenlandica*) da 5 *Brucella sp*. türü izole edilmiş ve bilinen türlerden farklı bulunmuştur. Bu biyovarların Kanada sularında ilk kez tespit edildiği bildirilmiştir (Forbes ve ark., 2000). Bunlar CO_2 ihtiyaçları, metabolik galaktoz ihtiyaçları, baskın antijenleri bakımından ve geleneksel yöntemlerle tanımlanmış, daha sonra PCR uygulamaları ile yeni bir alt tür olduğu gösterilmiştir (Clavareau ve ark., 1998). Diğer çalışmalarda ise, aynı izolasyon kaynaklarından elde edilen *Brucella sp* türlerini birbirinden ayırmak için DNA polimorfizim yöntemi (Cloeckaert ve ark., 2001), 16S rRNA gen analizi ile homolog dizilere sahip *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, ve *B. suis*.IS*711* türlerini birbirinden ayırmak için DNA parmak izi yöntemi kullanılmış ve deniz memelilerinden 23 izolat elde edilmiştir (Bricker ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda elde edilen izolatın daha önce denizlerimizden izole edildiğine dair bir yayına henüz rastlanmamıştır. Bu elde edilen *B. melitensis*'in yeni bir alttürü olma olasılığı vardır.

Akdeniz' de yapılan bir çalışmada ise, altı tane Gram negatif, çubuk şekilli, sporsuz bakteri izole edilmiştir. 16S rRNA gen analizi yapılan bu bakteri izolatları *Brevundimonas* cinsinden, *Brevundimonas intermedia*'ya (%99.4), *Brevundimonas vescularis*'e (%99.2) benzerlik göstermiştir. Bu çalışma kapsamında izole edilen V4.BO.10^T kodlu tür *Brevundimonas mediterranea sp.* olarak adlandırılmıştır (Fritz ve ark., 2005). *Brevundimonas diminuta*'nın enfeksiyonlara yol açması ve bu Gram negatif bakterilere yapılan antibiyotik çalışmaları ile ilgili Han ve Andrade (2005)' nin hazırladığı raporda, *Brevundimonas diminuta*'nın gerçekten florokuinolonlara dayanıklı olduğu ve böylece seçilebilirliğinin belirlendiği ifade edilmektedir (Han ve Andrade, 2005). Buna ek olarak bu bakteri türü bifenile adapte olmuş bakteri elde etmek için uygundur. İnkübe edilmiş toprak ve sediment örneklerine eklenmiş bifenil

kristalleri ile kirletilmiş ve kirletilmemiş örneklerde çalışılmıştır. Bu bakterinin bifenil parçalayabilen bilinen 177 bakteriden biri olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Wagner-Döbler ve ark, 1998). Bizim çalışmamızda elde edilen izolatın daha önce denizlerimizden izole edildiğine dair bir yayına henüz rastlanmamıştır. Bu bağlamda bizim izolatımızın yeni bir alttür olma ihtimali yanında yukarıdaki nitelikler yönünde incelenmesi ayrı bir çalışma konusu oluşturmaktadır.

Brevibacillus laterosporus bakterisinin ise aerobik, Gram pozitif, sporlu bir bakteri formu olduğu, spora yapışık ya da bitişik kano-şekilli, tabakalar halinde birikintiler (inklüzyonlar) üretebildiği bildirilmektedir (Huang ve ark., 2005; Krachkovskii ve ark., 2002). Huang ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan araştırmada, Nematotlara karşı *Brevibacillus laterosporus*'un G4 diye tanımlanan izolatının spora yakın (parasporal) kristal yapılarının dikkat çekici bir toksik aktivitesinin olmadığı, ancak 24 saatte Nematotlar üzerinde öldürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Homojenize edilmiş hücre dışı proteaz, nematisidal aktivitesi için kromotografi ile saflaştırılarak, hipotez doğrulanmıştır. (Huang ve ark., 2005). Tian ve arkadaşları (2007), araştırmalarında Nematotlara karşı mikrobiyal patojenlerde var olan proteaz aktivitesi gibi, virulans faktörleri etkileyen enzimlerin kullanılmasını önermişlerdir. Nematotlara karşı bu enfeksiyon etkisi, düzenlenen hücre dışı proteaz aktivitesinin bir sonucu olduğunu fakat canlı üzerinde etki mekanizmasının bilinmediğini ifade etmişlerdir. Bu çalışma ile hücre dışı alkalen proteaz üreten BLG 4 *Brevibacillus laterosprus* bakteri geninde gerçekleştirilen delesyonlar ile konukçu (Nematodun kendisi) kütikülasındaki yıkım ile nematosidal aktivite gösterilmiştir (Tian ve ark., 2007). Petrol arama alanlarında (Çin'de) yapılan bir çalışmada ise, yer tabakaları arasından açığa çıkan sudan elde edilen farklı ve aktif mikrobiyal topluluk içinde kemoheterotropik bakteriler (hidrokarbon okside edebilenler dahil) ve anaerobik fermentatif, sulfat- redükte edenler ve metanojenik bakteriler izole edilmiştir. Laboratuvar koşulları altında sıcaklığı, pH ve tuzluluğu tabakalar arası su ile aynı olan besiyerlerinde, izole edilen bakterilerin çoğunun ham petrolü ve geniş oranda hidrokarbonları, yağ asitlerini ve alkolleri kullanabildiği gösterilmiştir. Çalışma kapsamında, bu izolatlara ait 16S rRNA analizleri yapıldığında, bunların Gram pozitif olanlarının arasında *Bacillus sp, Brevibacillus sp.'* ler, Gram negatif

olanlarında ise *Pseudomonas sp.* ve *Acinetobacter sp*. cinsine ait bakteriler olduğu görülmüştür. Bu çalışma diğer cinslerin yanında *Brevibacillus* cinsi bakterilerin özelliklerine vurgu yapması bakımından önemli olup, çalışma ile elde edilen bir kısım izolatlar da yeni tanımlanmakta ve içlerinde yeni türler bulunduğu bildirilmektedir (Nazina ve ark., 2002). *Brevibacillus sp.'* lere vurgu yapan başka bir araştırmada, Malezya mısır plantasyonları halosfer, rizosfer ve endofitlerinden fitaz aktivitesini taramak üzere 200 bakteri izole edilmiş ve bunların 30 tanesinde fitaz üretimi tespit edilmiştir. Bu grup içinde fitaz üreten 10 tanesi ilk kez bu çalışmada ortaya konmuş ve elde edilen sonuçların çevre ve ticari uygulamalar için yeni bir fırsat olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Bu 30 bakteriden ayrılan grup içerisinde *Brevibacillus laterosporus* türü bakteri de yer almaktadır (Hussin ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda elde edilen bu izolatın da daha önce denizlerimizden izole edildiğine dair bir yayına henüz rastlanmamıştır. Yukarıdaki literatürde ifade edildiği gibi bu türünde çeşitli enzimler yönünden çok ciddi bir araştırma potansiyeline sahiptir.

Yukarıdaki literatür özetinden de anlaşılacağı gibi, araştırma kapsamında elde ettiğimiz türler pek çok araştırma konusunu içlerinde barındırmaktadır. Namatosidal etkiye sahip olması ile *Brevibacillus laterosporus*, PAH parçalama özellikleri ile yine *Brevibacillus sp.*'ler, *Acinetobacter sp*. ve *Bacillus sp.*'ler, çoklu antibiyotik dirençliliği göstermesi ile *Acinebacter baumannii* ve *Brevundimonas dimunata,*, ürettiği δ-endotoksinler ile çeşitli kanatlılara karşı özgün bir insektisidal etkiye sahip olması ve bu toksinleri üreten genlerin aktarımının yapılarak bu zararlılara doğal olarak dirençli yeni bitki türlerinin geliştirilmesinde kullanılabilmesi nedeniyle *Bacillus thuringiensis*, sahip olduğu patojenite ve izolasyon noktalarına göre gösterdiği genetik çeşitlilikte alt türlere sahip olması ile *Brucella melitensis*, sahip olduğu biyodegradatif ve biyosentetik yetenekleri ile *Spingomonas paucimobilis* önem arz etmektedir. Elde edilen izolatların tamamına yakını biyoteknoloji araştırmalar için kaynak oluşturması önemlidir ve çok sayıda yeni araştırma için kaynak oluşturmaktadırlar. Biyoteknoloji, çevre koruma, biyoinsektisit vbg pek çok çalışma alanında özgün ve yerel kaynak olarak kullanılmaları da mümkündür.

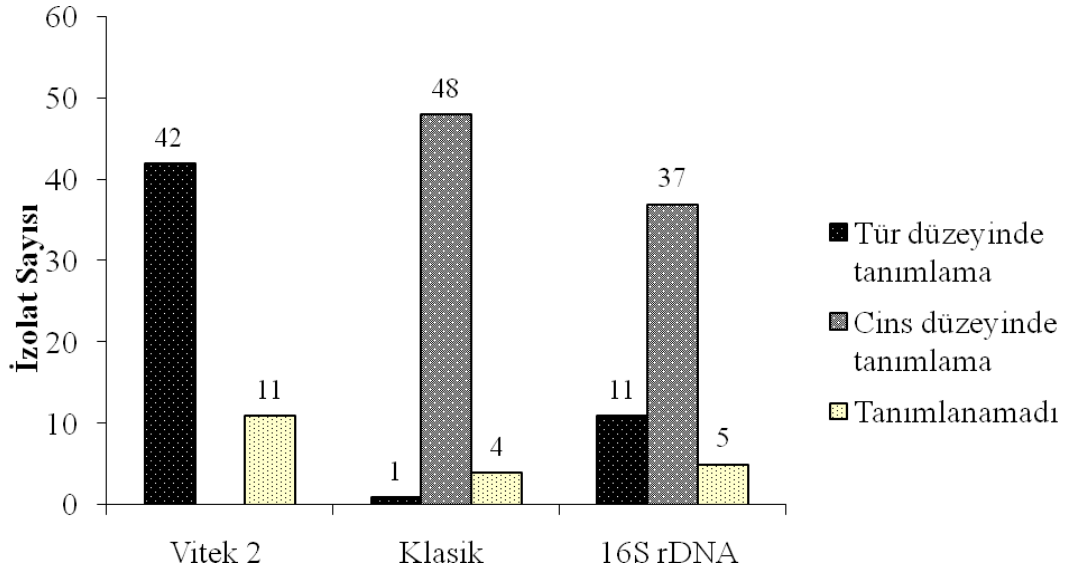
4.5. Seçilmiş 53 İzolatın Örnekleme İstasyonları ve Derinliklerine Göre Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliklerinin İncelenmesi

Seçilmiş 53 izolatın içinde Marmara Denizi 100 m örneklemesinden elde edilen tek örnek olan *Acinetobacter baumannii* (A106 M-1 no' lu izolat) öne çıkmaktadır. Bu izolatın hem elde edildiği derinlik ve hem de sahip olduğu çoklu ağır metal dirençliliği (Mn^{+2} dışında hepsine dirençli) ve çoklu antibiyotik dirençliliği (ampisilin ve kloramfenikole direnç) ile özel bir izolat olduğu düşünülmektedir. Bu izolat 100 m gibi bir derinlikte kazanmış olduğu basınca dirençli yapısı ile dikkate değer bulunmuştur.

Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanamamış 11 izolat incelendiğinde bu izolatların içinde 421 İK4 no' lu izolatın (İç Körfez 22 m derinlikten izole edilmiştir) klasik tanımlam yöntemi ile tanımlanamadığı ancak BLASTN ile *Acinetobacter sp.* cinsine dahil edildiği görülmüştür. Orta Körfezden izole edilen 3 izolattan 2' sinin (43/İK1, 301/İK3-1) BLASTN ile *Bacillus sp.* cinsine, 1 izolatın (193/İK2-1) ise klasik yöntemle de tanımlanamazken BLASTN ile *Staphylococcus pasteuri* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat yüksek tuzlulukta (% 10 w/v) üremesi ile öne çıkmakta ve sahip olduğu çoklu ağır metal (Cu^{+2}, Cr^{+3}, Pb^{+2}) ve antibiyotik dirençliliği (spektinomisin, streptomisin, ampisilin, kloramfenikol) ile dikkate değer bir araştırma konusu oluşturmaktadır. Dış Körfez' den izole edilen 6 tanımlanamamış izolatın 1' i diğer yöntemlerle *Acinetobacter sp.* olarak tanımlanırken, diğer 5 tanesi *Bacillus sp*. cinsine dahil edilmişlerdir. Karadeniz 44 m örneklemesinden izole edilen tek tanımlanamamış örnek ise klasik yöntem ve BLASTN ile *Acinetobacter sp.* cinsine dahil edilmiştir. Sonuç olarak, seçilmiş izolatların yoğunlukla *Acinetobacter sp.* ve *Bacillus sp.* cinsine mensup oldukları ve örnekleme bölgelerinde homojen bir dağılım gösterdikleri görülmektedir.

4.6. Genel Sonuçlar ve Değerlendirme

Genel olarak bakıldığında tez çalışması kapsamında. Vitek 2 otomatik tanımlama sistemi ile 11 izolat hariç toplam 42 izolat tür seviyesinde tanımlanabilmiştir. 16S rDNA dizilerinin BLASTN programı ile taranmasından elde edilen sonuçlara göre ise, 11 izolatın tür seviyesinde, 37 izolatın ise cins düzeyinde tanımlandığı, diğer 5 izolatın ise dizi yetersizliği vbg sebeplerden tanımlanamadığı anlaşılmaktadır. Fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal testlere dayalı klasik tanımlama sonucunda ise 48 izolatın cins 11 izolatın tür düzeyinde tanımlandığı ve 4 izolatın da tanımlanamadığı görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzolatların farklı tanımlama yöntemlerine göre tanımlanma düzeylerinin karşılaştırılması.

Bu bağlamda bizim izolatlarımız için Vitek 2 Otomatik Tanımlama Sistemi'nin tür seviyesinde tanımlama konusunda kütüphanesinde yer alan bakteri türlerine uyumluluğuna bağlı olarak daha başarılı olduğu düşünülmektedir.

Literatürde 16S rDNA dizi analizi ve Vitek 2 otomatik tanımlama sistemini kıyaslayan, tür ve cins seviyesinde tanımlama konusunun karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar özellikle Gram negatif, nonfermentatif basillerin doğru tanımlanması konusunda klasik biyokimyasal testlere olan bağımlılığa vurgu yapmaktadır. Burada vurgulanan bir diğer konu da Vitek 2 tanımlama kartlarının iyi veya çok iyi tanımlama olarak ifade ettiği tanımlamaların 16S rDNA dizi analizi ile tür seviyesinde doğru tanımlanabildiğidir (Zbinden ve ark., 2007). Bu nedenle tez çalışması kapsamında, tüm izolatlarımızın mevcut olanaklar ile gerçekleştirilebilen klasik biyokimyasal testlerinin sonuçları izolat için verilecek son tanımlama kararında kullanılarak her iki tanımlama sisteminde oluşan tanımlama farklılıkları aşılmaya çalışılmıştır.

Ancak olası yanlış Vitek 2 kolorimetrik kart seçiminden, ya da cihaza yapılan bakteri yüklemesinde doğru bakteri yoğunluğunun ayarlanamaması ya da el ile yapılan klasik tanımlama testlerinde oluşabilecek kişisel hataların önüne geçilmesi konusunda, 16S rDNA dizi analizi ile tanımlama (BLASTN) büyük ölçüde yol gösterici bir araç olduğu da açıktır. 16S rDNA dizi analizi ile yapılacak biyokimyasal testlerin doğru yönlendirilmesi ve Vitek 2 Otomatik Tanımlama Sistemi ile sonucun desteklenmesi ve son karar verilirken ayırt edici biyokimyasal testlere başvurulması, bilinmeyen bir izolatın tür seviyesinde tanımlaması konusunda doğru bir yaklaşım gibi görünmektedir. Bu şekilde bakteri tanımlanması konusunda zaman ve malzeme kaybının önüne geçilmesi sağlanabileceği düşünülmektedir.

Yukarıda ifade edilen tüm değerlendirmeler elimizdeki izolatların yeni tür ve alt tür olma olasılığına işaret etmektedir. Bu izolatlar aynı zamanda kendi denizlerimizden izole edilerek saflaştırılmış ve tanımlanmışlardır. Üstelik farklı özellikleri bilinen bir iç denizden (Marmara Denizi) izole edilmişlerdir. Bu tez çalışması ile en az yararlanılan doğal zenginliklerimizin başında gelen denizlerimizden ilgili kurum ve kuruluşların desteği de alınarak mikrobiyolojik zenginlikleri açısından incelenmiştir. İzolasyon aşamasında kullanılan deniz suları İstanbul Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, R/V Arar Gemisi personeli ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü ilgili

personel tarafından alınarak çalışmamıza destek verilmiştir. Bunun dışından Vitek 2 otomatik tanımlama cihazının kullanımı konusunda Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü çalışanlarından gerekli izinlerin alınması koşulu ile destek alınmıştır. Çalışmanın diğer aşamaları Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü mali desteği ile Biyoloji Bölümü imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu doktora tez çalışması kapsamında deniz suyu örneklemelerinin yapıldığı istasyonlar bulundukları denizin özelliklerini tam olarak taşımaları, şehir ve ev deşarjı almayan nokta ve derinliklerden alınacak şekilde seçilmiştir. Ancak elde edilen veriler ve literatür bilgisinin yoğun sanayileşme ve kirlilik etkenlerine maruz kalması nedeniyle Karadeniz, Marmara Denizi ve dolayısıyla İzmit Körfezi' nin barındırdığı mikrobiyolojik kütlenin bundan etkilendiğini işaret etmesi nedeniyle çalışma bu yönde de derinleştirilmiş ve kazanılmış çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği gibi özel yetenekleri de sorgulanmıştır. Ayrıca, kazanılmış ağır metal ve antibiyotik dirençliliği özelliklerinin izolatların çeşitli hücre dışı enzimleri üretebilme yeteneği üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı incelenmiş ve çalışma ile Cd^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin ikisine birden direnç gösteren izolatlar aynı zamanda kloramfenikol ve ampisiline de direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu da literatürle uyumlu olarak metal dirençliliği ve antibiyotik dirençliliğinin berabeerce bulunduğuna ilişkin delilleri güçlendirmiştir. Ayrıca bulunduğumuz bölgede adı geçen antibiyotiklerin gerek tıbbi, gerek farmasötik ve gerekse veteriner kaynaklı olarak sık kullanıldığına da dikkat çekmektedir.

Böylece, bu tez çalışması mevcut denizlerimiz için yapılacak çalışmaların bu yönde geliştirilerek irdelenmesi konusunda yeni bir bakış açısı getirmiş ve bu konudaki akademik çalışmalara katkıda bulunmuştur. Bu bağlamda üzerine çok az sayıda mikrobiyolojik çalışmanın bulunduğu bölgemiz denizlerinde yapılmış, konusunu deniz mikrobiyolojisinden alan ve tanımlanan izolatların özel yeteneklerine vurgu yapan ilk çalışmalardan biridir.

Bu çalışma ile elde edilen izolatların var olan ve yeni ortaya konmuş bazı özellikleri yeni araştırma projeleri için başlangıç biyolojik materyalini oluşturma

potansiyelleri bulunmaktadır. Üstelik bu doktora tez çalışması ile ülkemizi çevreleyen denizlerimizin yukarıda ifade edilen araştırma alanlarındaki çalışmalar için ne kadar büyük ve önemli bir kaynak olduğu da ifade edilmektedir. Deniz mikrobiyolojisi konusunda ülkemiz denizlerinde benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Daha önce de ifade edildiği gibi denizlerimizde yapılan çalışmalarda, balıklar, diğer deniz canlıları ve sediment üzerinde yoğunlaşmış ve daha çok patojen ve kirlilik indikatörü bakteriler üzerine odaklanılmıştır. Bu bağlamda bu doktora tez çalışması özgün bir çalışma olup, pek çok yeni araştırma konusuna öncülük edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Akçelik, M. (2000). Mikroorganizmalar ve Taksonomik Özellikleri, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Ünv. Yayınları, SİM Matbaacılık, Ankara, 2000.

2. Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P. and Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. International Journal of Antimicrobial Agents, 30, 177–182.

3. Aksu, A. E., Yasar, D., and Uslu, O. (1998). Assessment of marine pollution in Izmir Bay: heavy metal and organic compound concentrations in surficial sediments. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 22, 387–416.

4. Alexander, S. K. and Strete, D. (2001). Microbiology: a photographic atlas for the laboratory, New York, Benjamin Cumings Pub.

5. Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology, 3, 1–9.

6. Armstrong, J. L., Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. S. (1985). Deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis.* Journal of Bacteriology, 161, 39-46.

7. Aslan-Yılmaz, A., Okuş, E., and Övez, S. (2004). Bacteriological indicators of anthroogenic impact prior to and during the recovery of water quality in an extremely polluted estuary, Golden Horn, Turkey. Marine Pollution Bulletin, 49, 951-958.

8. Atlas R. M., (1997). Handbook of microbiological media, (Ed. Parks L. C.), Second Edition, CRC Press, Newyork, London, Tokyo.

9. Austin B, (1992). Marine microbiology. Cambridge University Press, New York, pp 171-173.

10. Backhaus, T. and Grimme, L.H., (1999). The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Chemosphere 38, 3291– 3301.

11. Balcı, H. ve Gümüşel, F. (Yüksek Lisans Tezi) (2004). Lipaz Üreticisi Yerel *Bacillus* Soylarının İzolasyonu, Nitelendirilmesi ve Gen Kütüphanelerinin Hazırlanması Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Gebze-KOCAELİ.

12. Battal, M. ve Gümüşel, F.(Yüksek Lisans Tezi) (2004). Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel *Bacillus* Soylarının İzolasyonu, Nitelendirilmesi ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Gebze-KOCAELİ.

13. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.

14. Benito, J. M., Lovrich, G.A., Siňeriz and Abate C. M., (2004). Environmental Microbiology. DOI: 10.1385/1-59259-765-3:003

15. Bernard, L., Shäfer, H., Joux F., Courties, C., Muyzer, G. and Laberon, P., (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. Aquatic Microbial Ecology, V:23, 1-11.

16. Beşiktepe, Ş., Özsoy, E., Latif, M. A. ve Oğuz, T., **(**2000). Marmara Denizi'nin hidrografisi ve dolaşımı. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Erdemli Deniz Bilimleri Enstitüsü. www.ims.metu.edu.tr/cv/ozweb/marms2000.doc

17. Bezverbnaya, I.P., Buzoleva, L.S. and Khristoforova, S., (2005). Metal-resistant heterotrophic bacteria in coastal waters of Mimorye. Russian Journal of Marine Biology, 31, 73-77.

18. Bhakuni, D.S. and Rawat D.S., (2005). Bioactive Marine Natural Products, Springer, Anamaya Publishers, New Delhi, India,

19. Bobbie, R.J. and White, D.C., (1980). Characterization of benthic microbial community structure by high solution gas choromotography of fatty acid methyl easters. Applied and Environmental Microbiology, V: 39, 1212-1222.

20. Bora, L. and Kalita, M. C. (2007). Occurance and extracellular enzymatic activity profiles of bacterial strains isolated from West Kamang district of Arunachal Pradesh, India. The Internet Journal of Microbiology, 4 1. http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePat=journals/ijmb/vol4n1/hotsprings.xml-Accessed 3 December 2008.

21. Bricker, B. J., Ewalt, D.R., Macmillan, A. P., Foster, G., and Brew, S., (2000). Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals, Journal of Clinical Microbiology, p. 1258–1262 Vol. 38, No. 3.

22. Broderick, N.A., Raffa, K.F., and Handelsman, J., (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity, PNAS, V: 103, No:41, 15196-15199, October,

23. Bruun, A. F., (1950) *The Galathea Deep Sea Expedition*,–52, Pp. 296. Allen and Unwin London, UK.

24. Buller, N.B., .(2004). Bacteria from fish and other aquatic animals. CABI Publishing, CAB International Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE UK.

25. Chandramohan, D., (1995). Recent advances in marine microbiology: Indian scenario, Journal of Marine Biotechnology, V:5, 73-81.

26. Chandrasekaran, M., (1997). Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. Journal of Marine Biotecnology, V: 5, 86-89.

27. Chandy, J.P., (1999). Heavy metal tolerance in chromogenic and non-chromogenic marine bacteria from Arabian Gulf. Environmental Monitoring and Assessment, 59, 321–330.

28. Charles, J. F., Delécluse, A., Nielsen-Le, and Roux, C., (2000). Entemopathogenic Bacteria: from laboratory to field application. Springer.

29. Chen, M. L. and Tsen, H.Y., (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rDNA and *gyr*B gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. Journal of Applied microbiology, 92, 912-919.

30. Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski H., and El Solh N., (1993). *Staphylococcus pasteuri* sp. nov. Isolated from Human, Animal and Food Specimens. V:43, no:2, p:237-244.

31. Claus, D. and Berkeley, RCW, (1984). Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) Bergey' s Manuel of Systematic Bacteriology V: 2, pp1105-1139. Williams and Wilins, Baltimore, USA.

32. Claus, D. and Berkeley, RCW, (1994). Bergey' s Manual of Determinative Bacterology (Nineth Edititon). Williams and Wilins, Baltimore, USA.

33. Clavareau, C. I., Wellemans, V., Walravens, K., Tryland, M., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckaert, A., Letesson, J. J. and Godfroid, J., (1998). Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology, V:144, 3267–3273.

34. Cloeckaert, A., Vergera, J. M., Grayona, M., Paquetb, J. Y., Garin-Bastujic, B., Fosterd, G., and Godfroidb, J., (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. Microbes and Infection, V:3, 729−738.

35. Cole, KD., (1999). Reversible gels for elektrophoresis and isolation of DNA. Biologycal Teqniques, V:26, 748-756.

36. Connon, A.S., and Giovannoni, S., (2002). High- throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Applied and Environmental Microbiology, V: 68 (8), 3878-3885.

37. Da Silva, R. F., Caugant, D. A., Eribe, E. R. K., Aas, J. A., Lingaas, P. S., Geiran, O. Tronsdat, L. and Ingar, O., (2006). Bacterial diversity in aortic aneurysmus determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. The Society for Vascular Surgery. 1055-1060.

38. De Long, E.F., **(**2001). Microbial Seascapes Revisited, Current Opinnion in Microbiology, V:4, 290-295.

39. De Souza, M. J., Nair, S., Bharathi, P. A. L., and Chandramohan, D. (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine Waters. Ecotoxicology, V:15, 379–384.

40. Demirel, Z. and Kulege, K. (2004). Heavy metal contamination in water and sediments of an estuary in southeastern Turkey. International Journal of Environment and Pollution, 21 (5), 499 – 510.

41. Dennis, L. and Sidie, J., (2001). Genetic analysis of marine gram (+) bacteria utilizing a 600bp 16s rDNA fragment. Journal of Pennsilvania Academic Science, 74:127.

42. Dutka, B. J. and Bitton, G., (1986). Toxicity tesing using microorganisms. Vol. 2, Boca Raton, CRC Press.

43. Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D.N. and Miller, W. G., (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Journal of Vetenarian Diagnostic Investigation, 6:448-452.

44. Fidan, A.F., Ciğerci, I.H., Konuk, M., Küçükkurt, I., Aslan, R., and Dündar, Y., (2008). Determination of some heavy metal levels and oxidative status in *Carassius carassius* L., 1758 from Eber Lake. Environmental Monitoring and Assessment, 147, 35–41.

45. Firat, O., Gök, G., Çoğun, H. Y., Yüzereroğlu, T. A., Kargın, F., (2008). Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. Environmental Monitoring and Assessment, 147, 117–123.

46. Fitch, W. M. and Margoliash, E., (1967). Construction of phylogenetic trees. Science. 155, 279-284.

47. Forbes, L. B., Nielsen, O., Measures ,L., and Ewalt, D. R., (2000). Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. Journal of Wildlife Diseases, 36(3), pp. 595–598.

48. Foster, G., MacMillan, A. P., Godfroid, Howie J. F., Ross, H. M., Cloeckaert A., Reid, R. J., Brew, S. and Patterson, I. A. P., (2002). A review of *Brucella sp.* infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Veterinary Microbiology, V: 90, 563–580.

49. Frette, L., Johnsen, K., Jørgensen, N. O. G., Nybroe, O. and Kroer, N., (2004). Functional characteristics of culturable bacterioplankton from marine and estuarine environments. International Microbiology V:7, 219–227.

50. Fritz, I., Nikitin, S.C. D., Lysenko, I. A. M. and Wolf-Rainer, A., (2005). *Brevundimonas mediterranea sp*. nov., a non-stalked species from the Mediterranean Sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, V:55, 479–486,

51. Gallego, J. L. R., Ordo´nez, A., and Loredo, J. (2002). Investigation of trace element sources from an industrialized area Avile´s, northern Spain using multivariate statistical methods. Environment International, V:27, 589–596.

52. Glare, T. R., and O'Callaghan, M., (2000). *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. Wiley, Toronto, Canada

53. GoTaq® Flexi Polymerase (M 8305) kullanıcı prospektüsü.

54. Güven, K. C., Ünlü, S., Çetintürk, K., and Okuş, E., (2004). Oil pollution Bosphorus, Golden Horn and Sea of Marmara after M/V GOTIA Ship Accident. Journal of Black Sea, Mediterranien Environment, V:10, 85-102.

55. Hagström, Å., Pinhassi, J. and Zweifel, U., (2000). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. Aquatic Microbial Ecology. V:.21, 231-244.

56. Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingersiev, F.,U¨ Tzhøft, C.H., and Jørgensen, S.E., (1998). Occurrence, fate and effects of

pharmaceutical substances in the environment. A review. Chemosphere 36, 357–393.

57. Han Xiang, Y. and Andrade, R. A., (2005). *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. Journal of Antimicrobial Chemotherapy V:55, 853–859.

58. Hassan, E. S., Banat, I. M., Shahawi, M. S. E., and Abu-Hilal, A. H. (1996). Bacterial, nutrients and heavy metal ions pollution assessment along the eastern coastal area of the United Arab Emirates. Journal of Aquatic Ecosystem Health, V:5, 73-81.

59. Hermansson, M., Jones, G.W., and Kjelleberg, S., (1987). Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. Applied and Environmental Microbiology V:53, 2338–2342.

60. Hideomi, N., Ishikawa, T., Yasunaga, S, Kondo, I., and Mitsuhasi S. (1977). Frequency of heavy-metal resistance in bacteria from inpatients in Japan. Nature,V: 266, 165–167.

61. Himedia-antibiyotik duyarlılık testi disk prospektüsü

62. Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K-L., (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The Science of the Total Environment 225, 109–118,

63. Höfte, H. and Whiteley, H. R., (1989). Insecticidal cyristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53:242-255.

64. Huang X. , Tian B., Niu Q., Yang J., Zhang L., and Zhang K., (2005). An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal cry tals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. Research in Microbiology 156, 719–727,

65. Hussin A. S. M., Farouk A. El- A, Greiner R., Salleh H.M. and Ismail A.F., (2007). Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from

Malaysian soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23:1653–1660.

66. Hutcheson, J., Morris, K. and Sidie.J., (1999). Isolation and characterization of Gr negative bacteria from The Gulf of Mexico. Journal of Pennysylvania Academic Science, 72:165.

67. Jahans, K.L., G. Foster, and Broughton, E.S., (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Veterinary Microbiology, 57 1373-382.

68. Jensen, G.B., Hansen, B. M., Eilenberg J. and Mahillon, J., (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology, 5 (8), 631-640.

69. Jervis, R. E., Ko, M. M. C., Junliang, T., and Puling, L. (1993). Multivariant analyses of trace element patterns for environmental tracking. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 169 2, 363–379.

70. Kamala-Kannan, S. and Jae Lee, K. (2008). Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunehan Bay Sediments, South Korea, Biotechnology, 71, 149-1.

71. Karbassi, A. R., Monavari, S. M., Nabi Bidhendi, Gh. R., Nouri, J., and Nematpour, K. (2008). Metal pollution assessment of sediment and water in the Shur River. Environmental Monitoring and Assessment, 147, 107–116.

72. Karpuzcu, M., Agiragaoglu, N., Alpaslan, N., Engin ,G., Gömann, H., Gunduz, O., Kocal, M., Oncel, S., Pekdeger, A., Voigt, H., Kuhr, P., Montzka, C., Tetzlaff, B., Vereecken, H., and Wendland, F., (2008). Integrated Modelling of Nutrients in selected river basins of Turkey: Results of a bilateral German-Turkish Research Project. Vol 17, 150-153. Forchungszentrums Julich, Germany.

73. Ki, J-S., Zhang, W. and Qian P-Y., (2009). Discovery of marine *Bacillus* species by rRNA and *rpo*B comparison and their usefulness for species identification. Journal of Microbiological Methods, V:77 (1), 48-57.

74. Klein, H. P., (1996). Microbiology, Chapter 19, Microbial Taxonomy, Third Edition, WCB Publishers, USA.

75. Knowles, BH., (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins, In *Advances in Insect Physiology*, (ed. PD Evans), Vol. 24, pp.275-308. Academic Press, London.

76. Koni, P. A., and Ellar D., (1994). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ-endotoxins. Microbiology. 1869-1880.

77. Kouker, G., and Jeager, E., (1987). Spesific and sensitive plate assay for bacterial lipases, Applied and Environmental Microbiology, p.211-213.

78. Krachkovskii, S. A., Sobol A. G., Ovchinnikova, T. V., Tagaev, A. A., Yakimenko, Z. A., Azizbekyan, R. R., Kuznetsova, N. I., Shamshina, T. N. and Arseniev, A. S., (2002). Isolation, biological properties, and spatial structure of antibiotic Loloatin A. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 28, No. 4, (2002), pp. 269–273. Translated from Bioorganicheskaya Khimiya, Vol. 28, No. 4, pp. 298–302.

79. Krumperman, P. H. (1985). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied Environmental Microbiology, 46, 165–70.

80. Kwon, K. K., Lee, H.S., Jung, S.Y., Yim, J.H., Lee, J.H., Lee, H.K., (2002). Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. The Journal of Microbiology, Vol. 40 No. 4: 260-266.

81. Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A. and Poulet, S.A., (2001). Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the suspectibility of juvenile oysters (*Crassostrea Gigas*) to *Vibrio Splendidus*. Applied and Environmental Microbiology, pp. 2304-2309.

82. Lancini, G. and Lorenzetti, R., (1993). Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites. Plenium Pres, NewYork and London.

83. Laubach, C. A., Rice, J. L. and Ford, W. W., (1916). Studies on aerobic sporebearing non-pathogenic bacteria. Part II Journal of Bacteriology, V.1, 493-533.

84. Lee, J.H., Shin, H.H., Lee, D.S., Kwon, K.K., Kim, S.J., Lee, H.K., (1999). Bacterial diversty of culturable isolates from seawater and a marine coral, *Plexauridae* Sp., near Mun-Sum, Cheju-Island. The Journal of Microbiology, P.193-199.

85. Lin, C. C., and Casida, JR. L. E., (1984). GELRITE as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, V: 47(2), 427-429.

86. Lin, Y. P., Teng, T. P., and Chang, T. K. (2002). Multivariate analysis of soil heavy metal pollution and landscape pattern in Changhua county in Taiwan. Landscape and Urban Planning, 62, 19–35.

87. Liu, D., Chau, Y. K. ve Dutka, B. J. (1989). Rapid toxicity assessment of water-soluble and water insoluble chemicals using a modified agar plate method. Water Research, 23: 333-339.

88. Loska, K., Wiechula, D., and Korus, I. (2004). Metal contamination of farming soils affected by industry. Environment International, V:30 (2), 159–165.

89. Lu, J. J., Perng, C-L., Lee, S-Y., Wan, C-C, (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestion for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. Journal of Clinical Microbiology. 2076-2080.

90. Madigan, M. T., Martinko J, and Parker J., (2004). Brock Biology of Microorganisms (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, NewYork, USA.

91. Maehly, A. C. and Chance, B., (1954). The assay of catalases and peroxidases Methods of Biochemical analysis, 1:357-424.

92. Matyar F., Kaya A., and Dinçer, S., (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and

sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment, 407, 279-285.

93. Matyar, F., Dinçer, S., Kaya, A., and Çolak O. (2004). Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. Annals of Microbiology, 54 (2), 151-160.

94. McConnell, D. J., Cantwell, B. A., Devine, K. M., Forage, A. J., Laoide, B. M., O'Kane, C., Ollington, J. F. and Sharp, P. M. (1986). Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. Annual New York Academy of Science, 469, 1–17.

95. Mergaert J., Verhelst, A., Cnockaert, M. C., Tan, T. J. and Swings, J., (2001). Characterization of facultative oligotrophic bacteria from Polar Seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA Seguences, System. Applied Microbiology, V: 24, 98-107.

96. Meyers, S., (2000). Development of aquatic microbiology. International Microbiology, 3:203-211.

97. Misbah, S., Hassan, H., Yusuf, M. Y., Hanifah, Y. A., and AbuBakar, S., (2005). Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med. J. 46(9):461.

98. Morris K., Hartzell E., Mentzer B. and Sidie J., (2001). Growth of Gram (+) Bacteria in Seawater Enriched Media. Journal of Pennysilvania Academic Science, 74:140,

99. Mudryk, Z. J., (2002). Antibiotic resistance among bacteria inhabiting surface and subsurface water layers in estuarine Lake Gardno. Polish Journal of Environmental Studies, 11 4, 401-406.

100. Mudryk, Z. J., (2005). Occurrence and distribution antibiotic resistance ofheterotrophic bacteria isolated from a marine beach. Marine Pollution Bulletin, 50, 80–86.

101. Nair, S., Chandramohan, D., and Loka Bharathi, P.A. (1992). Differential sensitivity of pigmented and non-pigmented marine bacteria to metals and antibiotics. Water Research, 26 (4), 431-434.

102. Narita, M., Chiba, K., Nishizawa, H., Ishii, H., Huang, C. C., Kawabata, Z., Silver, S., and Endo G. (2003). Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. FEMS Microbiology Letters, 233, 73–82.

103. Nazina, T. N., Grigor'yan, A. A., Xue, Y.F., Sokolova, D. Sh., Novikova ,E. V., Tourova, T. P., Poltaraus, A. B., Belyaev, S. S., and Ivanov, M. V., (2002). Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Daqing Oil Field, Microbiology, Vol. 71, No. 1, (2002), pp. 91–97. Translated from Mikrobiologiya, Vol. 71, No. 1, pp. 103–110.

104. NCCLS, (1997). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standards M2-A6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 6th edn., NCCLS., Wayne, Pennsylvania.

105. Nitrate Reduction Test Kit Prospectuse, (Fluka 73426), Berlin-Germany.

106. Nitzan, Y., and Ashkenazi, H., (2001). Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. Current Microbiology Vol. 42, pp. 408–414.

107. Okay, O.S., Tolun, L., Telli-Karakoç, F., Tüfekçi, V., Tüfekçi, H. and Morkoç, E. (2001). Izmit Bay (Turkey) ecosystem after Marmara earthquake and subsequent refinery fire: the long-term data. Marine Pollution Bulletin, 42 (5), 361–369.

108. Olukoya, D. K., Smith, S. I., and Ilori, M. O. (1997). Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. Folia Microbiology, 42 5, 441-444.

109. Park, H. S., Kwon, K. K., Lee, D. S., and Lee, H. K. (2002). Morphological diversity of marine microorganisms on different isolation media. The Journal of Microbiology, 40 2, 161-165.

110. Park, Y., Je, K-W., Lee, K., Jung, S. E., and Choi, T. J., (2008). Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas sp.* isolated from the microalga. Hydroiologia -The Hague-,V:598, 219-228.

111. Parker, C. E. and Pribyl, E. J. (1984). Assessment of bacterial ATP response as a measurement of aquatic toxicity, in: Liu, D. and Dutka, B. J. eds. Toxicity screening Procedure Using Bacterial Systems, pp. 283–293, New York, Dekker.

112. Peel, M. M., Davis J. M., (1979). Armstrong W. L. H., Wilson J. R., and Holmes B., *Pseudomonas paucimobilis* from a leg ulcer on a Japanese seaman. Journal of Clinical Microbiology. 9:561-564.

113. Pekey, H. (2006a). Heavy metal pollution assessment in sediments of the Izmit Bay, Turkey. Environmental Monitoring and Assessment, 123, 219–231.

114. Pekey, H. (2006b). The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected by a polluted stream. Marine Pollution Bulletin, 52, 1197–1208.

115. Pekey, H., Karakaş, D., Ayberk, S., Tolun, L., and Bakoğlu, M. (2004). With its east-west elongated shape, ecological risk assessment using trace elements from surface sediments of Izmit Bay Northeastern Marmara Sea Turkey, Marine Pollution Bulletin, 48, 946–953.

116. Pinhassi, J. and Hagström, Å., (2000). Seasoanal succession in marine bacterioplankton. Aquatic Microbial Ecology, Vol.21, 245-256,

117. Pinhassi, J., Zweifel, U.L. and Hagström, Å., (1997). Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. Applied and Environmental Microbiology, P.3359-3366.

118. Pujalte, M. J., M. Ortigosa, Macián, M. C., and Garay, E., (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. International Microbiology, 2:259-266.

119. Pukall, R., Päuker, O., Buntefuβ, D., Ulrichs, G., Lebaron, P., Bernard, L., Guindulain, T., and Stackebrandt, E., (1999). High seguence diversity of A*lteromonas macleodii*- related cloned and cellular 16s rDNAs from a Mediterranean seawater mesocosm experiment. FEMS Microbiology Ecology, V:28, 335-344.

120. Rath, P-M., and Schmidt, D., (2001). Gellan gum as a suitable gelling agent in microbiological media for PCR Applications. Journal of Medical Microbiology, V:50, 108-109.

121. Reinhardt, D. J., Adams, D., Dickson, P., and Traina, V., (1979). Isolation, identification, and quantitation of gramnegative, non-fermentative bacilli from aqueous and aquatic sources, Developmental of Industrial Microbiology. 20:705-721.

122. Reisfeld, A., Rosenberg, E., and Gutnick, D. (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. Applied Microbiology, V:3 (24), 363-368.

123. Renu, S. ve Chandrasekaran, M., (1992 a,b). Extracellular L-glutaminase production by marine bacteria. Biotechnology Letters, 14:471-474.

124. Rheinheimer, G., (1992). Aquatic microbiology. pp. 183-242. John Wiley and Sons, New York.

125. Rochelle, P. A., Day, M. S., and Fry, J. C. (1988). Occurance, transfer and mobilization in epilithic strains of *Acinetobacter* of mercury resistance plasmid capable of transformation. Journal of Genetic Microbiology, 134, 29-33.

126. Rodrigez-Valera, F., (1988). Cahracteristic and microbial ecology of hypersaline environments, halophilic bacteria. Fl, 1:3-30.CRC Press Boca Raton.

127. Sá-Correia, I., Fialho, AM., Videira, F., Moreira, LM., Marques, AR., and Albano, H., (2002). Gellan gum Biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exoplysaccharide production engineering. Review, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 29, 170-176.

128. Sánches-Porro, C., Martin, S., Melledo, E., and Ventosa A., (2003). Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes, Journal of Applied Microbiology, (94), 295-300.

129. Schut, F., De Vries, E., Gottschal, J., Roberstson, B., Harder, W., Prins, R. and Button, D., K., (1993). Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintanance and characteristic of isolates under laboratory conditions. Applied and Environmental Microbiology, P.2150-2160.

130. Schwartz, T., Kohenen, W., Jansen, B., and Obst, U., (2003). Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology 43, 325–335.

131. Seo, E-J., Yoo, S-H., Oh, K-W., Cha, J., Lee H. G., Park, C. S., (2004). Isolation of an exopolysaccaride-producing Bacterium *Sphingonomas sp.* CS101i, Which forms an unusual type of sphingan. Bioscince Biotechnologycal Biochemistry. 68(5),1146-1148.

132. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. and Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology,V: 46, 939-946.

133. Shungu, D., Valiant, M., Tutlane V., Weinberg, E., Weissberger, B., Koupal, L., Gadebusch, H., and Stapley, E., (1983). GELRITE as an agar substitute in bacteriological Media. Applied Environmental Microbiology. 46: 840-845.

134. Slabbert, J. L. and Grabow, W. O. K. (1986). A rapid water toxicity screening test based on oxygen uptake of *Pseudomonas putida.* Toxicology Assessment, 1, 13-26.

135. Slotnick, I. J., Hall, J., and Sacks, H., (1979). Septicemia caused by *Pseudomonas paucimobilis*, American Journal Clinical Pathology. 72:882-884.

136. Smalley, D. L., (1982). Enzymatic profile of *Pseudomonas paucimobilis*. Journal of Clinical Microbiology, V:16 (3), p. 564-565.

137. Sneath , P. H.A. and Sokal, R. R., (1973). Principles of Numerical Taxonomy W. H. Freeman, San Fransisco.

138. Snellman, E.A., Rita, A. E., and Colwell, R., (2004). *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 391–400

139. Southern, P. M., Jr., and Kutscher A. E., (1981). *Pseudomonas paucimobilis* bacteremia, Journal of Clinical Microbiology. 13:1070-1073.

140. Stauber, J. L. and Florence, T. M., (1989). The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. Water Research, 23, 907-911.

141. Strohecker, B. and Sidie, J., (1999). Isolation and metabolic characterization of marine Gram positive Bacteria, Journal of Pennysilvania Academic Science, 72:182.

142. Summers, A.O., (2002). Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. Clinical Infectious. Diseases, 343, 85–92.

143. Suzuki, M. T., Rappé , M.S., Haimberger, Z. W., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J., and Giovannoni, S.J., (1997). Bacteral diversity among small subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. Applied and Environmental Microbiology, P. 983-989.

144. Tamer, A.Ü ve arkadaşları, (1989). Mikrobiyoloji Laboratuar Kılavuzu, T.C. Anadolu Üniversitesi Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınlar No.74, Eskişehir.

145. Taşdemir, Y., (2002). Marmara Denizi: Kirleticiler ve çevre açısından alınabilecek tedbirler. Uludağ Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 7(1), 39-45.

146. Teather, R. and Wood, P. J. (1982). Use of Congo-red polysaccaride interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology, 434, 777-780.

147. Thorne, C. B., (1993). *Bacillus anthracis*. In *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria (ed. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.), pp.113-124. Washington DC: American Society for Microbiology.

148. Tian, B., Yang, J., Lian, L., Wang, C., Li, N., Zhang , K-Q., (2007). Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4, Applied Microbiology Biotechnology, 74:372–380,

149. Tolun, L. G., Okay, O. S., Gaines, A. F., Tolay, M., Tüfekçi, H., and Kıratlı, N., (2001). The pollution status and the toxicity of surface sediments in Izmit Bay Marmara Sea. Turkey Environment International, 26, 163-168.

150. Topçuoğlu, S. Saygı, N., Erentürk, N., and Bulut, A. M., (1990). Karadeniz' e atılan atık varilleri üzerine bir çalışma. Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, AR-276.

151. Topçuoğlu, S., Kırbaşoğlu, C., and Güngör, N., (2002). Heavy metals in organisms and sediments from Turkish Coast of the Black Sea, 1997–1998. Environment International, 27, 521– 526.

152. Towner, K. J., Bergogne-Berezin E., and Fawson C.A. (1991). The biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Impotance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance, FEMS Symposium, No:57, New York, Plenum Press.

153. Traxler, R. W. and Wood, E. M., (1981). Multiple metal tolerance of bacterial isolates. (In: Underkofler LA, Wulf ML eds). Developments in Industrial Microbiology, vol 22, pp 521–528 Flagstaff, AZ USA.

154. Truong, L. V., Tuyen, H., Helmke, E., Binh, L.T. and Schweder, T., (2001). Cloning of two pectate lyase genes from the marine antarctic bacterium *Pseudoalteromonas Haloplanktis* strain ant/505 and characterization of the enzymes. Extremophiles, Vol. 5:35-44.

155. Tuzlakoğlu M. ve Gümüşel F. (Yüksek Lisans Tezi), (2004). Alfa-amilaz Üreticisi Yerel Bacilus Soylarının İzolasyonu, Nitelendirilmesi ve Enzim

Üretiminin Optimizasyonu Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Gebze-KOCAELİ

156. Türkmen, A., Türkmen, M., Tepe, Y., and Akyurt, I. (2005). Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea. Turkey, Food Chemistry, 91, 167–172.

157. Vaerewijck, M. J., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, P. and Heyndrickx, M., (2001). Occurance of *Bacillus thermodurans* and other from aerobic spore forming speciesin feed concentrate for dairy cattle. Journal of Applied Microbiology, 91, 1074-1084.

158. Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A., Wattiau, P., De Mot, R., and Springael, D., (2004). *Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. FEMS Microbiology Ecology. 50, 37-50.

159. Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K-H., (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe spesific fort he genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology. 792-800.

160. Wagner-Döbler, I., Bennasar, A., Vancanneyt, M., Strömpl, C., Brümmer, I., Eichner, C., Grammel, I. and Moore, E.R.B. (1998). Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology. Vol.64, No:8, p:3014-3022,

161. Weisburg, W., Barns S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J., (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of bacteriology. 697-703.

162. Whatmore, A.M., Shankster, S.J., Perrett, L.L., Murphy, T.J., Brew, S.D., Thirlwall, R.E., Cutler, S.J., and MacMillan, A.P., (2006). Identification and Characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing of *Brucella* spp., Journal of Clinical Microbiology, p. 1982–1993 Vol. 44, No. 6.

163. Wizard® Genomik DNA saflaştırma kiti (Promega A 1120) kullanıcı kitabı

164. Woese, R. and Fox, G. E., (1977). Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary Kingdoms. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol:74, No:11, 5088-5090.

165. Yalçın, A.N., (2000). Nozokomiyal Gram-Negatif Çomak Enfeksiyonları, Klimik Dergisi, Cilt 13, Özel Sayı, s:23-25,

166. Yaşar, D., Aksu, A.E., and Uslu, O., (2001). Anthropogenic pollution in Izmit Bay: heavy metal concentrations in surface sediments. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 25, 299–313.

167. Zbinden, A., Böttger E. C., Bosshard, P. P. and Zbinden, R., (2007). Evaluation of the colorimetric VITEK 2 Card for identification of Gram-negative nonfermentative rods: Comparison to 16S rRNA gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology, 2270-2273.

168. Zemelman, R., Silva, J., and Herriques, M. (1980). Antibiotic resistant bacteria in seawater from Concepcion Bay. Archives of Biological Experiments, 13:121.

169. Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A.I., and Drainas, C., (2004). Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Applied Microbiology Biotechnolpgy, 65: 124–131.

170. Zheng, N., Wang, Q., Liang, Z., and Zheng, D. (2008). Characterization of heavy metal concentrations in the sediments of three freshwater rivers in Huludao City, Northeast China. Environmental Pollution, 154, 135-142.

171. Zhu, X., Zhou, Y., and Feng, J., (2007). Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingonomas sp.* CJ-5., Journal of Zheijiang University Science B., 8(11)831-838.

172. Zuckerkendl E. and Pauling, L., (1965). Molecules as documents of evolutionary historyJournal of Thoeretical Biology. 8, 357-366.

173. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi-2009.

174. http://prion.bchs.uh.edu-2005.

175. http://wwjw.micromemanalytical.com/molbiol/comp3.htm-2005.

176. http://www.19thcenturyscience.org/HMSC/HMSC-INDEX/index-linked.htm-2007.

177. http://www.biomerieux-diagnostics.com-2007.

178. http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sources.html-2008.

179. http://www.marine-genomics-europe.org/index2.php?rub=a&pid=23&aid=342-2007.

180. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&RID=1SBRGFTH013&log%24=nucltop&blast_rank=1&list_uids=223016874-2009.

181. www.geotics.com-2007.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Darıca' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı yerde tamamladı. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü' nde Lisans Eğitiminden mezun oldu. 1994-1996 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı' na bağlı olarak çeşitli kademelerde öğretmenlik yaptı. 1996 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü' ne Araştırma Görevlisi olarak kabul edildi. 1998 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisan eğitimini tamamladı. 2002 yılında aynı yerde Doktora Programına kabul edildi. Halen aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EK-1

Seçilmiş 53 saf deniz izolatına ait, her bir izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerine ait sonuçları içeren tanımlama çizelgelerinden oluşmaktadır. Tez içinde bu veriler toplu halde verilmiş olup bu bölümde her bir izolata özel düzenlenmiştir.

Vitek adı		*Spingomonas paucimobilis*
Vitek %		91%
İstasyon		Orta-3/1
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI BEYAZ
	Görünümü	NOKTALI
	Kenarı	-
	Yüksekliği	DÜZ-YÜKSEK
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK
Hücre şekli		Basil
Gram boyama		Gram (+/-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller
Katalaz		++
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		+
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) R=resistant (dirençli), S=sensitive (duyarlı), I=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	26 mm-S
	Na^{30}-Nalididsik asit	22 mm-S
	Se^{100}-Spektinomisin	20 mm-S
	A^{10}-Ampisilin	20 mm- S.D.*
	S^{10}-Streptomisin	21 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	30 mm-S
	T^{30}-Tetrasiklin	30 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	30 mm- S
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**
	Lizin	-
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi*			
	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		-
	Inert (etkisiz)		+
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	+
		48 h	+
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	+
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	+/-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	+
		48 h	+
	Galaktoz	24 h	-
		48 h	-
	Fruktoz	24 h	+/-
		48 h	+

TSI Agar Testi	Glukoz	+	**96 İK2**
	Sukroz	+	
	Laktoz	+	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	-	
	48 h	-	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	-	
	Voges preskauer	-	
	Sitrat	-	
Jelatini sıvılaştırma		Tabakalı, +	
Amilaz		+	
Lipaz		-	
Proteaz		+	
Selulaz	Seviye 1	+/-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*
Vitek %		85%
İstasyon		İç/2
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	MAT BEYAZ
	Görünümü	DÜZENSİZ
	Kenarı	DALGALI
	Yüksekliği	DÜZ-YÜKSEK
	Yüzeyi	DALGALI
Hücre şekli		Basil
Gram boyama		Gram (+)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu basiller
Katalaz		+
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		+
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	25 mm-S
	Na^{30}-Nalididsik asit	25 mm-S
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-R
	T^{30}-Tetrasiklin	25 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	28 mm-S
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+
	Lizin	-
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi* **	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		-
	Inert (etkisiz)		+
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	+
		48 h	+
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	+
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	+/-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	+
		48 h	+
	Galaktoz	24 h	-
		48 h	-
	Fruktoz	24 h	+
		48 h	+

TSI Agar Testi	Glukoz	+	**235 İK3**
	Sukroz	+	
	Laktoz	+	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	+	
	48 h	+	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	α	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	+	
	Voges preskauer	+	
	Sitrat	-	
Jelatini sıvılaştırma		Tabakalı, +	
Amilaz		+	
Lipaz		-	
Proteaz		++	
Selulaz	Seviye 1	-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**237 İK3**
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	ORTA / İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	ORTA / İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	MAT BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi ***		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		+?			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		++	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	22 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	23 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	11 mm-R		Sellobiyoz	24 h	+/-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	22 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	22 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	25 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	25 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A115 / M-1**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		10m/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI, BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok-kokobasil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) sporsuz koklar, kokobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	17 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm- I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	18 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	10 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfame	15 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	9 mm-R			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**A115 / M-2**
Vitek %		88%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		10m/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI, BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, KIVRIK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Streptobasil-mekik gibi		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Gram boyama		Gram (+)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Katalaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		+		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		++	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	22 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	22 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	21 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	25 mm-S			48 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	25 mm-S		Fruktoz	24 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			48 h	+				
	Lizin	-								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A118 / M-1**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		20m/3		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	NOKTALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok-kokobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		- sporsuz koklar, kokobasiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		++			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Lipit boyama		-		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	17 mm- S			48 h	+				
	Na^{30}-Nalididsik asit	20 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-				
	Se^{100}-Spektinomisin	17 mm-I			48 h	-				
	A^{10}-Ampisilin	9 mm-R		Trehaloz	24 h	+z				
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S			48 h	+				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	19 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	7 mm-R		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	+				
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*
Vitek %		88%
İstasyon		20m/3
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ
	Görünümü	DÜZENSİZ
	Kenarı	FLAMENTLİ, DALGALI
	Yüksekliği	YÜKSEK
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, DALGALI
Hücre şekli		Basil, kok
Gram boyama		Gram (+/-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, streptobasiller
Katalaz		++
Oksidaz		+
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		+
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	22 mm-S
	Na^{30}-Nalididsik asit	23 mm-S
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	22 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	20 mm-S
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	26 mm-S
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+
	Lizin	-
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi* **		
Aerop		-
Fakültatif anaerob		-
Inert (etkisiz)		+

Karbonhidrat kullanımı			
Glukoz	24 h		+
	48 h		+
Glukozdan gaz oluşumu	24 h		-
	48 h		-
Sukroz	24 h		+
	48 h		+
Sorbitol	24 h		-
	48 h		-
Mannitol	24 h		-
	48 h		-
Ksiloz	24 h		+
	48 h		+
Arabinoz	24 h		-
	48 h		-
Mannoz	24 h		+
	48 h		+
Sellobiyoz	24 h		-
	48 h		-
Trehaloz	24 h		+
	48 h		+
Galaktoz	24 h		-
	48 h		-
Fruktoz	24 h		+
	48 h		+

TSI Agar Testi	Glukoz	+	**A118 / M-2**
	Sukroz	+	
	Laktoz	+	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	+	
	48 h	+	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	α	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	+	
	Voges preskauer	-	
	Sitrat	+	
Jelatini sıvılaştırma		Tabakalı, +	
Amilaz		+	
Lipaz		-	
Proteaz		+	
Selulaz	Seviye 1	-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**257 / İK3-1**
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		İç/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, KIVRIK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Basil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (+)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Katalaz		+++			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		+?		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	23 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	22 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	17 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfame	14 mm-I		Galaktoz	24 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S			48 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	22 mm-S		Fruktoz	24 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			48 h	+				
	Lizin	-								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**257 / İK3-2**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		İç/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi ***		- sporsuz koklar		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
					48 h	+	**Lipaz**		-	
Katalaz		+++		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Kapsül boyama		-		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Lipit boyama		-			48 h	+				
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	17 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-				
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-S			48 h	-				
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R		Trehaloz	24 h	-				
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-				
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S		Fruktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**								
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*		**O/F Testi*** **	Aerop		+		Glukoz	-	**42 / İK1-1**
Vitek %		99%			Fakültatif anaerob		-	**TSI Agar Testi**	Sukroz	-	
İstasyon		İç			Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ		**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ				48 h	+z		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ			Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN AKIŞKAN				48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI-DÜZ			Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS				48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ PARLAK			Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok				48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)			Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) sporsuz, Kok, kokobasil				48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		++			Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-				48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-			Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-				48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	17 mm-S			Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I				48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I			Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R				48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	13 mm-I			Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	11 mm-I				48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S			Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	10 mm-R				48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.*				48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**42 / İK1-2**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		İç		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok-diplokok-kokobasil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(+) / C sporlu, sporsuz, Kok			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	16 mm- S		Mannoz	24 h	+/-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	14 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	19 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	6 mm-R			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**42 / İK1-3**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		İç		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) sporsuz kokobasil			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	19 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**43 İK1**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZGÜN, DAĞINIK			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil, kok			48 h	-		Voges preskauer	+	
Gram boyama		Gram (+/-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi ***		(+/) / C Sporlu, sporsuz basil			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	24 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	21 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	20 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	24 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**45 İK1**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		Orta-3/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+z		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(+)/ C sporlu, sporsuz, kok, kokobasil		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		++			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	19 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	18 mm-S			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	16 mm-S			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	14 mm-I		Galaktoz	24 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	10 mm-R		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	-				
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*ÖRNEK VITEK ÇIKTISI YOK*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**46 İK1**	
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-		
İstasyon		Dış-7		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-		
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-		
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ		
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-		
Hücre şekli		Kok			48 h	-		Voges preskauer	-		
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) sporsuz, kokobasil			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-		
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+		
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm-S		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	+		
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	13 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S		Galaktoz	24 h	+					
	C^{30}-Kloramfenikol	8 mm-R			48 h	+					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-					
	Lizin	R.V.**			48 h	-					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**406 / İK4-1**
Vitek %		86%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	MAT BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, YAYILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	+	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+z	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	19 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	16 mm-I			48 h	+				
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-				
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R			48 h	-				
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	+				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	8 mm-R			48 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	19 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*
Vitek %		99%
İstasyon		Orta-3/1
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN
	Kenarı	DALGALI
	Yüksekliği	KONVEKS
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK
Hücre şekli		Kok-kokobasil
Gram boyama		Gram (-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz kokobasiller
Katalaz		++
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		-
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) R=resistant (dirençli), S=sensitive (duyarlı), I=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm-S
	Na^{30}-Nalididsik asit	16 mm-I
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R
	A^{10}-Ampisilin	11 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	14 mm-I
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**
	Lizin	R.V.**
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi*			
	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		+
	Inert (etkisiz)		-
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	-
		48 h	-
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	+
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	-
		48 h	-
	Galaktoz	24 h	+
		48 h	+
	Fruktoz	24 h	-
		48 h	-

TSI Agar Testi	Glukoz	-	**406 / İK4-2**
	Sukroz	-	
	Laktoz	-	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	-	
	48 h	-	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	-	
	Voges preskauer	-	
	Sitrat	+	
Jelatini sıvılaştırma		-	
Amilaz		-	
Lipaz		-	
Proteaz		-	
Selulaz	Seviye 1	-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**406 / İK4-3**
Vitek %		90%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	MAT BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, YAYILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	+	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+z	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz streptobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm- S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	21 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter haemolyticus*
Vitek %		94%
İstasyon		20m/1
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN
	Kenarı	DALGALI
	Yüksekliği	KONVEKS, YASTIKSI
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK
Hücre şekli		Kok-diplokok
Gram boyama		Gram (-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz
Katalaz		+zayıf
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		+/-
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm- S
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm-I
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R
	A^{10}-Ampisilin	6 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	16 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.*
	Lizin	R.V.*
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi* **			
	Aerop		+
	Fakültatif anaerob		-
	Inert (etkisiz)		-
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+z
		48 h	+z
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	+/-
		48 h	+
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	+
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	-
		48 h	+
	Galaktoz	24 h	+
		48 h	+
	Fruktoz	24 h	-
		48 h	+

TSI Agar Testi	Glukoz	-	**A154 M**
	Sukroz	-	
	Laktoz	-	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	-	
	48 h	-	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	-	
	Voges preskauer	-	
	Sitrat	+	
Jelatini sıvılaştırma		-	
Amilaz		-	
Lipaz		-	
Proteaz		-	
Selulaz	Seviye 1	-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A155 / M-1**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		20m/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok, stafilokokobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz kokobasiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		++			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Lipit boyama		-		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	19 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I		Galaktoz	24 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	13 mm-I		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.*			48 h	-				
	Lizin	R.V.*								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**A155 / M-2**
Vitek %		90%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		20m/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, YAYILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil, kok			48 h	-		Voges preskauer	+	
Gram boyama		Gram (+/-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz streptobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	21 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	17 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	20 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-				**A156 M**
Vitek %		86%		Fakültatif anaerob		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	
İstasyon		20m/3		Inert (etkisiz)		+		Sukroz	+	
Büyüme	24 h	İYİ		Glukoz	24 h	+		Laktoz	+	
	48 h	İYİ			48 h	+		H_2S oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-		Gaz oluşumu	-	
	Görünümü	PÜRÜZLÜ, DALGALI			48 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	+		48 h	+	
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
Hücre şekli		Basil, basil			48 h	-		Metil kırmızısı	+	
Gram boyama		Gram (+/-)		Mannitol	24 h	-		Voges preskauer	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz streptobasiller			48 h	-		Sitrat	+z	
Katalaz		++	**Karbonhidrat kullanımı**	Ksiloz	24 h	+	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Oksidaz		-			48 h	+	**Amilaz**		+	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Lipaz**		-	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Proteaz**		+	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	22 mm-S		Mannoz	24 h	+	**Selulaz**	Seviye 1	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm- I			48 h	+		Seviye 2	-	
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	* S.D.= Sınır Değerde			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S		Trehaloz	24 h	+	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S		Galaktoz	24 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	C^{30}-Kloramfenikol	23 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*AYIRT EDİLEMEDİ (Low Discrimination)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**421 İK4**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		İç/3		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARI		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	NOKTALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	-		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	DÜZ			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, NOKTALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kokobasil, Vibriobasil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+/-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) vibrio-basiller mukus içinde gibi görünüyorlar			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+/-	**Amilaz**		-	
Oksidaz		+			48 h	-	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	14 mm-I		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	21 mm-S			48 h	-	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	30 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	18 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-		Glukoz	+	**429 İK4**
Vitek %		90%		Fakültatif anaerob		-	**TSI Agar Testi**	Sukroz	+	
İstasyon		İç/3		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	MAT BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	NOKTALI, YAYILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	FLAMENTLİ, DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	"+z	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz streptobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		++	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	21 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+	
	Na^{30}-Nalididsik asit	21 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	20 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	+/-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	18 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	23 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	24 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Spingomonas paucimobilis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+/-	**65 İK1**
Vitek %		89%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+/-	
İstasyon		Orta-3		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+/-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	-		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	-		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DALGALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Üremedi	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	-	**Amilaz**		-	
Oksidaz		+			48 h	-	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	24 mm-S		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	13 mm-R			48 h	-	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	22 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	14 mm-S.D.*			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	22 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	30 mm-S			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	34 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	18 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*AYIRT EDİLEMEDİ (Low Discrimination)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**301 / İK3-1**	
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+		
İstasyon		Orta-3/3		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+		
	Görünümü	DÜZENSİZ, DAĞILAN			48 h	-		48 h	+		
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α		
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, DALGALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+		
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-		
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı,+		
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-		
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	21 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-		
	Na^{30}-Nalididsik asit	21 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	18 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	20 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S		Galaktoz	24 h	-					
	C^{30}-Kloramfenikol	25 mm-S			48 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+					
	Lizin	-			48 h	+					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Brevibacillus laterosporus*
Vitek %		85%
İstasyon		Orta-3/3
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ
	Görünümü	DÜZENSİZ, DAĞILAN
	Kenarı	DALGALI
	Yüksekliği	YÜKSEK
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, DALGALI
Hücre şekli		Büyük-küçük basil
Gram boyama		Gram (+)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu basiller
Katalaz		+
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		+
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	23 mm-S
	Na^{30}-Nalididsik asit	22 mm-S
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	21 mm-S
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	18 mm-S
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S
	C^{30}-Kloramfenikol	23 mm-S
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+
	Lizin	-
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi* **			
	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		-
	Inert (etkisiz)		+
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	+
		48 h	+
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	+
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	+
		48 h	-
	Galaktoz	24 h	-
		48 h	-
	Fruktoz	24 h	+
		48 h	+

TSI Agar Testi	Glukoz	+
	Sukroz	+
	Laktoz	+
	H_2S oluşumu	-
	Gaz oluşumu	-
Hareketlilik	24 h	+
	48 h	+
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	α
IMVIC Testi	İndol	-
	Metil kırmızısı	+
	Voges preskauer	-
	Sitrat	+
Jelatini sıvılaştırma		Tabakalı, +
Amilaz		+
Lipaz		-
Proteaz		+
Selulaz	Seviye 1	-
	Seviye 2	-

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

301 / İK3-2

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**447 İK4**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Dış-7/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENLİ, DAĞILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Basil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (+)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu basiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Katalaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	23 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	23 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S			48 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	25 mm-S		Fruktoz	24 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			48 h	+				
	Lizin	-								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**171 İK2**
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+z	
	Görünümü	DALGALI			48 h	-		48 h	+z	
	Kenarı	DALGALI, FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, MAT, YÜNÜMSÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil-streptobasil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		++++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	23 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	23 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	18 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	25 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*		**O/F Testi*** **	Aerop		-		**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**181 İK2**
Vitek %		0%			Fakültatif anaerob		-			Sukroz	-	
İstasyon		Dış-7/2			Inert (etkisiz)		+			Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ			Glukoz	24 h	+			H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ				48 h	+			Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ			Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-		**Hareketlilik**	24 h	+z	
	Görünümü	DALGALI, DAĞILAN				48 h	-			48 h	+z	
	Kenarı	DALGALI			Sukroz	24 h	+		**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK				48 h	+		**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, MAT, PÜRÜZLÜ			Sorbitol	24 h	-			Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil				48 h	-			Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)			Mannitol	24 h	-			Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi ***|	+/C sporlu, sporsuz basiller,				48 h	-		**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+++		**Karbonhidrat kullanımı**	Ksiloz	24 h	+		**Amilaz**		+	
Oksidaz		-				48 h	+		**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-			Arabinoz	24 h	-		**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+				48 h	-		**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S			Mannoz	24 h	+			Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	19 mm-S				48 h	+		* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R			Sellobiyoz	24 h	-		** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R				48 h	+/-		*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S			Trehaloz	24 h	+		**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	13 mm-I				48 h	+		*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S			Galaktoz	24 h	-					
	C^{30}-Kloramfenikol	23 mm-S				48 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			Fruktoz	24 h	+					
	Lizin	-				48 h	+					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+										
	N_2 gazı oluşumu	-										

Vitek adı		*Brevundimonas diminuta / vesicularis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**461 İK4**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		Dış-7/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI, BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZENSİZ, DAĞINIK			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS, YASTIKSI			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PARLAK, DALGALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Vibriobasil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller,			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		+/-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	15 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	14 mm- I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	8 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	14 mm-I		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	21 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	13 mm-I			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*AYIRT EDİLEMEDİ (Low Discrimination)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**189 İK2**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		Dış-7/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	KÖKSÜ, İPLİKSİ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	+	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tamamı sıvı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S		Mannoz	24 h	+/-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-S			48 h	-	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	18 mm-S		Sellobiyoz	24 h	+/-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	+z	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S		Galaktoz	24 h	+/-				
	C^{30}-Kloramfenikol	24 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	-		Fruktoz	24 h	+/-				
	Lizin	-			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**318 İK3**
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		İç/3		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, DAĞINIK			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	YÜNÜMSÜ, PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
					48 h	-		Voges preskauer	+	
Hücre şekli		Basil -streptobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Gram boyama		Gram (+)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Katalaz		++			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	19 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	7 mm-R		Galaktoz	24 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S			48 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	22 mm-S		Fruktoz	24 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			48 h	+				
	Lizin	-								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*AYIRT EDİLEMEDİ (Low Discrimination)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**193 / İK2-1**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		Orta-3/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ, SARIMSI		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	NOKTALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	-		Sukroz	24 h	+/-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PARLAK, PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Büyük kok-stafilokoklar			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu koklar			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Üremedi	
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	24 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	12 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	11 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	22 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	24 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	24 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**193 / İK2-2**
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Orta-3/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ		Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Streptobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Gram boyama		Gram (+)			48 h	+z	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Katalaz		++	**Karbonhidrat kullanımı**		48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Lipit boyama		+		Mannoz	24 h	+z		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	13 mm-I		Galaktoz	24 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	19 mm-S			48 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	21 mm-S		Fruktoz	24 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			48 h	+				
	Lizin	-								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**475 / İK4-1**	
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+		
İstasyon		Dış-7/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+		
	Görünümü	DÜZENSİZ, KÖKSÜ			48 h	-		48 h	+		
	Kenarı	LOBLU, FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α		
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	DALGALI, PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+		
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-		
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +		
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-		
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	+		
	Na^{30}-Nalidiksik asit	17 mm-I			48 h	-	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I		Galaktoz	24 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	C^{30}-Kloramfenikol	20 mm-S			48 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	+					
	Lizin	R.V.**			48 h	+					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**332 İK3**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Dış-7/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ		Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, DAĞILAN			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, DALGALI, FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, PÜRÜZLÜ		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi ***		+/C sporlu, sporsuz basiller	**Karbonhidrat kullanımı**		48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		++	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	19 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+	
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	16 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	23 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**A27 / K-1**	
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+		
İstasyon		40m/1		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+		
	Görünümü	DÜZGÜN, YAYILAN			48 h	-		48 h	+		
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α		
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+		
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	+		
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +		
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-		
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	21 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+		
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I		Sellobiyoz	24 h	+/-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	20 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	11 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-					
	C^{30}-Kloramfenikol	22 mm-S			48 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+					
	Lizin	-			48 h	+					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi***	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A31 / K-1**	
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-		
İstasyon		40m/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-		
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-		
	Kenarı	DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ		
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-		
					48 h	-		Voges preskauer	-		
Hücre şekli		Kok		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+		
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tamamı sıvı, +		
Spor boyama ve hücre morfolojisi		+/C sporlu kokobasiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+		
Katalaz		++			48 h	+	**Lipaz**		-		
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+		
Lipit boyama		-		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-		
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	14 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Na^{30}-Nalididsik asit	20 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	A^{10}-Ampisilin	11 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	S^{10}-Streptomisin	14 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	7 mm-R		Galaktoz	24 h	-					
	T^{30}-Tetrasiklin	19 mm-S			48 h	+z					
	C^{30}-Kloramfenikol	12 mm-R		Fruktoz	24 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	-					
	Lizin	R.V.**									
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*
Vitek %		99%
İstasyon		40m/1
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ
	Görünümü	DÜZGÜN, DAĞINIK
	Kenarı	DALGALI
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK
Hücre şekli		Stapylokok
Gram boyama		Gram (-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		(-) kokobasiller
Katalaz		+
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		-
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	14 mm-I
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	11 mm-R
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**
	Lizin	R.V.**
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi*			
	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		+
	Inert (etkisiz)		-
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	-
		48 h	-
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	-
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	-
		48 h	+
	Galaktoz	24 h	-
		48 h	+
	Fruktoz	24 h	-
		48 h	-

TSI Agar Testi	Glukoz	-
	Sukroz	-
	Laktoz	-
	H_2S oluşumu	-
	Gaz oluşumu	-
Hareketlilik	24 h	-
	48 h	-
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ
IMVIC Testi	İndol	-
	Metil kırmızısı	-
	Voges preskauer	-
	Sitrat	+
Jelatini sıvılaştırma		Tamamı sıvı, +
Amilaz		-
Lipaz		-
Proteaz		+
Selulaz	Seviye 1	+/-
	Seviye 2	-

A36 K

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Acinetobacter haemolyticus*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A37 K**
Vitek %		93%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		40m/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+z		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok-kokobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tamamı sıvı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kok, kokobasiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Lipit boyama		-		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	14 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	19 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	12 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	13 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I		Galaktoz	24 h	+/-				
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	12 mm-R		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	+				
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Brucella melitensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A41 / K-2**
Vitek %		91%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		30m		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	-		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	-		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	LİMON SARISI		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	NOKTALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	-		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	KIVRIK, KURU, TOZUMSU		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Stapylokok			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu diplokoklar,			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Üremedi	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	-	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	-	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm-S		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	12 mm-R			48 h	-	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	20 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	31 mm-S			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	32 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	30 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A73 / K-2**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		40m/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN, AKIŞKAN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	KONVEKS			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Kok			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu diplokok, kokobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tamamı sıvı, +	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	13 mm-I		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	12 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	9 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	13 mm-I		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	8 mm-R			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I		Galaktoz	24 h	+/-				
	C^{30}-Kloramfenikol	13 mm-I			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter haemolyticus*
Vitek %		98%
İstasyon		40m/1
Büyüme	24 h	İYİ
	48 h	İYİ
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ
	Görünümü	DÜZGÜN
	Kenarı	LOBLU, DALGALI
	Yüksekliği	KONVEKS
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK
Hücre şekli		Kok
Gram boyama		Gram (-)
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller,
Katalaz		+++
Oksidaz		-
Kapsül boyama		-
Lipit boyama		-
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	12 mm-R
	Na^{30}-Nalididsik asit	14 mm-I
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R
	S^{10}-Streptomisin	12 mm-I
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R
	T^{30}-Tetrasiklin	17 mm-I
	C^{30}-Kloramfenikol	9 mm-R
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**
	Lizin	R.V.**
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+
	N_2 gazı oluşumu	-

O/F Testi*			
	Aerop		-
	Fakültatif anaerob		+
	Inert (etkisiz)		-
Karbonhidrat kullanımı	Glukoz	24 h	+
		48 h	+
	Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-
		48 h	-
	Sukroz	24 h	-
		48 h	-
	Sorbitol	24 h	-
		48 h	-
	Mannitol	24 h	-
		48 h	-
	Ksiloz	24 h	+
		48 h	+
	Arabinoz	24 h	-
		48 h	-
	Mannoz	24 h	-
		48 h	+
	Sellobiyoz	24 h	-
		48 h	-
	Trehaloz	24 h	-
		48 h	-
	Galaktoz	24 h	+/-
		48 h	+
	Fruktoz	24 h	-
		48 h	-

TSI Agar Testi	Glukoz	-
	Sukroz	-
	Laktoz	-
	H_2S oluşumu	-
	Gaz oluşumu	-
Hareketlilik	24 h	-
	48 h	-
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ
IMVIC Testi	İndol	-
	Metil kırmızısı	-
	Voges preskauer	-
	Sitrat	+
Jelatini sıvılaştırma		Tamamı sıvı, +
Amilaz		-
Lipaz		-
Proteaz		+
Selulaz	Seviye 1	-
	Seviye 2	-

A73 / K-3

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*		**O/F Testi*** **	Aerop		-		Glukoz	+	**A77 / K-1**
Vitek %		85%			Fakültatif anaerob		-	**TSI Agar Testi**	Sukroz	+/-	
İstasyon		40m/1			Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+/-	
Büyüme	24 h	İYİ			Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ				48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ			Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	DÜZENSİZ, İPLİKSİ				48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, FLAMENTLİ			Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK				48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	KIVRIK, MAT			Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil-streptobasil				48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)			Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz streptobasil				48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı ,+	
Katalaz		+++		**Karbonhidrat kullanımı**	Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-				48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-			Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+				48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S			Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+	
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I				48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	18 mm-S			Sellobiyoz	24 h	+/-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R				48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	18 mm-S			Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	17 mm-S				48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	19 mm-S			Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	20 mm-S				48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+			Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-				48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Bacillus cereus / Bacillus thuringiensis*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**A78 / K-1**	
Vitek %		85%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+/-		
İstasyon		40m/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+/-		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+		
	Görünümü	DÜZENSİZ			48 h	-		48 h	+		
	Kenarı	LOBLU, DALGALI		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α		
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+		
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-		
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	-		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +		
Katalaz		(sonradan çoştu)		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+		
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-		
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	20 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	+		
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	15 mm-I		Sellobiyoz	24 h	+/-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I		Galaktoz	24 h	+/-					
	C^{30}-Kloramfenikol	20 mm-S			48 h	-					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+					
	Lizin	-			48 h	+					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*		**O/F Testi*** **	Aerop		-				**A78 / K-2**
Vitek %		99%			Fakültatif anaerob		+				
İstasyon		40m/2			Inert (etkisiz)		-				
Büyüme	24 h	İYİ			Glukoz	24 h	+z				
	48 h	İYİ				48 h	+z				
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ			Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-				
	Görünümü	DÜZENSİZ				48 h	-				
	Kenarı	LOBLU, DALGALI			Sukroz	24 h	-				
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK				48 h	-				
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, PARLAK			Sorbitol	24 h	-				
Hücre şekli		Kok.stafilokok				48 h	-				
Gram boyama		Gram (-)			Mannitol	24 h	-				
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller				48 h	-				
Katalaz		++		**Karbonhidrat kullanımı**	Ksiloz	24 h	+				
Oksidaz		-				48 h	+				
Kapsül boyama		-			Arabinoz	24 h	-				
Lipit boyama		-				48 h	-				
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	14 mm-I			Mannoz	24 h	+/-				
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm-I				48 h	+				
	Se^{100}-Spektinomisin	12 mm-R			Sellobiyoz	24 h	-				
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R				48 h	-				
	S^{10}-Streptomisin	12 mm-I			Trehaloz	24 h	-				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	0 mm-R				48 h	-				
	T^{30}-Tetrasiklin	18 mm-I			Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	10 mm-R				48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**				48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

TSI Agar Testi	Glukoz	-	
	Sukroz	-	
	Laktoz	-	
	H_2S oluşumu	-	
	Gaz oluşumu	-	
Hareketlilik	24 h	-	
	48 h	-	
Hemoliz Testi	Hemoliz türü****	γ	
IMVIC Testi	İndol	-	
	Metil kırmızısı	-	
	Voges preskauer	-	
	Sitrat	+	
Jelatini sıvılaştırma		Tabakalı, +	
Amilaz		-	
Lipaz		-	
Proteaz		+	
Selulaz	Seviye 1	+/-	
	Seviye 2	-	

* S.D.= Sınır Değerde

** R.V.= Reaksiyon Vermedi

*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi

**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma

*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A79 K**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-	
İstasyon		Dip/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+z		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Lipit boyama		-		Mannoz	24 h	-		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	17 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	16 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	14 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	7 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	13 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I		Galaktoz	24 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	7 mm-R		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	-				
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*TANIMLANAMADI (Unidentified Organism)*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	+	**A80 / K-1**
Vitek %		0%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	+	
İstasyon		Dip/2		Inert (etkisiz)		+		Laktoz	+	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	+	
	Görünümü	KÖKSÜ, DÜZENSİZ, FLAMENTLİ			48 h	-		48 h	+	
	Kenarı	LOBLU, FLAMENTLİ		Sukroz	24 h	+	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	α	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, MAT		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+	
Hücre şekli		Basil			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (+)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu, sporsuz basiller,			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		Tabakalı, +	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		+	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		+	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	++	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	22 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	++	
	Na^{30}-Nalididsik asit	17 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	12 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	0 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	16 mm-S		Trehaloz	24 h	+	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I			48 h	+	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	-				
	C^{30}-Kloramfenikol	22 mm-S			48 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	+		Fruktoz	24 h	+				
	Lizin	-			48 h	+				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		+	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A80 / K-2**	
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		-		Sukroz	-		
İstasyon		Dip/2		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-		
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-		
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-		
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-		
	Görünümü	DÜZ, DALGALI			48 h	-		48 h	-		
	Kenarı	DÜZ, DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ		
	Yüksekliği	KONVEKS, YASTIKSI			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-		
	Yüzeyi	DALGALI, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	+		
Hücre şekli		Kok-kokobasil			48 h	-		Voges preskauer	-		
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+		
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-		
Katalaz		+++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-		
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-		
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-		
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	-		
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	16 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-		
	Na^{30}-Nalididsik asit	18 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde				
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi				
	A^{10}-Ampisilin	12 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi				
	S^{10}-Streptomisin	17 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma				
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken				
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	+					
	C^{30}-Kloramfenikol	15 mm-I			48 h	+					
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-					
	Lizin	R.V.**			48 h	-					
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+									
	N_2 gazı oluşumu	-									

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A106 / M-1**
Vitek %		98%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		100m/1		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DÜZ, DALGALI		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	DÜZ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
					48 h	-		Voges preskauer	-	
Hücre şekli		Kok-kokobasil		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Gram boyama		Gram (-)			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller, diplokoklar		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Katalaz		+			48 h	+	**Lipaz**		-	
Oksidaz		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Kapsül boyama		-			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Lipit boyama		+/-		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Na^{30}-Nalididsik asit	19 mm-S		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	Se^{100}-Spektinomisin	16 mm-I			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	A^{10}-Ampisilin	8 mm-R		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	14 mm-I		Galaktoz	24 h	+				
	T^{30}-Tetrasiklin	22 mm-S			48 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	12 mm-R		Fruktoz	24 h	-				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**			48 h	-				
	Lizin	R.V.**								
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A125 M**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		20m/3		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	İYİ	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+		H_2S oluşumu	-	
	48 h	İYİ			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	YEŞİLİMSİ BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	NOKTALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	-		Sukroz	24 h	-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	DÜZ, YÜKSEK			48 h	-	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, PARLAK		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller, diplokoklar			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		+		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-İnhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	18 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	19 mm-S			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	8 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	10 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	15 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	14 mm-I			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

Vitek adı		*Acinetobacter baumannii*	**O/F Testi*** **	Aerop		-	**TSI Agar Testi**	Glukoz	-	**A139 M**
Vitek %		99%		Fakültatif anaerob		+		Sukroz	-	
İstasyon		10m/3		Inert (etkisiz)		-		Laktoz	-	
Büyüme	24 h	ORTA	**Karbonhidrat kullanımı**	Glukoz	24 h	+z		H_2S oluşumu	-	
	48 h	ORTA			48 h	+		Gaz oluşumu	-	
Koloni görünümü	Rengi	SARIMSI, BEYAZ		Glukozdan gaz oluşumu	24 h	-	**Hareketlilik**	24 h	-	
	Görünümü	DÜZGÜN, DALGALI			48 h	-		48 h	-	
	Kenarı	DALGALI, LOBLU		Sukroz	24 h	+/-	**Hemoliz Testi**	Hemoliz türü****	γ	
	Yüksekliği	YÜKSEK, KONVEKS			48 h	+	**IMVIC Testi**	İndol	-	
	Yüzeyi	PÜRÜZLÜ, DALGALI		Sorbitol	24 h	-		Metil kırmızısı	-	
Hücre şekli		Kok			48 h	-		Voges preskauer	-	
Gram boyama		Gram (-)		Mannitol	24 h	-		Sitrat	+	
Spor boyama ve hücre morfolojisi *****		+/C sporlu kokobasiller, diplokoklar			48 h	-	**Jelatini sıvılaştırma**		-	
Katalaz		++		Ksiloz	24 h	+	**Amilaz**		-	
Oksidaz		-			48 h	+	**Lipaz**		-	
Kapsül boyama		-		Arabinoz	24 h	-	**Proteaz**		-	
Lipit boyama		+			48 h	-	**Selulaz**	Seviye 1	+/-	
Antibiogram testi-Inhibisyon zonlarının çapı (mm) **R**=resistant (dirençli), **S**=sensitive (duyarlı), **I**=Intermediate (arada)	Gm^{10}-Gentamisin	21 mm-S		Mannoz	24 h	+		Seviye 2	-	
	Na^{30}-Nalididsik asit	15 mm-I			48 h	+	* S.D.= Sınır Değerde			
	Se^{100}-Spektinomisin	13 mm-R		Sellobiyoz	24 h	-	** R.V.= Reaksiyon Vermedi			
	A^{10}-Ampisilin	9 mm-R			48 h	-	*** O/F Testi= Oksidasyon-Fermantasyon Testi			
	S^{10}-Streptomisin	15 mm-S		Trehaloz	24 h	-	**** α=Alfa, β=Beta, γ=Gamma			
	Co^{25}-Trimethoprin-sulfametakzol	12 mm-I			48 h	-	*****C: Merkezi (Santral), T:Uçta (Terminal), D: Değişken			
	T^{30}-Tetrasiklin	20 mm-S		Galaktoz	24 h	+				
	C^{30}-Kloramfenikol	11 mm-R			48 h	+				
Dekarboksilaz Testi	Arjinin	R.V.**		Fruktoz	24 h	-				
	Lizin	R.V.**			48 h	-				
Denitrifikasyon Testi	Nitratı nitrite indirgeme	+								
	N_2 gazı oluşumu	-								

EK-2

Bu doktora tez çalışması kapsamında Fresenius Environmental Bulletin dergisinde "Assessment of Metal and Antibiotic-Resistance in Marine Bacteria Isolated from Izmit Bay and Bosphorus Entrance of Marmara and Black Sea, Turkey" başlığı ile Vol.18, No.11' de, 18.11.2009 yayınlanmak üzere kabul edilmiştir.

ASSESSMENT OF METAL AND ANTIBIOTIC-RESISTANCE IN MARINE BACTERIA ISOLATED FROM IZMIT BAY AND BOSPHORUS ENTRANCE OF MARMARA AND BLACK SEA, TURKEY

Mine Gul-Seker,· Yosun Mater

Gebze Institute of Technology, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul Caddesi, No: 101, 41400, Gebze, Kocaeli, Turkey.

SUMMARY

Microbial characterization of marine habitat not only can shed a light on chemical and/or antibiotic toxicity with assessment of bacterial resistance, but also help us to understand the possible relationship between metal and antibiotic resistance. Therefore this study aims to characterize the marine bacteria purified from Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea together with determining their metal and antibiotic resistance. The results of the present study revealed that most of the selected isolates belonged to the genera *Acinetobacter* and *Bacillus* which can be referred to metal toxicity indicators with their significant resistance to Cu^{2+}, Cd^{2+} and Cr^{3+}. Majority of the metal resistant isolates were also resistant to at least 2 antibiotics and the incidence of metal-antibiotic double resistance between the metals Cd^{2+} and Cu^{2+} and the antibiotics chloramphenicol and ampicillin was 100 %. High level of co-existence of metal and antibiotic resistance observed in the isolates could possibly indicate the presence of plasmids and/or transposons encoding genes linked to both resistances.

KEYWORDS *Acinetobacter*, *Bacillus,* antibiotic resistance, contamination, heavy metal resistance, marine bacteria

INTRODUCTION

With the increase in industrialization and human settlement in recent years, latest reports [1, 2, 3] indicate metal contamination in Northeastern of Marmara Sea (Izmit Bay) and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea. Metal contaminants or other pollutants introduced to those sites through rivers or direct discharge related to not only industrial wastes, agricultural, sanitary (from hospitals) and municipal usage [4, 1], but also marine transportation (appox. 6000 vessels in year in Bosphorous), especially due to balast wastes in barrels and spillage of fuel oil due to accidents [5]. All of those contaminants might have caused an adaptation in marine bacterial populations to emerge in those areas and as a result of the exposure and adaptation, heavy metal resistance could be observed in microorganisms isolated from such location.

Up to now, most of the bioassay techniques, aiming to determine the pollution level of Izmit Bay and Black Sea utilized fish, invertebrates, microalgae [1] or sediments [3, 6] as indicators. However due to their ability to adapt to the specific habitat conditions, microorganisms are indeed one of the best indicators for rapid screening of toxicity. Interestingly very limited information is found in the literature in terms of bacterial species [7] that exist in the sample sites of the present study and their resistance to heavy metals and antibiotics.

Since the study sites have been reported as contaminated (especially Izmit Bay), the aims of the present study were; i) to identify the bacterial strains recovered in Izmit Bay, Bosphorus entrance of Marmara Sea and Black Sea, ii) to determine the heavy metal resistance of the isolated and purified marine bacteria, iii) to reveal the antibiotic resistance against widely used antibiotics (i.e., ampicillin, tetracycline, chloramphenicol) in Turkey, iv) to find out if there is a relationship between the antibiotic and heavy metal resistance, and v)

to check whether increased heavy metal and/or antibiotic resistance affects the expression of extracellular enzymes.

MATERIAL AND METHODS

Collection of Samples

Marmara and Black Sea samples were collected by researchers of rescue vessel (R/V) Arar research ship belonging to Istanbul University, Institute of Marine Sciences and Management. Izmit Bay samples were collected by researchers of Gebze Institute of Technology, Department of Environmental Engineering, in the frame of Turkish and German bilateral research project entitled "Integrated Modelling of Nutrients in Selected River Basins of Turkey" [8] during 2006-2007 with a research vessel. Position of sampling sites was recorded with the help of a Global Positioning System (GPS) technology. The sea water samples were obtained with a standard water sampler device (Hidro-Bios, Germany) from three different depths at two different stations of Bosphorus entrance (Fig. 1); Marmara Sea (10 m, 20 m, 100 m depth, latitudes 40º 50´ N and longitudes 28º 56´ E) and Black Sea (30 m, 40 m and 44 m, latitudes 41º 15´ N and longitudes 29º 14´ E). The other stations for samples were located at the internal (22 m depth, latitudes 40º 44´ N and longitudes 29º 54´ E), middle (35 m depth, latitudes 40º 44´ N and longitudes 29º 43´ E) and external (44 m depth, latitudes 40º 44´ N and longitudes 28º 26´ E) regions of Izmit Bay. Immediately after collection, samples were placed in sterile amber glass bottles, refrigerated and transported to the laboratory.

Isolation of Bacteria

The samples obtained from those five different stations and 9 different depths were inoculated on four different media [i.e., ZoBell Agar, Luria Agar, R2A Agar [9] and Tyrptic Soy Agar (Merck)], prepared either with marine water at different ratios [40, 50, 75 or 100 %

(v/v)] [10, 11, 12] or dH_2O, for isolation and maintenance of the cultures. The cultures were incubated for 24-96 h at 30 ºC, purified and preserved at -20 ºC in sterile 80 % glycerol (33 % v/v final volume) until use. Consequently total of 698 culturable marine isolates have been purified from the sample sites during two years and three seasons.

Identification of the Purified Isolates

All of the purified 698 marine isolates were initially characterized phenotypically by means of a combination of phenotypic tests including colonial apperance, cell morphology, Gram and spore staining, oxidase and catalase production. Following initial characterization, 53 out of 698 original isolates were preselected for further investigations according to their morphological and colonial growth features that showed some differences from others and they were then taxonomically characterized according to their capability to use 60 different compounds including carbon source utilization and enzymatic activities. The ability of isolates to oxidise those compounds was determined by using the VITEK 2 Compact Automatic Identification System (BioMérieux Inc., France). In order to characterize isolates with VITEK 2 Compact System, selected isolates were grown on its appropriate isolation medium depending on the isolate's preference at 30 ºC for 24 h. Then the isolates, that were obtained with using a loop under sterile conditions, were transferred to 12 X 25 mm clear polystrene tubes containing 3 ml saline water (0.45 % w/v) and the density of the suspensions was adjusted by DensiCheck^{TM} turbidity meter. The polysterene tubes were then located into the transfer cassette. Cards (BCL-21345 for Gram-positive spore-forming bacilli, GP-21342 for Gram-positive cocci and non-spore forming bacilli, GN-21341 for Gram-negative fermenting and non-fermenting bacilli) were also placed into the cassettes of VITEK 2 Compact System and the system evaluated each isolates at different incubation periods and determined the results at the species level.

Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Heavy Metals

Heavy metal resistance of the freshly cultured 53 selected isolates was determined by using Mueller-Hinton broth (Difco) supplemented with various concentrations of (from 12.5 μg/ml to >3200 μg/ml) 5 different heavy metals [cadmium (Cd^{2+}), copper (Cu^{2+}), chromium (Cr^{3+}), lead (Pb^{2+}) and manganese (Mn^{2+})]. All metal salts ($CdCl_2.2H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $CrCl_3$, $Pb(NO_3)_2$ and $MnCl_2.2H_2O$) were added to the medium from filter-sterilized stock solutions after autoclaving the medium at 121 °C for 20 min and cooling it to approximately 50 ºC. Bacterial isolates [0,5 Mc Farland (10^8 cfu/ml)] were transferred to 96-well ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) plates containing the appropriate broth medium and incubated at 30 ºC for 24 h. The MIC values of each isolate were determined visually and spectrophotometrically with reading in universal ELISA reader (EL_X 800, Bio-Tek Instruments Inc., USA) at 630 nm according to lowest concentration of heavy metals at which no growth was occurred, and they were considered as resistant if the MIC values exceeded the value of the *E. coli* K-12 strain (control) [13].

Determination of Antibiotic Resistance

Antibiotic resistance of the selected 53 isolates were revealed according to the agar diffusion method described by Bauer *et al.* [14] in which Mueller-Hinton agar and 8 antibiotic discs representing 7 classes of antibiotics, i.e., gentamicin (10 μg), nalidixic acid (30 μg), spectinomycin (100 μg), ampicillin (10 μg), streptomycin (10 μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25 μg), tetracycline (30 μg) and chloramphenicol (30 μg) were used. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, which were recommended by NCCLS [15], were used as control strain in order to verify the antibacterial effect of the discs. All discs were obtained from Himedia (Italy) and the sensitivity of isolates were determined according to the manufacturer's recommendation. In addition, multiple antibiotic resistance (MAR) index values were calculated as a/b in which "a" represents the

number of antibiotics that the selected isolate was resistant to and “b” represents the total number of antibiotics that the isolate was tested against [13]. A MAR index exceeding 0,2 was considered as the isolates were exposed to high risk sources of human or animal contamination, where antibiotic use is common. A MAR index below or equal to 0,2 indicated that antibiotic were seldom or never used [16].

Screening of Isolates for Extracellular Enzyme Production

As regards the presence of extracellular enzymes such as amylase, protease, cellulase, oxidase, catalase, nitrate reductase and gelatinase, different enzymatic agar plate assays or tubes, detailed below, were performed on 53 isolates.

Extracellular Amylase Production

Amylolytic activity was determined by inoculating the samples to autoclaved (at 121 ºC for 20 min) Nutrient Agar (NA) prepared by addition of adequate amount of sea water, in accordance with the isolation medium, to the 1 % (w/v) soluble starch (Fluka). Following the incubation at 30 ºC for 48 h, the plates were flooded with 0,3 % iodine (I_2)-0,6 % potassium iodide (KI) solution. The clear zone around the colony indicated the hydrolytic activity on starch [17, 18].

Extracellular Protease Production

The presence of proteolytic activity on plates were determined by following the method reported by Bora and Kalita [17]. The method consists of using NA medium supplemented with Skim milk solution which was sterilized by autoclave (at 110 ºC for 15 min). Following incubation of 48 h at 30 ºC, a clear zone appeared around the colony indicated the presence of proteolytic activity [17, 18].

Extracellular Cellulase Production

Cellulase presence on plates were screened according to Bora and Kalita [17] with using autoclaved NA media containing 1 % (w/v) carboxy methyl cellulose (CMC-Alfa Aesar) and adequate amount of sea water. After incubation of 48 h at 30 ºC, Petri dishes were flooded with an aqueous solution of Congo red (Merck) for 15 min. After cleaning Petri dishes with 1 M NaCl solution, cellulase presence was determined by yellow zones around the colonies [17,18, 19, 20].

Extracellular Oxidase, Catalase, Gelatinase and Nitrate Reductase Production

The presence of oxidase, catalase, and gelatinase in the 53 isolates were carried out according to the standard microbiological methods described by Alexander and Strete [21] whereas nitrate reductase test was carried out according to the test kit (Fluka) prospectus.

RESULTS

Isolation and Identification of Marine Bacteria

Most isolates identified by using VITEK 2 Compact Automatic Identification System were taxonomically classified as members of the genera: *Acinetobacter* (21 isolates which 18 of them is *A. baumannii* and 3 of them is *A. haemolyticus*), *Bacillus* (16 isolates that all were classified as *B. cereus/B. thrungiensis*), *Sphingomonas* (2 isolates both were *S. paucimobilis*), *Brevibacillus* (1 isolate identified as *B. laterosporus*), *Brevundimonas* (1 isolate belonging to *B. diminuta/B. vesicularis*) and *Brucella* (1 isolate of *B. melitensis*) (Table 1). 11 out of 53 isolates were unidentified as they were not compatible with the database of the identification system. It is quite remarkable and sensational that these species have probability to be a new species and/or subspecies. However, these presumption should be evidenced with using further analysis at the molecular level (i.e., 16S rRNA analysis).

Heavy Metal Resistance

Selected 53 isolates were found to be resistant to different concentrations of heavy metals, as it can be evidenced from their MICs ranging from 25 μg/ml to >3200 μg/ml (Table 2). In assessing the range of MICs obtained, a maximum of MIC (>3200 μg/ml) was observed for Pb^{2+}, with a minimum for Cd^{2+} (25 μg/ml), although only a single isolate for each value existed, both of which were collected from Izmit Bay. Among the isolates, samples of Marmara Sea showed a maximum resistance (100 %, 100 % and 72.7 %) to three of the heavy metals (Cd^{2+}, Cu^{2+} and Cr^{3+}, respectively), however they were very sensitive (27.3 %) to Pb^{2+} and did not survive at all at the Mn^{2+} concentrations exceeding the MIC of the *E. coli* K-12 strain. The trend in resistance to heavy metals was $Cd^{2+} = Cu^{2+} > Cr^{3+} > Pb^{2+} > Mn^{2+}$. Similarly, the samples of Black Sea exhibited a high resistance to Cd^{2+}, Cu^{2+} and Cr^{3+} (100 %, 92.3 % and 92.3 %, respectively) and relatively less resistance (53.8 %) to Pb^{2+} and no resistance to Mn^{2+}. Their trend of resistance was $Cd^{2+} > Cu^{2+} = Cr^{3+} > Pb^{2+} > Mn^{2+}$. Samples isolated from Izmit Bay were the ones that had resistance to all of the heavy metals tested, at varying percentages, with the resistance trend of $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Pb^{2+} > Mn^{2+}$. As it can be seen from its resistance trend, Izmit Bay isolates showed maximum resistance (93.1 %) to Cu^{2+} whereas 89.7 % to Cd^{2+}, 62 % to Cr^{3+} and 34.5 % to Pb^{2+}. One (*Sphingomonas paucimobilis)* out of 29 Izmit Bay isolates also showed resistance to Mn^{2+}. Except that isolate, Mn^{2+} was the only heavy metal that was found to be highly toxic to all other isolates purified from different collection sites. In addition, Izmit Bay isolates were also the ones that had the highest multiple resistance to heavy metals (Fig. 2). 10 out of 29 (34 %) of the isolates showed resistance to 4 (9 of them to Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} and Pb^{2+} and 1 of them to Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} and Mn^{2+}) heavy metals whereas 7 isolates (24 %) to 3 (6 of them to Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} and 1 of them to Cu^{2+}, Cr^{3+} and Pb^{2+}), 10 isolates (34 %) to 2 (1 of them to Cd^{2+} and Cr^{3+} and 9 of them to Cd^{2+} and Cu^{2+}) and 1 isolate (3.4 %) to 1 tested heavy metal (Cu^{2+}). From 29 isolates,

1 isolate of *Sphingomonas paucimobilis* was also found to be sensitive to all of the heavy metals used in the study. In the case of Marmara and Black Sea isolates, relatively similar percentages were obtained for the multiple heavy metal resistance. Our results showed that 3 out of 11 isolates (27 %) had resistance to 4 (Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} and Pb^{2+}), 5 isolates (45 %) to 3 (Cd^{2+}, Cu^{2+} and Cr^{3+}), 3 isolates (27 %) to 2 tested heavy metals (Cd^{2+} and Cu^{2+}) in former, while, 6 out of 13 isolates (46 %) showed resistance to 4 (Cd^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} and Pb^{2+}) and 3 (Cd^{2+}, Cu^{2+} and Cr^{3+}) and 1 isolate (*Brucella melitensis,* 7.6 %) to 2 (Cd^{2+} and Pb^{2+}) tested heavy metals in the latter.

When the heavy metal resistance was assessed according to bacterial genera isolated from the study sites it could be seen that the genera of *Acinetobacter* and *Bacillus* showed multiple heavy metal resistance (ranging from 2 to 4 metals) irrespective of the sampling sites. However as only a few isolates of *Brevundimonas*, *Brucella* and *Sphingomonas* were isolated, the heavy metal resistance of these isolates should be assessed by using more isolates.

Antibiotic Resistance Patterns and MAR Index

In antibiotic resistant assay, all the isolates showed resistance with varying percentages to nalidixic acid (30 μg), spectinomycin (100 μg), ampicillin (10 μg), streptomycin (10 μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25 μg) and chloramphenicol (30 μg) (Fig. 3). In general, the isolates showed a maximum resistance to chloramphenicol followed by ampicillin, spectinomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin and nalidixic acid, respectively. Gentamicin and tetracycline were the only tested antibiotics that all of the isolates exhibited sensitivity to irrespective of the collection sites. As it can be evidenced from Fig. 3, Izmit Bay and Black Sea isolates showed relatively higher resistance to spectinomycin, streptomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole than the isolates purified

from Marmara Sea. Also, samples of Marmara Sea were found to be sensitive to nalidixic acid and streptomycin in addition to their sensitivity to gentamicin and tetracycline.

As shown in Fig. 4, 4 isolates of the Black Sea (36.7 %) exhibited resistance to 4 antibiotics while isolates of Marmara Sea and Izmit Bay were predominantly resistant [8 isolates (72.7 %) and 17 isolates (58.6 %), respectively] to 2 antibiotics. Izmit Bay and Black Sea isolates showed resistance up to 5 antibiotics, whereas those from Marmara Sea were resistant to 3 or fewer antibiotics.

The presence of antibiotic resistance in the isolates gave oppurtunity to calculate also the MAR index of the samples in order to reveal if the antibiotics were used in common or seldom in our collection sites. The results showed that the MAR indexes of both samples from Izmit Bay (0,125-0,625) and Black Sea (0,250-0,625) were higher than those from Marmara Sea (0,250-0,375). Although the lowest MAR index of Izmit Bay samples was 0,125, which belongs to only one isolate (*Sphingomonas paucimobilis*), MAR indexes of the majority of the other Izmit Bay samples were ranging between 0,250 and 0,625. As MAR indexes of 52 samples exceed 0,2, our results clearly demostrate that those isolates, no matter which sea they were isolated from, were exposed to high risk sources of human and animal contamination where antibiotic usage was common.

Interaction of Heavy Metal with Antibiotic Resistance

Except one isolate of *Sphingomonas paucimobilis* that was isolated from Izmit Bay, all of the other isolates were resistant to at least 2 heavy metals and antibiotics which evidenced that there was an interaction between multiple heavy metal and antibiotic resistance (Table 3). Heavy metal resistant Marmara Sea samples also exhibited resistance up to 3 antibiotics namely ampicillin, chloramphenicol and spectinomycin (in the case of *Acinetobacter baumannii*) or trimethoprim-sulfamethoxazole (*Bacillus cereus/B. thuringiensis*) while heavy

metal resistant Izmit Bay and Black Sea isolates showed resistance up to 5 antibiotics (spectinomycin, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin and chloramphenicol). With all the metals tested, it was observed that the majority of the heavy metal resistant isolates, irrespective of their collection sites, were also resistant to at least 2 antibiotics (ampicillin and chloramphenicol).

Interaction of Heavy Metal and Antibiotic Resistance with Extracellular Enzyme Production

The majority of the isolates that were capable of producing extracellular enzymes belonged to the Gram-positive genera *Bacillus* (Table 4). The multiple metal and antibiotic resistant representatives of these genera had ability to produce at least 5 of the tested enzymes (catalase, nitrate reductase, gelatinase, amylase and protease with 43.7 % frequency). All of these isolates were amylase and protease producers, whereas other 5 isolates were cellulase producers. Moreover, one isolate of *B. cereus/B. thuringiensis* which was isolated from Izmit Bay was able to produce all of the tested enzymes. In addition, it was found that most of the multiple metal and antibiotic resistant unidentified isolates belonging to Gram-positive strain also could produce at least 5 enzymes. Among the Gram-negative, representatives of the genera *Acinetobacter*, which widely existed in the sample sites of the present study, were predominant. The multiple metal and antibiotic resistant Izmit Bay and Marmara Sea isolates belonging to this genera could produce at least 2 enzymes (catalase and nitrate reductase with 61.9 % frequency). However, multiple metal and antibiotic resistant Black Sea isolates of this genera could produce up to 5 enzymes. Among the enzymes that has more industrial importance, the number of *Acinetobacter* isolates that could produce protease was higher (6 isolates) than amylase producers (1 isolate). None of those isolates were able to produce cellulase.

DISCUSSION

In the presence of toxic compounds, microorganisms undergo selection pressures and the survival depends on their ability to develop resistance [22, 23]. With this aspect, isolates collected from contaminated Izmit Bay, Marmara and Black Sea already had or gained resistance to conditions existing in sample sites. When the genera of the isolates were examined, it was observed that the majority of the identified isolates were belonging to the genera of *Acinetobacter* (50 %) and *Bacillus* (38 %). Similar to our results, there are several reports published about the isolation of the former from the polluted River Taff in Wales [24] and beach in Tel Aviv [25]. Also, the presence of the *Bacillus* in especially metal contaminated environments was again reported in previous studies [26, 27, 28, 29] which possibly indicates its dominance in the communities of colony forming organisms in metal polluted sites [29].

Metal and antibiotic resistances are the most common features that the bacteria gain due to the bio-essentiality or abuse of the metal and/or antibiotics [30]. Among the tested heavy metals, Cu^{2+}, Cr^{3+} and Mn^{2+} were essential metals while Pb^{2+} and Cd^{2+} were non-essential metals and were toxic to biological systems, even in traces [31]. In the present study, irrespective of the collection sites, relatively higher amount of $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+}$ resistant isolates were obtained. The result suggested that those heavy metals were highly accumulated in the sample collection sites. It was reported that Cr^{3+} and Cu^{2+} were used as markers or tracers of metal industries [32, 33, 34] whereas Cd^{2+} and Pb^{2+} were known as the markers of paint industries [35, 36]. As storage tanks for different kinds of solvents used in paint, petroleum, plastic and pesticide industries are located especially nearby of the Izmit Bay [2], and this area is affected by coal-fueled iron and steel industries [3], our findings in respect to

heavy metal resistant isolates were in correlation with other previously reported studies [2, 3, 6] carried out on fishes or sediments of the Bay.

When all the samples, irrespective of the collection sites, were examined, the highest frequency of bacterial antibiotic resistance was found for chloramphenicol (52.8 %) and ampicillin (50.9 %). Although usage of chloramphenicol has a serious side effects (i.e. aplastic anemia), it is still widely used against a wide variety of microorganisms especially in low income countries due to its low cost. Ampicillin, belonging to penicillin group antibiotics, is the other widely consumed antibiotic as it is used for the treatment of a wide range of bacterial infections. Higher resistance to ampicillin was also reported in other studies [30, 37] carried out on different marine samples. The existence of relatively high resistance in our isolates to antibiotics could be due to the widespread usage of these metabolites in Turkish hospitals [38] and their effluents to the sea with disposal of urban sewage. Moreover, in accordance with this presumption, there are reports in literature about *Acinetobacter* regarding to its resistance to commonly used antibiotics and its ability to form a reservoir of antibiotic resistant genes, particularly in hospital environments [39].

Many recently published reports [40, 41] suggest that the presence of metal contamination in natural environments could have a role in the maintenance and proliferation of antibiotic resistance. In the present study, the most abundant resistance (24.5 %) of the isolates was found to be against to Cd^{2+} and Cu^{2+}. In addition, the incidence of metal-antibiotic double resistance existed between those two metals and chlorampenicol and ampicillin was calculated as 100 %, while this percentage was relatively very low (16.7 %, 16.7 % and 8.3 %) for the other tested antibiotics (spectinomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole and streptomycin, respectively).

The occurence of multiple resistance either to metals or antibiotics or to both was observed in all of the sample collection sites of this study probably by virtue of presence of plasmids and/or transposons encoding genes linked to metal and/or antibiotic resistance [30]. In instance where these genes are grouped on the same plasmid, it can be assumed that either heavy metals or antibiotics could be served as selection pressures for populations of bacteria hosting these plasmids (42). Indeed, there are reports on *Acinetobacter*, which was the most abundant genera in the present study, concerning the presence of its indigenous plasmid that is linked to the heavy metal and antibiotic resistance [39]. In addition, except one isolate, the majority of chloramphenicol resistant isolates were also exhibited resistance to ampicillin, suggesting that chloramphenicol resistance may be carried on a plasmid that also codes resistance to ampicillin (like ACCoT plasmid carrying codes for ampicillin, chloramphencol, co-trimoxazole and tetracyline). Similar bacterial resistance to multiple heavy metals and antibiotics was also reported not only in Iskenderun Bay [13] of Turkey, but also in Providence river and Narragansett bay [43] and Antarctic Marine [30].

Inhibition of growth is usually used to reveal the toxicity of a chemical or antibiotic to a microorganism and this measurement was utilised in the present study for the identification of heavy metal and antibiotic resistance of samples isolated from Izmit Bay, Marmara and Black Sea. However, other features like oxygen consumption [44], ATP level [45] or enzyme production [46] could also indicate the toxicity of an agent to a microorganism. The last approach was utilised in the present study, both to screen the production of enzymes in the isolates and to determine if there was an interaction exists between heavy metal and/or antibiotic resistance and enzyme production. Our studies indicated that there was a variation in the enzyme profile of the resistant isolates. Especially, majority of Izmit Bay and Marmara Sea isolates of *Acinetobacter* had less range of enzyme activity compared to other multiple resistant isolates. However, as all of the isolates obtained in the present study (except two

isolates of *Sphingomonas paucimobilis*) showed resistance to at least 2 or more heavy metals and antibiotics, it was not possible to compare the enzyme production of single resistant isolates to multiple resistant isolates.

It is worthy to mention that combined hydrolytic activities have been detected in majority of not only genus *Bacillus* but also unidentified isolates. The representatives of *Bacillus* are well known enzyme-producers and many species of this genus are used in many industrial processes for the commercial enzyme production [47]. More interestingly, most of the multiple metal and antibiotic resistant unidentified isolates were capable of producing at least 5 enzymes which make them good candidates for biotechnological applications.

CONCLUSION

Taxonomic classification of the selected isolates identified 42 of the 53 samples while it was not possible to identify 11 isolates at the species level. Majority of the identified ones were belonging to the *Acinetobacter* and *Bacillus* genera, possibly indicating the metal toxicity of the sites. In general, samples isolated from all three sites exhibited a strong resistance to Cd^{2+}, Cu^{2+}, and Cr^{3+}, and relatively lower (and even nil in the case of samples from Marmara Sea and Black Sea) to Pb^{2+} and Mn^{2+}. In addition to their metal resistance, isolates showed maximum resistance to two of the tested antibiotics (chloramphenicol and ampicillin) that are widely used in Turkey. Moreover, with only one exception, all the isolates showed resistance to at least 2 heavy metals (Cd^{2+} and Cu^{2+}) and antibiotics (chlorampenicol and ampicillin), evidencing the interaction between the metal and antibiotic resistance. As regards the effect of achieved metal- and/or antibiotic-resistance on the bacteria's natural ability to produce extracellular enzymes, a clear indication of an alternative enzyme production ability could not be evidenced as it was not possible to compare the enzyme activity of single resistant isolates to multiple resistant isolates. On the other hand, the enzyme

assay revealed that most of the unidentified, metal- and antibiotic-resistant isolates were able to produce significant number of enzymes which makes them valuable candidates for the further analysis and characterization for their utilization in biotechnological applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors greatly acknowledge the Gebze Institute of Technology for the financial support of the study as a scientific research project (Project no 2006-A-2). Special thanks are also due to Istanbul University, Institute of Marine and Management and Science and Gebze Institute of Technology, Environmental Engineering Department for their technical assistance in sampling, and Pendik Veterinary Research Institute for kindly providing the possibility to use VITEK-2 Compact Device. Authors also wish to express their appreciation to O. Asker for her assistance and support, and to Dr. Y. Ozden-Tokatli and Dr. A. Ozudogru for critically reviewing the manuscript.

REFERENCES

[1] Topcuoğlu, S., Kırbaşoğlu, C., and Güngör, N. (2002). Heavy metals in organisms and sediments from Turkish Coast of the Black Sea, 1997–1998. Environment International, 27, 521– 526.

[2] Pekey, H., Karakaş, D., Ayberk, S., Tolun, L., and Bakoğlu, M. (2004). With its east-west elongated shape, ecological risk assessment using trace elements from surface sediments of Izmit Bay (Northeastern Marmara Sea) Turkey, Marine Pollution Bulletin, 48, 946–953.

[3] Pekey, H. (2006). The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected by a polluted stream. Marine Pollution Bulletin, 52, 1197–1208.

[4] Taşdemir, Y. (2002). Marmara Sea: pollutants and precautions that can be taken from environmental aspect. Uludag University, Journal of Faculty of Engineering-Architecture, 7 (1), 39-45 (*in Turkish*).

[5] Güven, K. C., Ünlü, S., Çetintürk, K., and Okuş, E. (2004). Oil pollution Bosphorus, Golden Horn and Sea of Marmara after M/V GOTIA Ship Accident. Journal of Black Sea/Mediterranian Environment, 10, 85-102.

[6] Tolun, L. G., Okay, O. S., Gaines, A. F., Tolay, M., Tüfekçi, H., and Kıratlı, N. (2001). The pollution status and the toxicity of surface sediments in Izmit Bay (Marmara Sea),Turkey. Environment International, 26, 163-168.

[7] Aslan-Yılmaz, A., Okuş, E., and Övez, S. (2004). Bacteriological indicators of anthroogenic impact prior to and during the recovery of water quality in an extremely polluted estuary, Golden Horn, Turkey. Marine Pollution Bulletin, 49, 951-958.

[8] Karpuzcu, M., Agiragaoglu, N., Alpaslan, N., Engin, G., Gömann, H., Gunduz, O., Kocal, M., Oncel, S., Pekdeger, A., Voigt, H., Kuhr, P., Montzka, C., Tetzlaff, B., Vereecken, H., and Wendland, F. (2008). Integrated Modelling of Nutrients in selected river basins of Turkey: Results of a bilateral German-Turkish Research Project. Vol 17, 150-153. Forchungszentrums Julich.

[9] Atlas, R. M. (1997). Handbook of microbiological media, (Ed. Parks L. C.), Second Edition, New York, London, Tokyo, CRC Press.

[10] Morris, K., Hartzell, E., Mentzer, B., and Sidie, J. (2001). Growth of Gram (+) Bacteria in Seawater Enriched Media. Journal of Pennsylvania, Academic Science, 74:140.

[11] Kwon, K. K, Lee, H. S., Jung, S. Y., Yim, J. H., Lee, J. H., and Lee, H.K. (2002) Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. Journal of Microbiology, 40 (4), 260-266.

[12] Park, H. S., Kwon, K. K., Lee, D. S., and Lee, H. K. (2002). Morphological diversity of marine microorganisms on different isolation media. The Journal of Microbiology, 40 (2), 161-165.

[13] Matyar, F., Kaya, A., and Dinçer, S. (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment, 407, 279-285.

[14] Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.

[15] NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standards M2-A6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 6th ed., NCCLS., Wayne, Pennsylvania. 1997.

[16] Krumperman, P. H. (1985). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied Environmental Microbiology, 46, 165–70.

[17] Bora, L. and Kalita, M. C. (2007). Occurence and extracellular enzymatic activity profiles of bacterial strains isolated from West Kamang district of Arunachal Pradesh, India. The Internet Journal of Microbiology, 4 (1). http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePat=journals/ijmb/vol4n1/hotsprings.xmlAccessed 3 December 2008.

[18] Akhtar, N., Ghauri, M. A., Iqbal, A., Anwar, M. A., and Akhtar, K. (2008). Biodiversity and phylogenetic analysis of culturable bacteria indigenous to Khewra Salt Mine of Pakistan and their industrial importance. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 143-150.

[19] Teather, R. and Wood, P. J. (1982). Use of Congo-red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology, 43 (4), 777-780.

[20] Sazci, A., Radford, A., and Erenler, K. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo-red as an indicator: A comparative study with dinitrosalycyclic acid reagent method. Journal of Applied Bacteriology, 61, 559-562.

[21] Alexander, SK. and Strete, D. (2001). Microbiology: a photographic atlas for the laboratory, New York, Benjamin Cumings Pub.

[22] Hideomi, N., Ishikawa, T., Yasunaga, S, Kondo, I., and Mitsuhasi S. (1977). Frequency of heavy-metal resistance in bacteria from inpatients in Japan. Nature, 266, 165–167.

[23] Mudryk, Z.J., (2002). Antibiotic resistance among bacteria inhabiting surface and subsurface water layers in estuarine Lake Gardno. Polish Journal of Environmental Studies, 11 (4), 401-406.

[24] Rochelle, P. A., Day, M. S., and Fry, J. C. (1988). Occurence, transfer and mobilization in epilithic strains of *Acinetobacter* of mercury resistance plasmid capable of transformation. Journal of Genetic Microbiology, 134, 29-33.

[25] Reisfeld, A., Rosenberg, E., and Gutnick, D. (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. Applied Microbiology, 3 (24), 363-368.

[26] Hassan, E. S., Banat, I. M., Shahawi, M. S. E., and Abu-Hilal, A. H. (1996). Bacterial nutrients and heavy metal ions pollution assessment along the eastern coastal area of the United Arab Emirates. Journal of Aquatic Ecosystem Health, 5, 73-81.

[27] Olukoya, D. K., Smith, S. I., and Ilori, M. O. (1997). Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. Folia Microbiology, 42 (5), 441-444.

[28] Narita, M., Chiba, K., Nishizawa, H., Ishii, H., Huang, C. C., Kawabata, Z., Silver, S., and Endo, G. (2003). Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. FEMS Microbiology Letters, 233, 73–82.

[29] Kamala-Kannan, S. and Jae Lee, K. (2008). Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunehan Bay Sediments, South Korea, Biotechnology, 7(1), 149-1.

[30] De Souza, M. J., Nair, S., Bharathi, P. A. L., and Chandramohan, D. (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine Waters. Ecotoxicology, 15, 379–384.

[31] Türkmen, A., Türkmen, M., Tepe, Y., and Akyurt, I. (2005). Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea. Turkey, Food Chemistry, 91, 167–172.

[32] Jervis, R. E., Ko, M. M. C., Junliang, T., and Puling, L. (1993). Multivariant analyses of trace element patterns for environmental tracking. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 169 (2), 363–379.

[33] Gallego, J. L. R., Ordo´nez, A., and Loredo, J. (2002). Investigation of trace element sources from an industrialized area (Avile´s, Northern Spain) using multivariate statistical methods. Environment International, 27, 589–596.

[34] Loska, K., Wiechula, D., and Korus, I. (2004). Metal contamination of farming soils affected by industry. Environment International, 30 (2), 159–165.

[35] Aksu, A. E., Yasar, D., and Uslu, O. (1998). Assessment of marine pollution in Izmir Bay: heavy metal and organic compound concentrations in surficial sediments. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 22, 387–416.

[36] Lin, Y. P., Teng, T. P., and Chang, T. K. (2002). Multivariate analysis of soil heavy metal pollution and landscape pattern in Changhua county in Taiwan. Landscape and Urban Planning, 62, 19–35.

[37] Zemelman, R., Silva, J., and Herriques, M. (1980). Antibiotic resistant bacteria in seawater from Concepcion Bay. Archives of Biological Experiments, 13, 121.

[38] Matyar, F., Dinçer, S., Kaya, A., and Çolak, O. (2004). Prevalence and resistance to antibiotics in Gram-negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. Annals of Microbiology, 54 (2), 151-160.

[39] Towner, K. J., Bergogne-Berezin, E., and Fawson, C.A. (1991). The biology of *Acinetobacter*: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance, FEMS Symposium, No:57, New York, Plenum Press.

[40] Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology, 3, 1–9.

[41] Summers, A.O. (2002). Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. Clinical Infectious Diseases, 34 (3), 85–92.

[42] Timony, J. F., Port, J., Giles, J., Spanier, J. (1978). Heavy-metal and antibiotic resistance in bacterial flora of sediments of New York Bight. Applied and Environmental Microbiology, 36 (3) 465-472.

[43] Traxler, R. W. and Wood, E. M. (1981). Multiple metal tolerance of bacterial isolates. In: Underkofler LA, Wulf ML (eds) Developments in industrial microbiology, vol 22 Flagstaff, AZ (USA) 1980, pp 521–528.

[44] Slabbert, J. L. and Grabow, W. O. K. (1986). A rapid water toxicity screening test based on oxygen uptake of *Pseudomonas putida.* Toxicology Assessment, 1, 13-26.

[45] Parker, C. E. and Pribyl, E. J. (1984). Assessment of bacterial ATP response as a measurement of aquatic toxicity, In: Liu, D. and Dutka, B. J. (eds). Toxicity screening Procedure Using Bacterial Systems, pp. 283–293, New York, Dekker.

[46] Dutka, B. J. and Bitton, G. (1986). Toxicity testing using microorganisms. Vol. 2, Boca Raton, CRC Press.

[47] McConnell, D. J., Cantwell, B. A., Devine, K. M., Forage, A. J., Laoide, B. M., O'Kane, C., Ollington, J. F. and Sharp, P. M. (1986). Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. Annual New York Academy of Science, 469, 1–17.

CORRESPONDING AUTHOR

Yosun Mater
Gebze Institute of Technology
Faculty of Science
Biology Department
Istanbul Caddesi, No: 101, 41400, Gebze, Kocaeli
Turkey

Phone: 00902626053099
Fax: 00902626053055
e-mail: ymater@gyte.edu.tr

TABLE 1 - The distribution of the identified / unidentified isolates according to the sample collection stations and depths.

Isolation point		*A. baumannii*	*B. cereus/ B. thuringiensis*	*A. haemolyticus*	*S. paucimobilis*	*B. melitensis*	*B. diminuta/ B. vesicularis*	*B. laterosporus*	U**	Total
	10 m	2	1	-	-	-	-	-	-	3
M*	20 m	3	3	1	-	-	-	-	-	7
	100 m	1	-	-	-	-	-	-	-	1
	I*	4	4	-	-	-	-	-	1	9
IB*	Mi*	2	5	-	1	-	-	1	4	13
	E*	-	-	-	1	-	1	-	5	7
	30 m	-	-	-	-	1	-	-	-	1
B*	40 m	4	3	2	-	-	-	-	-	9
	44 m	2	-	-	-	-	-	-	1	3
Total		18	16	3	2	1	1	1	11	53

* M, Bosphorus entrance of Marmara Sea; IB, Izmit Bay; B, Bosphorus entrance of Black Sea ; I, Internal region of Izmit Bay; Mi, Middle region of Izmit Bay; E, External region of Izmit Bay.

** U, Number of unidentified isolates.

TABLE 2 - Minimal Inhibition Concentrations (MIC) of bacteria isolated from Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea samples.

Heavy metal/ environment	n	Metal concentrations (μg/ml) with number of sensitive isolates										Resistant isolates***	
		12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	>3200	n	%
Cadmium					*								
M**	11	-	-	-	-	1	6	-	4	-	-	11	100
IB**	29	-	1	2	-	3	5	2	16	-	-	26	89.7
B**	13	-	-	-	-	-	-	8	4	1	-	13	100
Copper						*							
M	11	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	11	100
IB	29	-	-	-	1	1	27	-	-	-	-	27	93.1
B	13	-	-	-	-	1	12	-	-	-	-	12	92.3
Chromium								*					
M	11	-	-	-	-	-	-	3	-	8	-	8	72.7
IB	29	-	-	-	-	-	-	11	1	17	-	18	62.0
B	13	-	-	-	-	-	1	-	-	12	-	12	92.3
Lead									*				
M	11	-	-	-	-	-	-	-	8	3	-	3	27.3
IB	29	-	-	-	-	-	-	3	16	9	1	10	34.5
B	13	-	-	-	-	-	-	-	6	7	-	7	53.8
Manganese									*				
M	11	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	0	0
IB	29	-	-	-	-	-	-	4	24	1	-	1	3.4
B	13	-	-	-	-	-	-	1	12	-	-	0	0

*Minimal inhibition concentration of control strain *Escherichia coli* K12.

** Samples taken from M: Marmara Sea, IB: Izmit Bay, B: Black Sea.

*** The isolates considered as resistant if the MIC values exceeded the value of *E. coli* K12 strain.

TABLE 3 - Comparison of multiple resistance to heavy metals and antibiotics in Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea samples.

Heavy metals	Antibiotics	Number of isolates			*Total*
		M	IB	B	
1	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	1	-	1
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
2	1	-	-	-	-
	2	2	8	1	11
	3	1	1	-	2
	4	-	-	-	-
	5	-	1	-	1
3	1	-	-	-	-
	2	3	4	1	8
	3	2	2	3	7
	4	-	1	2	3
	5	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	3	5	2	10
	3	-	4	1	5
	4	-	1	2	3
	5	-	-	1	1
	Total	*11*	*28*	*13*	*52*[*]

[*]As 1 (*Sphingomonas paucimobilis* isolated from Izmit Bay) out of 53 isolates was sensitive to all of the tested heavy metals, this isolate was not included in this table.

TABLE 4 - Expression of multiple heavy metal and antibiotic resistance and extracellular enzyme activity of 53 marine isolates.

Isolate no	Antibiotic	Metal	Identification	Gram staning	Presence of extracellular enzymes						
					Catalase	Oxidase	Nitrate reductase	Gelatinase	Amylase	Protease	Cellulase
Total	8	5									
1	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
2	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
3	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
4	2	3	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	-
5	2	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
6	2	4	Unidentified	-	+	-	+	-	-	-	-
7	3	1	*Sphingomonas paucimobilis*	-	+	+	+	*nd**	-	-	-
8	1	0	*Sphingomonas paucimobilis*	-	+	-	+	+	+	+	-
9	2	2	*Bacillus cereus/thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
10	3	4	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	-
11	2	4	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	-
12	4	3	Unidentified	+	+	-	+	*nd*	-	-	-
13	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
14	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
15	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	-
16	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	+
17	3	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
18	2	2	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	-
19	2	2	*Brevibacillus laterosporus*	+	+	-	+	+	+	+	-
20	3	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
21	4	4	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	+
22	3	2	*Bacillus cereus/ B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
23	3	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
24	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
25	5	2	Unidentified	-	+	+	+	-	-	-	-

Table 4 (*continued*)

26	2	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
27	2	2	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	-
28	3	4	*Brevundimonas diminuta/ B.vesicularis*	-	+	+	+	-	-	-	-
29	2	4	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	+
30	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
31	4	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	+	+	-
32	5	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
33	3	4	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	+	-	+	-
34	2	2	*Brucella melitensis*	-	+	-	+	*nd*	-	+	-
35	4	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
36	4	3	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	+	-	+	-
37	2	4	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
38	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	+
39	4	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	+	-
40	3	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	+	-	-	-
41	3	3	Unidentified	+	+	-	+	+	+	+	+
42	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
43	2	4	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
44	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
45	2	2	*Bacillus cereus/ B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	-
46	2	3	*Acinetobacter baumannii*	-	+	-	+	-	-	-	-
47	2	2	*Bacillus cereus/ B.thuringiensis*	+	+	+	+	+	+	+	-
48	3	3	*Acinetobacter baumanni*	-	+	-	+	-	-	-	-
49	3	3	*Acinetobacter baumanni*	-	+	-	+	-	-	-	-
50	2	4	*Acinetobacter haemolyticus*	-	+	-	+	-	-	-	-
51	2	4	*Acinetobacter baumanni*	-	+	-	+	-	-	-	-
52	3	3	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-
53	3	2	*Bacillus cereus/B.thuringiensis*	+	+	-	+	+	+	+	-

*nd: not determined.

FIGURES:

FIGURE 1 - Map of Turkey showing Black Sea, Marmara Sea and Izmit Bay. Arrows illustrate the sampling sites.

FIGURE 2 - The number of multiple heavy metal resistant bacteria isolated from Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea samples. M, Marmara Sea; IB, Izmit Bay; B, Black Sea.

FIGURE 3 - The number of antibiotic resistant bacterial strains isolated from Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea samples. M, Marmara Sea; IB, Izmit Bay; B, Black Sea.

FIGURE 4 - The number of multiple antibiotic resistant bacterial strains isolated from Izmit Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea samples. M, Marmara Sea; IB, Izmit Bay; B, Black Sea.

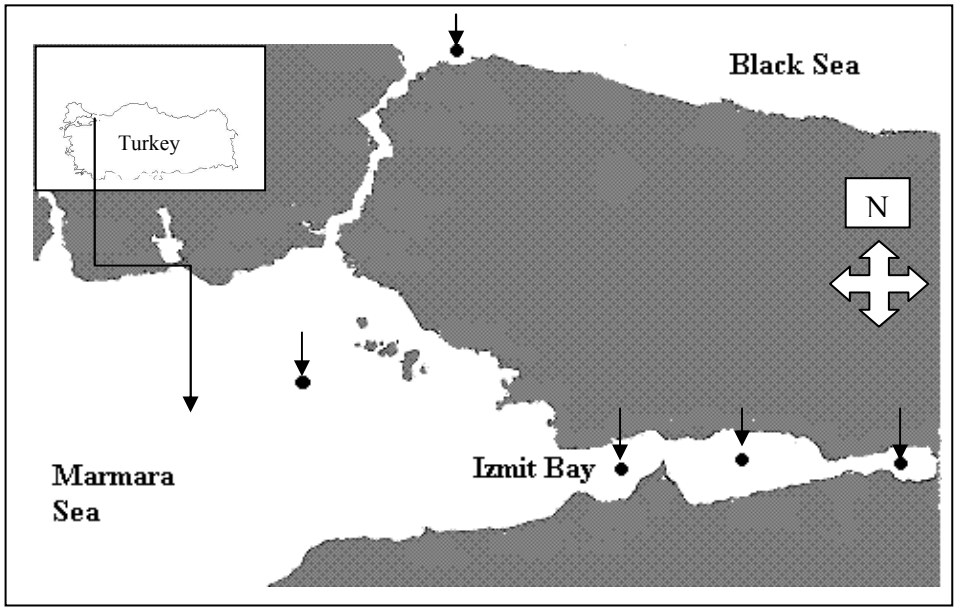


FIGURE - 1

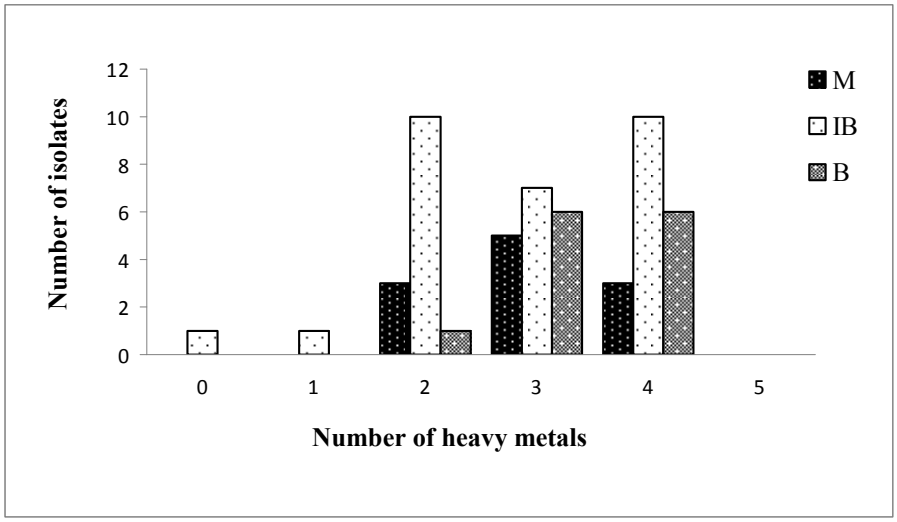

Number of isolates
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
Number of heavy metals
M
IB
B

FIGURE - 2

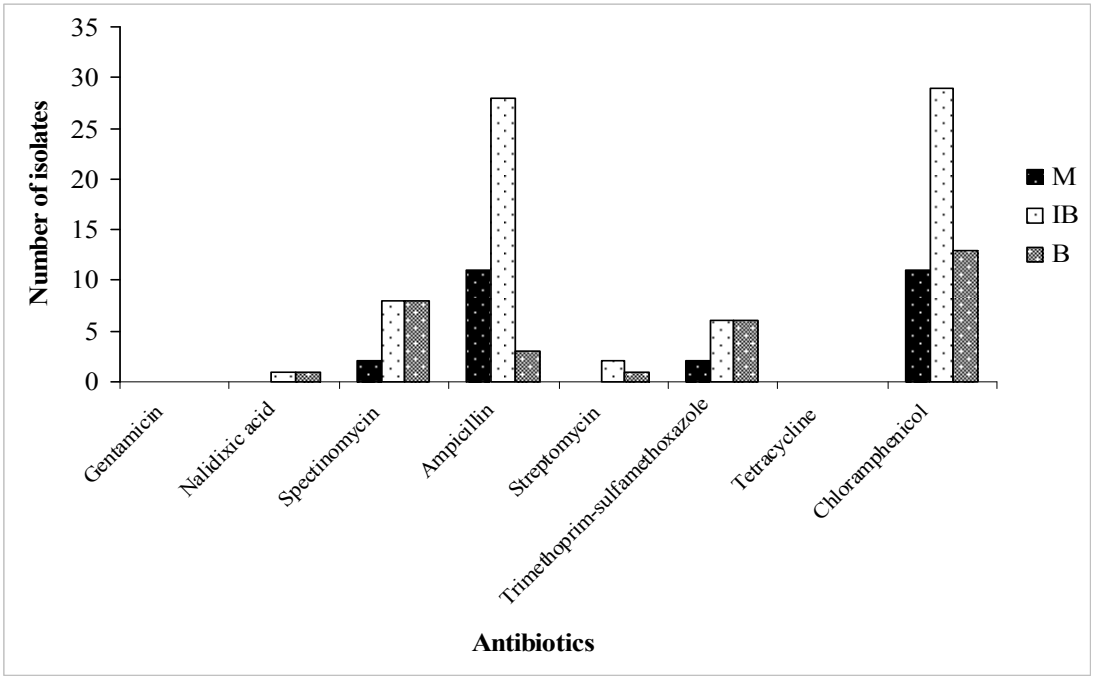

35
30
25
20
15
10
5
0
Number of isolates
M
IB
B
Gentamicin
Nalidixic acid
Spectinomycin
Ampicillin
Streptomycin
Trimethoprim-sulfamethoxazole
Tetracycline
Chloramphenicol
Antibiotics

FIGURE - 3

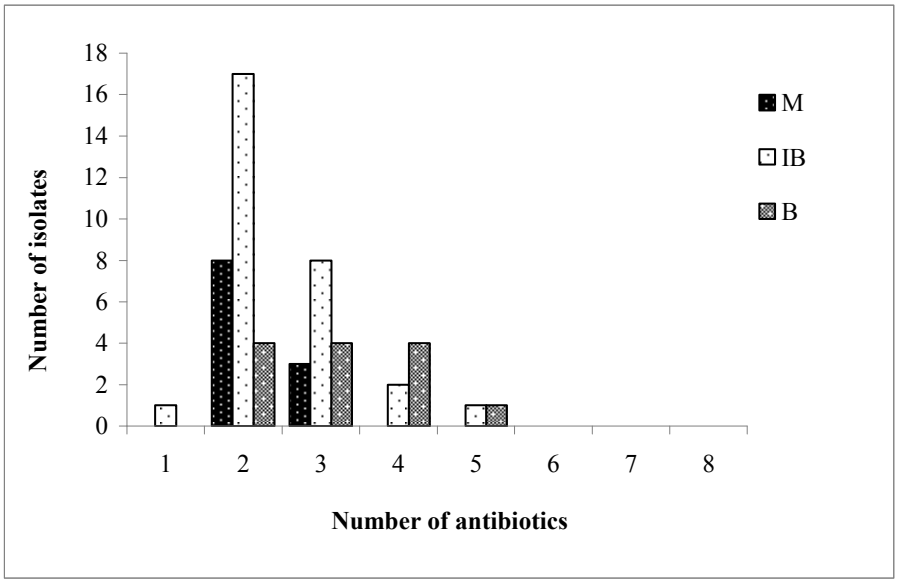

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Number of isolates
1
2
3
4
5
6
7
8
Number of antibiotics
M
IB
B

FIGURE - 4