İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOFİLMDE 16s rDNA YÖNTEMİ KULLANILARAK MİKROORGANİZMA TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emrah YELBOĞA

Anabilim Dalı : İLERİ TEKNOLOJİLER

Programı : MOLEKÜLER BİYOLOJİ – GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ

HAZİRAN 2008

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOFİLMDE 16s rDNA YÖNTEMİ KULLANILARAK MİKROORGANİZMA TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMRAH YELBOĞA
(521061206)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 5 Mayıs 2008
Tezin Savunulduğu Tarih : 10 Haziran 2008

Tez Danışmanları : **Yrd. Doç. Dr. Nevin – Gül KARAGÜLER**
Prof. Dr. Melek TÜTER

Diğer Jüri Üyeleri:
Yrd. Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK (İ.T.Ü.)
Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İ.T.Ü.)
Yrd. Doç. Dr. Sevil YÜCEL (Y. T. Ü.)

Haziran 2008

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sn. Yrd. Doç. Dr. Nevin Gül KARAGÜLER'e ve Prof. Dr. Melek TÜTER' e, yanımda olduğunu her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Emel ORDU'ya ve Burcu YAKARTAŞ'a, teşekkürü bir borç bilirim. Tez süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı Arçelik A.Ş.'den Gökhan ÖZGÜREL'e, Deniz ŞEKER'e, Zehra ÜLGER'e, Bahar AKAR'a ve gösterdikleri ilgi ve alakadan dolayı aileme teşekkür ederim.

MAYIS 2008 Emrah YELBOĞA

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR **V**
TABLO LİSTESİ **VI**
ŞEKİL LİSTESİ **VII**
ÖZET **VIII**
SUMMARY **IX**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. TEORİK BÖLÜM **2**

2.1. Biyofilm 2
2.2. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler 3
2.2.1. İnsan Sağlığına Etkileri 4
2.2.2. Cihaza ve Çalışma Mekanizmasına Etkileri 7
2.3. Biyofilm Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler 7
2.3.1. Mekanik Yöntemler 7
2.3.2. Antibiyotikler 8
2.3.3. Fungal Enzimler 8
2.3.4. Kimyasal Yöntemler 9
2.3.4.1. Klor Dioksit Uygulaması 10
2.4. Biyofilmde Mikroorganizmaların Belirlenmesi İçin Kullanılan Moleküler Teknikler 10
2.4.1. 16s rDNA klonlarının taranması ve sekanslanması 10
2.4.2. Florasan in situ Hibridizasyon (FISH) 11
2.4.3. Denature Gradient Jel Elektroforezi (DGJE) 11

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR **12**

3.2. Kullanılan Malzemeler 12
3.2.1. Bakteriyel Suşlar 12
3.2.1.1. *E. coli* TOP10 suşu 12
3.2.1.2. E. coli DH5α^{TM}-T1^{R} suşu 12
3.2.2. Klonlama Vektörü 12
3.2.2.1. pCR®2.1-TOPO® vektörü 12
3.2.3. Enzimler 13
3.2.3.1. Restriksiyon Enzimleri 13
3.2.3.2. Platinum® *Taq* DNA Polimeraz High Fidelity 13
3.2.3.3. Fast – Start *Taq* DNA Polimeraz 13
3.2.4. DNA Moleküler Ağırlık Standardları 13
3.2.5. Oligonükleotidler 13
3.2.6. Besiyerleri 14
3.2.6.1. LB (Luria-Bertani) Besiyeri 14

3.2.6.2. LB Agar Besiyeri 14
3.2.6.3. SOC Besiyeri 14
3.2.7. Stok Solüsyonlar 14
3.2.7.1. Ampisilin Stok 14
3.2.7.2. Xgal Stok 14
3.2.7.3. Gliserol Stok 14
3.2.8. Tampon Çözeltiler 15
3.2.8.1. Sodyum Asetat Tamponu 15
3.2.8.2. 5X TBE Tampon Çözeltisi 15
3.2.8.3. TE Tampon Çözeltisi 15
3.2.9. Laboratuvar Malzemeleri 15
3.3. Metod 15
3.3.1. Numune Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu 15
3.3.1.1. Örneklerin Hazırlanması 15
3.3.1.2. Genomik DNA İzolasyonu 16
3.3.2. Klonlama 18
3.3.2.1. UARR PZR 18
3.3.2.2. Jel Ekstraksiyonu 18
3.3.2.3. Klonlama ve Transformasyon 20
3.3.2.4. Tarama ve Plazmid İzolasyonu 21
3.3.3. Sekans 22
3.3.3.1. Sekans PZR 22
3.3.3.2. Filogenetik Analiz 23

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 25

4.1. Numune Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu 25
4.2. UARR PZR 26
4.3. Jel Ekstraksiyonu 29
4.4. Klonlama ve Transformasyon 30
4.4.1. Klonlama Kütüphanesinin Taranması 31
4.5. Sekans Analiz 33
4.5.1. Sekanslama 33
4.5.2. Filogenetik Analiz 34
4.5.3. Karşılaştırmalı Analiz Sonucunda Türler ile İlgili Bilgiler 35

5. VARGILAR VE ÖNERİLER 45

KAYNAKLAR 46

EKLER 50

LAB EKİPMANLARI 52

ÖZGEÇMİŞ 54

KISALTMALAR

BÇ **:** Baz Çifti
UARR : Universal Amplified Ribosomal Region
PZR **:** Polimerize Zincirleme Reaksiyon
Xgal **:** 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-D-Galactopyranoside
TBE Tamponu **:** Tris-Borate-Edta

TABLO LİSTESİ

		Sayfa no
Tablo 2.1	Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve yüzeyler.....	6
Tablo 2.2	Patojenler ve kaynakları .....…….....	6
Tablo 2.3	Fungal suş ile biyofilm uzaklaştırılması …….…….....	9
Tablo 2.4	Kimyasalların biyofilm üzerinde etkisi ……..……..…....	10
Tablo 3.1	Klonlama için universal amplifiye ribozomal bölge …….....	17
Tablo 3.2	Klonlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	19
Tablo 3.3	Big Dye Terminator v3.1 sekans PZR koşulları.....	21
Tablo 4.1	Numunelerin örnekleme oranları.....	31
Tablo 4.2	Arçelik Deterjan Çekmecesi Kutusunda belirlenen mikroorganizmalar.....	35
Tablo 4.3	Bru Deterjan Çekmecesi Kutusunda belirlenen mikroorganizmalar	35
Tablo 4.4	Arçelik Körük Ön Kapağında belirlenen mikroorganizmalar.....	36
Tablo 4.5	Bru Körük Ön Kapağında belirlenen mikroorganizmalar.....	37
Tablo 4.6	Arçelik Kazan Çıkış Hortumunda belirlenen mikroorganizmalar..	38
Tablo 4.7	Bru Kazan Çıkış Hortumu belirlenen mikroorganizmalar.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 **:** Biyofilm Oluşumu……..... 2
Şekil 3.1 **:** Çamaşır makinelerinden numunelerin alındığı bölgeler..... 15
Şekil 4.1 **:** Genomik DNA izolasyonu jel görüntüsü 25
Şekil 4.2 **:** U1F-U1R Universal primer seti ile gerçekleştirilen PZR reaksiyon sonuçları ……..... 28
Şekil 4.3 **:** Jel ekstraksiyonu sonrası izole edilen 500bç'lik PZR ürünü..... 29
Şekil 4.4 **:** Restriksiyon enzim kesimi ile klonlama kontrolü…….. 32
Şekil 4.5 **:** Plazmid izolasyon kontrolü .....…….... 32
Şekil 4.6 **:** Filogenetik ağaç 43

BİYOFİLMDE 16s rDNA KLONLAMA YÖNTEMİ KULLANILARAK MİKROORGANİZMA TAYİNİ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı çamaşır makinesinde 16s rRNA genini hedef alarak Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) yöntemi klonlama ve sekanslama ile bakteriyel çeşitliliği araştırmaktır. PZR ve 16s rDNA klonlama yöntemi çevresel numunelerden mikroorganizmaların tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. 16s ve 18s rRNA sekansları taksonomik ve filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada çamaşır makinesinin 6 farklı bölgesinden alınan numuneler üzerinden mikrobik birim tanımlanmıştır ve genomik DNA izolasyonu kültür yöntemi kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. Her örnek nemlilik, havalandırma, sürtünme faktörleriyle diğerlerinden farklı çevresel koşullara sahiptir. Çalışmada kullanılan metod 16s rRNA geninin bir parçasının PZR yöntemi ile amplifikasyonuna ve klonlama vektörüne aktarılmasına dayanmaktadır. Klonlamadan sonra elde edilen sekans neticeleri BLAST ve RDPII programları kullanılarak veritabanındaki bilinen 16s ribosomal sekansları ile karşılaştırılmıştır.

Çevresel koşullardaki farklılıklardan dolayı her örneğin kendine özgü bir mikrobiyal topluluğa sahip olduğu düşünülmekteydi. Çalışma neticesinde her örneğin diğerleri ile benzer noktalara sahip olmaları ile birlikte farklı mikrobik yoğunluğa sahip olduğu anlaşılmıştır.

16s rRNA gen sekans analizi sonucunda amplifiye edilen sekansların büyük çoğunluğunun Proteobacteria (%88) grubuna dahil olduğu, geri kalan sonuçlarda ise %10 oranında Bacteriodetes şubesine, ve %2 Eukarya krallığına ait sekanslar olduğu ortaya çıkmıştır.

MICROORGANISM IDENTIFICATION WITHIN BIOFILM BY USING 16s rDNA CLONING METHOD

SUMMARY

The purpose of this study was to examine the bacterial diversity within washing machine by polymerase chain reaction (PCR) targeting the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, followed by cloning and sequencing. Polymerase Chain Reaction and 16s Ribosomal DNA cloning have facilitated the detection of microorganisms from environmental samples. 16s and 18s ribosomal RNA sequences have been used separately for taxonomic and phylogenetic studies.

In this study, microbial community was identified from six different regions of washing machine and genomic DNA isolation was achieved without any cultivation. Each sample was collected from different parts of the sytem which differs from others by environmental factors such as humidity, aeration and shearing effects. Subsequently, PCR amplicons were purified and cloned into the TOPO TA cloning vector. Plasmids were amplified in *Escherichia coli* TOP 10 cells (Invitrogen). Identity of species were determined by comparing the result of sequences which belongs to partial 16S rRNA of the cloned insert with known ribosomal sequences using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Ribosomal Database Project (RDPII).

It was expected that each sample has its own microbial community footprint that is distinct from other samples because of environmental factors. Each sample appears to contain different microbial communities with some similarities.

16s rRNA surveys reveal that all amplified sequences belonging to bacteria kingdom and belonging almost exclusively to *Proteobacteria* (88%). Remaining analysed sequences belonging to *Bacteriodetes* (10%), and (2%) eukaryote clone.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Global ısınma kaynaklı endişeler ile var olan doğal kaynakların sınırlı olması endüstriyel ölçekte enerjinin verimli kullanılmasını gerektirmektedir. Elektrikli ev aletlerinin enerji sarfiyatını azaltmaya yönelik eğilimler beyaz eşyada da daha az enerji ve su sarfiyatı yapan cihazların üretimine yönelik bir trendin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Aynı eğilim çamaşır makinesi üreticileri üzerinde de etkili olmuş, daha düşük sıcaklıkta daha kısa sürelerde yıkamalar yapan çamaşır makineleri dizayn edilmiştir. Düşük sıcaklıkta yapılan yıkamalar ile birlikte çamaşır makinelerinin çeşitli bölgelerinde mikrobik oluşumlar gözlenmiştir. Bu oluşumlar aynı zamanda koku ve görüntü kirliliği ile birlikte hijyen sorununun ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Bu çalışmanın amacı çamaşır makinesinde görüntü ve koku kirliliğine neden olan biyofilm oluşumunu tespit ederek oluşumunda görev alan mikroorganizmaları moleküler yöntemlerle belirleyerek filogenetik analizinin gerçekleştirilmesidir. Bu sayede biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik ileride yapılması planlanan çalışmalar için bir ön çalışma gerçekleştirilmiş olacaktır.

2. TEORİK BÖLÜM

2.1. Biyofilm

Canlı ya da cansız herhangi bir yüzeye tutanan mikroorganizmalar, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik matrikste birikerek biyofilm üretmektedir. Biyofilm, herhangi bir uzantısı ya da sapı olmayan, geniş bir alandan direk yüzeye bağlanan bir yapıdır [1]. Biyofilm, başka bir deyişle, yüzeye tutunan ve mikrobik kökenli polimerik yapıya gömülü kalan mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanabilmektedir [2]. Biyofilm komünitesi bakterileri, mantarları, mayaları, protozoaları ve diğer ekstrasellüler polisakkarit salgılayan mikroorganizmalardan oluşabilmektedir [3]. Biyofilm yeterli nemin bulunduğu tüm yüzeylerde (nemli katı yüzeyler, canlı organizmaların yumuşak doku yüzeyleri gibi) oluşabilmektedir. Metalik bir yüzey üzerinde moleküler adsorpsiyon, tutunma, yapışma ve biyofilm oluşumunun şematik olarak gösterimi aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.1. Biyofilm Oluşumu. Aşamalar sırasıyla, kaplanmamış yüzey, adsorpsiyon, dönüşümlü bağlanma, dönüşümsüz bağlanma ve büyüme, biyofilm oluşumu.

Biyofilm oluşumu birçok kompleks ve kontrollü aşamalardan oluşmaktadır. Moleküler mekanizma organizmadan organizmaya değişse de gerçekleşen olayların sırası geniş ölçekte tüm mikroorganizmalar için aynıdır. Yukarıdaki modelde metal yüzey üzerinde biyofilm oluşumu, geri dönüşümlü bağlanmayı, geri dönüşümsüz bağlanmayı, birikmeyi ve olgunlaşmayı kapsayan farklı aşamaları içermektedir [4]. Bu oluşum esnasında biyofilm katmanı ile birlikte hücreler çevrelerini saran ekstrasellüler bir polimer matriks de oluşturmaktadırlar.

Biyofilm oluşumu bakterinin Brownian hareket, van der Waals etkileşimleri, gravitasyonal çekimler, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler sayesinde yüzeye

bağlanması ile başlamaktadır. Eğer bakteri ile bağlandığı yüzey (substratum) arasındaki etkileşim yeterince uzun sürerse bakterinin yüzeyi ve substratum arasında spesifik moleküler reaksiyonlar tetiklenmektedir. Bu sayede bakterinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanması mümkün hale gelir. Mikroorganizma yüzeye bağlandıktan sonra büyümeye, bölünmeye ve ekstrasellüler polimer maddeler salgılamaya başlar. Biyopolimerlerin çoğu glukoz, galaktoz, mannoz ve fruktoz gibi şekerleri içermektedir. Bu matriks sayesinde mikroorganizmalar birbirine bağlı kalır. Büyüyen biyofilm diğer organizmaların bağlanması için uygun ortam koşullarının oluşmasına ve komünite içinde biyolojik çeşitliliğin artmasına neden olur.

Biyofilmde oluşan mikrobik aktivite; ekolojik, kimyasal, fizyolojik ve genetik bir çok nedene bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Toprak örneği üzerinde yapılan çevresel, mikrobiyolojik ve biyokimyasal çalışmalar; biyofilmi çevreleyen polimerik tabakanın (*EPS*), heterojen polisakkaritlerden meydana geldiğini göstermektedir. Bu polisakkaritler mikroorganizma ile dış ortam arasında önemli bir arayüzey oluşturmakta ve biyofilmin yapısını önemli ölçüde etkilemektedir. Yapılan farklı çalışmalara göre hücre dışı polisakkaritler, sadece aynı türe ait hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamamakta, aynı zamanda farklı türlerin de yüzeye tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Aslında biyofilm yukarda sayılan nedenlerden dolayı farklı türden mikroorganizmaların bir arada bulunduğu, oluşturdukları organik katman aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurabildikleri bir ortam özelliği kazanır. Böylece tek başına bir hücrenin sebep olamayacağı metabolik ve fizyolojik faaliyetler biyofilm yapısını oluşturan birbirinden farklı mikroorganizmalar sayesinde gerçekleşmektedir. [1,4].

2.2. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Bakterilerin ürettiği hücredışı polisakkaritler çok uzun zaman önce belirlenmiş olmasına rağmen bu polisakkaritlerin bakteriyel adezyondaki rolü hakkındaki çalışmalar hala devam etmektedir. Hücredışı polisakkarit üretiminin özellikle polimerik yüzeylerde biyofilm oluşumuna etkisinin araştırılması amacıyla *Pseudomonas* türü üzerinde farklı pH koşullarında polistiren, polipropilen, polietilen ve polivinil klorür yüzeylerde denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde, pH 7'ye sabitlenmiş ortamda yüksek oranda polisakkarit üretimi gözlenmiştir. Fakat pH'ın kontrol edilmediği durumlarda daha kalın bir biyofilm tabakası oluştuğu

gözlenmiştir. Oluşan biyofilme taramalı elektron mikroskobu ve dalgaboyu yayılım spektroskopisinde yapılan incelemelere göre biyofilm morfolojisi ortamın pH'ından çok oluştuğu yüzeyden etkilenmektedir. Farklı pH'larda polivinil klorür hariç tüm yüzeylerde biyofilm oluştuğu açıkça görülmektedir [5]. Polimerik yüzeylerin aksine canlı yüzeylerde, özellikle diş eti bölgesinde, oluşan biyofilmlerin bileşimi, biyolojik aktivitesi ve patojenitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri pH dır [6].

Biyofilm oluşumunda koşullar haricinde biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların fenotipik özellikleri de büyük önem taşımaktadır. Organizmanın hareket yeteneğine sahip olması, yüzeyde hareket ederek hem biyofilm oluşturmasına hem de oluşturmuş olduğu biyofilmden uzaklaşarak yeni biyofilm oluşturmasını sağlamaktadır [7]. Körük ön kapak ve deterjan çekmecesi kapağından alınan numunelerde tanımlanan *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Agrobacterium tumefaceins* türleri ve cinsleri motilite özelliğine sahip biyofilm oluşturduğu bilinen mikroorganizmalardır..

2.2.1. İnsan Sağlığına Etkileri

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların hayatta kalmak için geliştirdikleri bir stratejidir. Biyofilm oluştuktan sonra konak savunma mekanizması tarafından kontrol altına alınması oldukça zordur. Antibiyotik tedavi, genellikle planktonik hücrelerin neden olduğu semptomların düzeltilmesinde işe yarar ve biyofilm üzerindeki etkisi antibiyotiklerin planktonik hücrelere gösterdiği etkiye nazaran çok azdır [8]. Yapılan çalışmalara göre biyofilmdeki bakteriler planktonik mikroorganizmalara nazaran antibiyotiklere karşı 20-1000 [9] kez ile 500-5000 [10] arası daha az hassasiyet göstermektedir. Antibiyotiğin biyofilme karşı azalan hassasiyetini açıklayabilen potansiyel nedenler aşağıda sıralandırılmıştır:

-Polimer matriks antibiyotiğin biyofilmin içine nüfuz etmesine engel olur. Antibiyotik biyofilmin yüzey katmanı ile reaksiyona girdiğinden biyofilm iç tabakasında bulunan mikroorganizmalar bu durumdan etkilenmez.

-Matriks antibiyotiği parçalayabilecek enzimleri içerebilir. Bu sayede biyofilmi oluşturan hücrelerden iç kısımda kalan hücreler antibiyotiğin varlığından etkilenmezler.

-Biyofilm yüzeyi üzerindeki hücrelerin fenotipik özellikleri biyofilmin iç kısmındaki hücrelerden farklı olabilir. Yüzey hücreleri metabolik olarak aktif

olup, bölünür ve çoğalırlar. Gömülü olan hücreler için düşük miktarda besin ve az miktarda oksijen bulunduğu için hücreler daha yavaş büyürler. Bu durum iç katmandaki mikroorganizmaları "uyku durumunda" tuttuğu için antibiyotiklere karşı hassasiyetlerini düşürür.

Biyofilm oluşumu ve üzerinde devam eden metabolik faaliyetler mikroorganizmaya bağlı olarak bir çok hastalığı tetiklemektedir. Özellikle protez yüzeylerinde oluşan biyofilmler insan sağlığını tehdit etmektedir. Biyofilm oluşumunun neden olduğu sağlık sorunlarına diş plağı oluşumu, akciğer, safra kesesi ve gastrointestinal enfeksiyonları örnek olarak verilebilir. Biyofilm üzerindeki mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösterdiği için tedavi sürecinin uzamasına ve dezenfeksiyon sorunlarına da neden olmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde kontaminasyona ve hızlı gıda bozulmasına sebep olduğu da bilinmektedir [1].

İnsanlarda da bakterilerin bağlanabilmesini sağlayacak yüzeyler vardır ve bütün bu yüzeyler dış ortam ile irtibat halindedir (dişler, deri, akciğer yüzeyi ve intestin). Fakat bu yüzeyler sürekli yenilendikleri için biyofilm oluşumu sınırlı bir düzeyde kalır. Yenilenme göstermeyen ve gerçek bir biyofilm oluşumu için en iyi örnek dişlerdir (dental plaklar).

Biyofilm üzerindeki mikroorganizmalar konakçı olarak insanla etkileşime girdiğinde çok ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu durum özellikle simbiyotik ilişkinin kurulamaması ya da yanlış kurulmasının sonucunda olmaktadır. Konakçı ve bakteri arasındaki olumsuz etkileşimler hastalık ve hatta ölümle sonuçlanabilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* patojenik etki göstermesi için konakçı üzerinde uzun süre geçirmesi gerekmektedir. Ancak biyofilm üzerindeki bakteriler daha hızlı etki göstererek akut enfeksiyonlara sebep olmaktadır [11].

Canlı ve cansız yüzeylerde biyofilm oluşturan mikroorganizma ve biyofilm yüzeyi tablo 2.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Yüzeyler

Organizma	Biyofilm oluşan bölge
Staphylococcus aureus	Medikal cihazlar
Staphylococcus epidermidis	Medikal cihazlar
Pseudomonas aeruginosa	Sistik fibroz hastalarının ciğerleri
Escherichia coli	Uriner sistem
Escherichia coli	Sindirim sistemi
Streptococcus spp.	Diş
Actinomyces spp.	Diş
Lactobacillus spp.	Vajina, diş

Çamaşır makinesinde biyofilmler içerisinde bulunan patojenler su yoluyla gelebileceği gibi insan cildinden de gelebilir. Bu patojenler, kaynakları ve sebep olabilecekleri hastalıklar Tablo 2.2'deki gibidir.

Tablo 2.2. Patojenler ve Kaynakları [12, 13, 14].

	Bakteriler	**Yaklaşık Bulunma Oranı**	**Sebep Oldukları Hastalıklar**
Sudan Gelenler	*Legionella* sp.*	< %30	Lejyoner hastalığı
	Mycobacterium sp.		
	Aeromonas sp.		
	*Pseudomonas aeruginosa**	< %30	Nozokomyal enfeksiyonlar
	E. coli		
	Cryptosporidium sp.		
	Helicobacter sp.		
İnsan Cildinden Gelenler	*Staphylococcus epidermidis*	% 100	
	*Staphylococcus aureus**	% 25	
	*Streptococcus pyogenes**	< % 5	Bademcik iltihabı Akciğer iltihabı/zatüree Endokardit (kalp rahatsızlığı)
	Corynebacteria	% 100	Akne
	Mycobacteria	% 25	

* Patojen potansiyeli yüksek bakteriler

Musluk suyunda bulunan bakterilerin yaklaşık %30'u *opportunistic* patojenlerdir. Bunların bir kısmı ise insana patojendir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *nontuberculous mycobacteria* ve *Acanthamoeba* türleri su sistemlerinde bulunan, insana patojen olan mikroorganizmalara örnektedir. *Streptococci*, geçici bakteremiye (bakterilerin kana geçmesinin sebep olduğu ateş) neden olurken; *Acanthamoeba* türleri gözde enfeksiyona sebep olabilmektedir [12, 13].

Su sistemlerinde bulunduğu bilinen *Legionella* türü bir çeşit akciğer iltihabı olan Lejyoner hastalığına yol açmaktadır. Lejyoner hastalığının semptomları zatüree ile benzerlik gösterdiğinden bazı durumlarda teşhis edilememekte, bu durumlarda da ölümle sonuçlanmaktadır.

Ayrıca su sistemlerinde oluşan biyofilm su kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, istenmeyen kokulara sebep olmaktadır [15].

2.2.2. Cihaza ve Çalışma Mekanizmasına Etkileri

Mikroorganizmaların yüzeye yapışıp birikmesiyle oluşan biyofilm tabakası sadece hijyenik koşulları etkilemekle kalmayıp oluştuğu yüzeyde korozyona sebep olarak ciddi hasarlara da sebep olabilmektedir. *Hafnia alvei, Desulfovibrio desulfuricans, Bacillus* ve körük ön kapaktan alınan örnek üzerinde de bulunan *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğu biyofilmin çelik, demir ve nikel yüzeylerde korozyona sebep olduğu bilinmektedir. Bu tip hasarlara sebep olan biyofilm tabakalarının kalınlığı mm mertebelerinde ifade edilmektedir. Ancak daha ince tabakaların (içme sularına maruz kalan yüzeyler için ortalama 5 μm) özellikle metalik yüzeylerin elektrokimyasal davranışını etkilediği de bilinmektedir [4, 16].

Biyofilm oluşumu ve biyofilm içerisinde devam eden metabolik faaliyetler aynı zamanda akışkan hareketini zorlaştırmakta ve yüzeyden ısı aktarımını engellemektedir [1, 4].

2.3. Biyofilm Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Organizmaların yüzeye yapışarak biyofilm oluşturması birkaç saat sürebileceği gibi sadece birkaç dakikada da mümkündür. Bu nedenle yüzeyin basit yöntemlerle sık sık temizlenerek yapışmanın önlenmesi yetersiz kalmaktadır. Basit temizleme yöntemleri yerine; daha ciddi ve sürekli uygulamalar kullanılarak biyofilm uzaklaştırılması etkili olmaktadır [7].

2.3.1. Mekanik Yöntemler

Biyofilm hücrelerinin uzaklaştırılması ve su sistemleri içerisinde tekrar süspansiyon haline getirilmesine yönelik çeşitli metotlar vardır. Su sistemlerinden alınan polikarbonat, dökme demir ve yumuşak çelik yüzeyler üzerinde yapılan çalışmalara göre *utility knife, swab* ve *stomacher* gibi mekanik yöntemlerle biyofilm

uzaklaştırılmasında en etkili yöntem *stomacher* olarak belirlenmiştir. Ancak her üç yöntemde biyofilm oluşmuş yüzeyin çıkarılarak mekanik bir sistemde temizlenmesini amaçlamaktadır. Bu nedenle çamaşır makinesi yüzeylerinde kullanımı yok denecek kadar sınırlıdır [17].

2.3.2. Antibiyotikler

Patojenik etkiye sahip olduğu bilinen biyofilm bakterilere; *Salmonella* ve alt türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus* ve alt türleri, *Streptococcus* ve alt türleri örnek olarak verilmektedir. Antibiyotiklerin farklı biyofilm bakterilerine etkisinin gözlenmesi amacıyla yapılan çalışmada biyofilm oluşturmuş ve suda serbest halde bulunun bakterilerin farklı şekilde etkilendiği görülmüştür. Su ortamındaki *E. coli'*nin enrofloksasin, gentamisin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sulfaoksine hassas olduğu, ancak biyofilm üzerindeki *E. coli*'ye sadece enrofloksasin ve gentamisinin etkili olduğu gözlenmiştir. Körük ön kapaktan alınan numunede tanımlanan *Pseudomonas* türünün alt türlerinden biri olan *P. Aeruginosa* üzerinde yapılan çalışmada biyofilme sadece enrofloksasin etkili olmuştur. Biyofilm oluşturmamış *P. Aeruginosa*'ya ise enrofkloksasin, eritromisin ve oksitetrasikslin olumlu sonuç vermiştir [18]. Bu sonuçlar biyofilm oluşumunun bakterinin çeşitli etkenlere karşı resistansını arttırdığını da desteklemektedir.

2.3.3. Fungal Enzimler

Biyofilm oluşumunda mikroorganizmanın kendi ürettiği polisakkaritler büyük rol oynamaktadır. Biyofilm oluşumunu engellemek için polisakkariti karbon kaynağı olarak kullanan 3 fungal suşu (*Aspergillus niger, Trichoderme viride* ve *penicillium spp.*) ile çalışmalar yapılmıştır. Suşlar, bakteriyel biyofilm yapısını parçalayacak enzimleri (selülaz, pektinesteraz, pektin *lyase*, alginate *lyase*) üreterek endüstriyel temizleme amacıyla kullanılmıştır. *Gum arabic* (akasya ağacından elde edilen bir tür doğal polisakkarit) ve pektin, *Pseudomononas fluorescens* biyofilmleri üzerinde fungal suşlar için yeterli karbon kaynağı oluşturmaktadır. Bu nedenle *Pseudomononas fluorescens* biyofilmlerin uzaklaştırılmasında fungal suşlar etkili olmaktadır. Farklı enzimlerin, biyofilm yapısına göre farklı noktalardan uygulanmasıyla etkinliğin arttırılması mümkün olmaktadır. Söz konusu enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları 25-40ºC arasında değişmektedir. Cam yüzey üzerinde oluşan *P. Fluorescens* biyofilmler üzerinde 30ºC'de yapılan ölçümlerde pektin

varlığında *Trichoderme viride* suşu %84±2 oranında uzaklaştırma sağlayarak en yüksek verimi sağlamıştır. En düşük uzaklaştırma ise %19±6 oranıyla ksilan varlığında *A. Niger* suşu ile elde edilmiştir [19]. Diğer suş ve karbon kaynaklarının sağladığı uzaklaştırma oranı Tablo 2.3.'de görülmektedir.

Tablo 2.3. Fungal Suş ile Biyofilm Uzaklaştırılması [19].

Kültür Ortamı		Süre	Biyofilm uzaklaştırma oranı %
Suş	Karbon kaynağı		
A. Niger	*Gum arabic*	14 gün	65±5
A. Niger	Alginat	9 gün	38±7
A. Niger	Ksilan	8 gün	19±6
A. Niger	Pektin	1 gün	60±5
T. Viride	Pektin	1 gün	84±2
Penicillium H18	Alginat	8 gün	45±5

2.3.4. Kimyasal Yöntemler

Pseudomonas aeruginosa ve *Klebsiella pneumoniae* türlerinin neden olduğu biyofilm uzaklaştırılmasında farklı kimyasalların etkinlikleri ölçülmüştür. Sürekli akışın olduğu kapalı bir sistemde farklı kimyasallar kullanıldığında, birkaç saat içerisinde; kimyasal madde, konsantrasyon ve uygulama şekline göre biyofilm % 8 ile 90 arasında azalmıştır [21]. Yapılan çalışmanın özeti Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

Tablo 2.4. Kimyasalların biyofilm üzerinde etkisi [21].

Kimyasal	**Konsantrasyon**	**Uzaklaştırma Oranı (%)**
NaCl	0.3 M	40 – 69
$CaCl_2$	0.21 M	48
MgCl	0.21 M	23
EDTA	0.01 M	26
SDS	1000 mg/L	63 - 91
Sukroz	0.47 M	8
Üre	2 M	73
NH_2Cl	5 - 100 mg/L	56 - 70
Diğer Uygulamalar		
pH değişimi 6.4'ten 2.9'a		16
pH değişimi 6.4'ten 11.2'ye		47
Lizozim	500 mg/L	40

2.3.4.1.Klor Dioksit Uygulaması

Düşük konsantrasyonlarda sürekli klorit dioksit (ClO_2) uygulaması, su sistemlerinde oluşan biyofilmin uzaklaştırılmasında ve tekrar oluşumun engellenmesinde etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde hipoklorit de biyofilm üzerinde etkili olmaktadır. Biyofilm üzerinde olabilecek *Legionella* türü biyofilmin dezenfektanlara karşı direncini arttırabilmektedir. Ancak ClO_2 uygulaması *Legionella*'ya karşı da etkin koruma sağlamaktatadır. ClO_2, pH 4-10 arasında etkili olmakta, biyofilmle diğer dezenfektanlara kıyasla daha kısa sürede temas etmesi yeterli olmaktadır. Sudaki çözünürlüğü yüksektir ve kokuya sebep olmaz. Klor ve ozon gibi diğer dezenfektan uygulamaları yan ürün olarak trihalometan (THM) oluştururken ClO_2 THM öncülerini yok etmektedir [20].

2.4. Biyofilmde Mikroorganizmaların Belirlenmesi İçin Kullanılan Moleküler Teknikler

2.4.1. 16s rDNA klonlarının taranması ve sekanslanması

Bu metod ile biofilmde bulunan mikroorganizmalardan DNA ekstraksiyonu yapılır. Genomik DNA'da bulunan 16s rDNA, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır. Elde edilen DNA, vektörlere aktarılarak klonlama işlemi gerçekleştirilir. Transformasyon işlemi ile hücre içine aktarılan sekansların hangi mikroorganizmalara ait olduğunu belirleyebilmek için sekans cihazı ile sekansına bakılır.

Teknik, biyofilmde bulunan mikroorganizmalar hakkında derinlemesine bilgi verir. Ayrıca, daha önce kültür ortamında yetiştirilemeyen mikroorganizmaların tanımlanmasına imkan verir

Sayılan avantajlarının yanısıra bu metodun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntem zaman alıcı ve emek gerektirir. DNA ekstraksiyonu esnasında sert ve katı örneklerle çalışırken problem yaratabilir. Tüm mikroorganizmaların belirlenebilmesi için taranması gereken klon sayısı büyük olmalıdır. Son olarak da kantitatif bir sonuç vermez

2.4.2. Florasan in situ Hibridizasyon (FISH)

Bu teknikte önce hücreler örnek tüplerinde fikse edilir. Fikse edilen hücreler spesifik RNA problar ile hibridize edilir. Baglanmayan probların uzaklaştırılması için yıkama adımlarından sonra farklı tipte mikroskoplarla mikroorganizmalar görüntülenir. 16s rDNA yöntemine nazaran daha kolay bir yöntemdir

Kültür ortamında yetiştirilmemiş mikroorganizmaların kantitatif olarak tayin edilmesini sağlar Biofilmde metabolik aktivitesi yüksek olan mikroorganizmaların belirlenmesini sağlar Fakat bu metod ile çalışıldığında ekosistemde bulunan türler hakkında ön bilgiye ihtiyaç vardır (Diğer yöntemlerle kombine bir şekilde kullanmak gerekebilir). Eğer mikroorganizmanın varlığı tespit edilmişse onun rRNA sekansının bilinmesi gerekir (o organizmaya uygun probların dizayn edilebilmesi için). Bazı mikroorganizmalar için spesifik prob dizayn etmek mümkün değildir Son olarak da her yeni prob için hibridizasyon koşulunun optimize edilmesi gerekir

2.4.3. Denature Gradient Jel Elektroforezi (DGJE)

Temel prensibi aynı uzunlukta fakat farklı sekanslara sahip DNA parçalarının denatüre jel ortamında farklı yürüme hızlarına sahip olmasına dayanır. Biofilmde bulunan mikroorganizmaların rDNA sekansları birbirinden farklı olacağı için metod biofilmdeki mikroorganizmaların belirlenebilmesi için kullanılabilir.

Bu metod ile mikrobik popülasyonun zamansal ve konumsal değişkenliğini belirlenebilir. Sistemdeki dominant türler hakkında kabataslak bir bilgi almak için uygun bir yöntemdir. Birden çok örneği (farklı biofilm örnekleri) incelemek için uygun bir tekniktir Fakat, klonlamada olduğu gibi DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu problemli olabilir. Kantitatif değildir ve bu yöntem ile belirlenebilecek mikroorganizma sayısı azdır. Klonlama yöntemine nazaran daha az güvenilir bir metoddur.

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.2. Kullanılan Malzemeler

3.2.1. Bakteriyel Suşlar

3.2.1.1. *E. coli* TOP10 suşu

Bu çalışmada genotipi F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (One Shot TOP 10 Electrocompetent cells, Katalog# C4040-10, Invitrogen) olan elektrokompetent hücreler 16s ve 18s ribozomal RNA (rRNA) gen dizilimlerini klonlamak için kullanılmıştır.

3.2.1.2. E. coli DH5α^{TM}-T1^{R} suşu

Bu çalışmada genotipi F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rk-, mk+) *pho*A *sup*E44 λ- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 *ton*A, (Katalog#12297-016, Invitrogen) olan elektrokompetent hücreler 16s ve 18s rRNA gen parçalarını klonlamak için kullanılmıştır.

3.2.2. Klonlama Vektörü

3.2.2.1. pCR®2.1-TOPO® vektörü

pCR®2.1-TOPO® vektörü Invitrogen firmasından satın alınmıştır. Vektör 3´-thymidine (T) ucundan klonlama için lineerize edilmiştir. Ayrıca vektöre Topoizomeraz I enzimine kovalent bağ ile bağlıdır. (Katalog #K4560-40, Invitrogen).

3.2.3. Enzimler

3.2.3.1. Restriksiyon Enzimleri

EcoR I (G↓AATTC, NEB Inc) and ***Pst* I** (CTGCA↓G, NEB Inc) restriksiyon enzimleri ve reaksiyon tampon çözeltileri New England Biolab (Sırasıyla Katalog # R0101, Katalog #R0140) firmasından satın alınmıştır.

3.2.3.2. Platinum® *Taq* DNA Polimeraz High Fidelity

Platinum® *Taq* DNA Polimeraz High Fidelity enzimi rekombinant *Taq* DNA polymerase, proofreading özelliği bulunan *Pyrococcus species* GB-D polimeraz ve Platinum® *Taq* Antibody'den oluşan bir karışımdır. Herhangi bir optimizasyona gerek kalmadan proofreading enzim ve *Taq* DNA polimeraz sayesinda 12kb uzunluğuna kadar olan kalıp DNA'lar yüksek sadakatle çoğaltılabilmektedir. *Taq* antibody *Taq* Polizmeraz için yüksek sıcaklıklarda çalışmaya başlamaya imkan verir. (Katalog # 11304-011, Invitrogen.).

3.2.3.3. Fast – Start *Taq* DNA Polimeraz

Fast start Taq DNA polimeraz enzimi (Katalog # 2 158 264, Roche) istenen ürünün amplifikasyonunu kolaylaştırmakta, primer dimer oluşumunu minimalde tutmaktadır. Çalışma süresince UARR PZR reaksiyonlarında Platinum Taq DNA Polimeraz High Fidelity ile birlikte kullanılmıştır.

3.2.4. DNA Moleküler Ağırlık Standardları

DNA moleküler ağırlık standard imleyiciler (Ek B'de verilmiştir) MBI Fermentas firmasından satın alınmıştır.

3.2.5. Oligonükleotidler

Aşağıda verilen oligonükleotidler IONTEK firması tarafından Applied Biosystems 308A DNA sentezleyici ile sentezlenmiştir.

U1F	5' CTYAAAKRAATTGRCGGRRRSSC 3'
U1R	5' CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC 3'
M13-F	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13-R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

3.2.6. Besiyerleri

3.2.6.1. LB (Luria-Bertani) Besiyeri

10 g Tripton (Acumedia), 5 g maya özütü (Acumedia), 5 g NaCl (Riedel-de-Haen) distile suda pH 7-7.5 de çözeltinin tamamı 1lt olacak şekilde hazırlanmıştır. Besiyeri 15 dakika 1.5 atm basınç altında 121°C 'de sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.2. LB Agar Besiyeri

10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 15 g bactoagar (Acumedia) karışımı pH 7-7.5 olacak şekilde 1lt'ye tamamlanarak hazırlandı ve otoklavlanmıştır.

3.2.6.3. SOC Besiyeri

20 g tripton, 5 g maya özütü, 0.5 g NaCl 950 ml deiyonize suda çözüldü,. 10 ml 250 mM KCl eklenmiştir ve pH 7 olana dek NaOH ilave edilmiştir. Çözeltinin tamamı 1lt olana dek üzerine su ilave edildi ve otoklavlanmıştır. 10mM $MgCl_2$ ve 20mM glukoz eklenerek kullanılmıştır.

3.2.7. Stok Solüsyonlar

3.2.7.1. Ampisilin Stok

100 mg / ml ampisilin sodium tuzu deionize su içinde çözülüp filtre sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan solüsyon -20°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.2.7.2. Xgal Stok

40mg/ml Xgal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-D-Galactopyranoside) dimetil formamid (DMF) içinde çözülerek hazırlandı. Solüsyon ışıktan korunacak şekilde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7.3. Gliserol Stok

80 ml gliserol (Riedel-de-Haen) ve 20 ml distile su ağırlık hacim oranı %80 olacak şekilde karıştırılmıştır. 15 dakika 1.5 atm basınç altında 121°C.'de sterilize edilmiştir.

3.2.8. Tampon Çözeltiler

3.2.8.1. Sodyum Asetat Tamponu

3 M Sodyum asetat (Riedel-de-Haen) 65 ml distile suda çözülmüştür. pH 4.6 olacak şekilde ayarlandı ve çözelti 100ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.8.2. 5X TBE Tampon Çözeltisi

54g Tris bazı 27.5gr borik asit ve 20ml 0.5M EDTA pH 8.0'da 1 litre deionize su içinde çözülerek hazırlanmış,. 1.5 atm basınç altında 121°C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edilmiştir.

3.2.8.3.TE Tampon Çözeltisi

100 µl 1M Tris-HCl, 100 µl 100mM EDTA ve 1 ml 1M NaCl 10 ml distile su içinde çözülmüştür. 15 dakika 1.5 atm basınç altında 121°C'de sterilize edilmiştir.

3.2.9. Laboratuvar Malzemeleri

Laboratuvar malzemeleri Ek B'de verilmiştir.

3.3. Metod

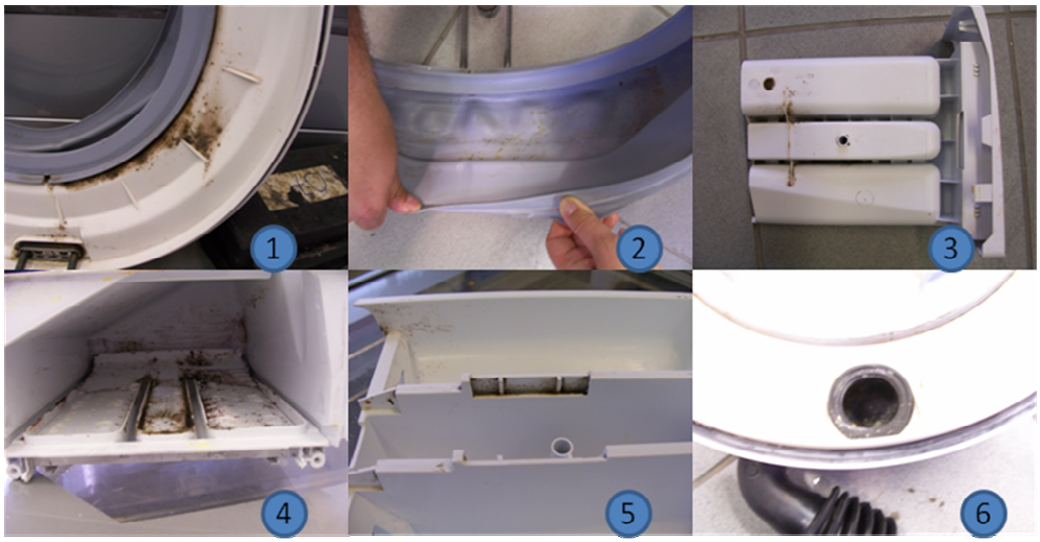
3.3.1. Numune Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma için kullanılan numuneler iki farklı çamaşır makinesinden alınmıştır. BRU Lavadora EL-1200E (5.5 kg kapasiteli, 1200 rpm, Seri No: 04-103382-09) makinesi çalışmalar için İspanya'dan getirilmiştir. Arçelik 3340A (5 kg kapasiteli, 800 rpm, Seri No: 05-130080-06) model çamaşır makinesi Türkiye'de ikamet eden bir kullanıcının şikayetleri neticesinde iade alınmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Yine aynı şekilde İspanya'dan getirilen çamaşır makinesi kullanan müşterinin koku şikayetleri ile firmaya teslim edilmiştir.

3.3.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Çalışma çamaşır makinelerinin üç farklı bölgesinden alınan numunelerle eş zamanlı olarak yürütülmüştür. Örneklerin alındığı bölgeler, makine parçalarının resimleri ve örneklerin spatula ile kazındıktan sonraki resimleri şekil 3 .1.'de verilmiştir.

Makinelerde incelenen parçalar deterjan çekmecesi kutusu, kazan çıkış hortumu ve körük ön kapak üzerinde oluşan biyofilm katmanlarını kapsamaktadır.



Şekil 3.1. Çamaşır makinelerinden numunelerin alındığı bölgeler. Numuneler steril bir spatulayla yüzey üzerinden kazınarak alınmıştır. Şekilde 3.1.'de gösterilen numuneler sırasıyla 1- Körük Ön Kapak (KÖK), 2-KÖK, 3-Deterjan Çekmecesi Kutusu (DÇK), 4-DÇK, 5-DÇK, 6-Kazan Çıkış Hortumu (KÇH).

3.3.1.2.Genomik DNA İzolasyonu

Makinelerden toplanan toplam 6 numune sıvı azot ile porselen bir kase ve havan kullanılarak homojen hale getirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu MoBio UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Katalog #12224-50) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

➢**Genomik DNA İzolasyonu Prosedürü**

1. Makine yüzeyinden örnekler spatula ile kazınarak ayrı ayrı mikrofüj tüpünde toplanmıştır.
2. Yeni bir mikrofüj tüpüne toplanan örneklerden 30mg aktarılarak deneylere bu numunelerden devam edilmiştir.
3. Örnekler 300µl MicroBead çözeltisi içinde çözülmüş ve vortekslenmiştir. Çözünen hücreler MicroBead tüpüne aktarılmıştır.
4. MikroBead tüpüne 50µl MD1 solüsyonu ilave edilmiştir.
5. Örnekler 10 dakika boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir.

6. Tüpler oda sıcaklığında 10.000g'de 30 saniye boyunca santrifüj edilerek pelet oluşturulmuştur.
7. Süpernatant 2ml'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
8. 100 µl MD2 solüsyonu tüplere aktarılmıştır. 5 saniye boyunca vortekslendi ve buzda 5 dakika bekletilmiştir.
9. Tüpler 1 dakik boyunca 10.000g'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
10. Pelleti kaldırmamaya özen göstererek tüm süpernatant 2ml'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
11. 900 µl MD3 solüsyonu süpernatantın üzerine ilave edildi ve numuneler 5 saniye vortekslenmiştir.
12. Spin filtrelerine her örnek için 700 µl konularak 10.000g'de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak kalan supernatantlar filtrelerin üzerine aktarılmış ve 10.000g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Bu aşamaya süpernatant bitene kadar devam edilmiştir.
13. 300 µl MD4 solüsyonu filtre üzerine eklenmiş ve spin filtre tüpleri 30 saniye 10.000g'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
14. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılarak 1 dakika 10.000g'de boş filtre tüpleri santrifüj edilmiştir.
15. Spin filtreleri eski toplama tüpleri uzaklaştırılarak 2ml'lik yeni toplama tüpüne aktarılmıştır.
16. Filtre üzerine 50 µl MD5 solüsyonu konularak 30 saniye 10.000g'de santrifüj edilmiştir.
17. Toplama tüpünden spin filtre çıkarılarak toplama tüpleri kullanılacak zamana kadar -20 ºC'de muhafaza edilmiştir.

Numunelerden izole edilen genomik DNA'yi görüntüleyebilmek için agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. 1%'lik (g/ağırlık) jel için 0.5gr agaroz tartılarak 50ml TBE tampon içinde çözülmüştür. Karışım 500ml'lik erlen içinde kaynayana kadar ısıtılmış ve sıcaklığı 50-60ºC'ye düşene dek soğutulmuştur. Soğuyan karışıma 3µl EtBr eklenerek agaroz jel elektroforezi için hazırlanan tabağa dökülmüştür. Her

izolasyondan 5 µl alınarak 1 µl 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Sonuçlar transillüminatörde görüntülenerek kaydedilmiştir.

3.3.2. Klonlama

Bu aşamada genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilen numunelerden NCBI databazlarında bulunan mikroorganizmaların büyük bir kısmının 16s ve 18s rRNA bölgesini çoğaltmak için uygun primerler ile PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürününü kontaminantlardan uzaklaştırmak için agaroz jelden jel ekstraksiyonu yapılmıştır. PZR ürünü aynı baz uzunluğunda fakat farklı içerikte DNA bölgeleri içerdikleri için sekans aşamasından önce plasmide klonlanarak sekansa hazır hale getirilmişlerdir.

3.3.2.1. UARR PZR

Genomik DNA izolasyonunun ardından universal primerler (U1F- U1R) kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonları için Roche Taq DNA Polymerase dNTPack kullanılmıştır. PZR reaksiyon koşulları Tablo 3.1.'te gösterilmiştir. PZR sonrası 495bç'in prokaryotlarda 495bç, ökaryotlarda 508bç'lik ürün oluşmaktadır.

Tablo 3.1. Klonlama için universal amplifiye ribozomal bölge PZR [22].

Kimyasal	**Miktar**	**PZR Koşulları**	
Kalıp DNA	30ng		
10X PZR Tamponu	5 µl	95 ºC – 1 dk	
50mM Dntp	0.5 µl	72ºC – 2 dk	
0.2µM primerler (U1F-U1R)	1µM	50ºC – 1 dk	35 tekrar
2U Taq Polimeraz	0.5µl	72ºC – 3 dk	
Su	50µl'ye kadar	72 ºC – 20dk	
Toplam	50 µl	4 ºC - ∞	
Klonlama ve sekans icin tum mikroorganizmaları kapsayan primer seti			
U1F 5'- CTYAAAKRAATTGRCGGRRRSSC-3', *E. coli* pozisyonunda 909-932			
U1R 5'- CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC-3', *E. coli* pozisyonunda 1383-1404			

3.3.2.2.Jel Ekstraksiyonu

Agaroz jel elektroforezi ile PZR ürünleri kontrol edilmiştir. Yaklaşık 500bç'lik bölgeye tekabul eden kısım ince bir şerit halinde jelden kesilerek 2ml'lik tüpe aktarılmıştır. QIAGEN - QIAquick Gel Extraction Kit (katalog # 28604,Qiagen) ile PZR ürünü jelden izole edilmiştir.

1. Agaroz jelde yaklaşık 500bç'e gelen bölge sivri uçlu temiz bir bistüri kullanılarak jelden kesilmiştir. Jel parçaları mikrofüj tüpüne aktarılarak ağırlıkları hesap edilmiştir.

2. Jel ağırlığının 3 katı ağırlığında QG solüsyonu jel parçasının bulunduğu tüpe aktarılmıştır. %2 ve konsantrasyonu daha yüksek jeller için QG solüsyonu jel ağırlığının 6 katı hacimde QG solüsyonu konulmuştur.

3. Örnekler 50°C'de 10 dakika boyunca her 2 dakikada bir vortekslenerek inkübe edilmiştir.

4. Jel QG solüsyonu içinde tamamen çözündükten sonra karışımın rengi kontrol edilmiştir. QG solüsyonunun içerdiği pH indikatörü sayesinde pH<7.5 olması durumunda karışım sarı renk vermektedir. Eğer karışımın rengi sarı değilse 10 µl 3M pH5.0 sodium asetat karışıma ilave edilmiştir.

5. Jel tamamen çözündükten sonra jel parçalarının hacminde oda sıcaklığındaki izopropanol karışımı ilave edilmiş ve karışımı içeren tüp birkaç defa ters çevrilerek karıştırılmıştır.

6.Örnekler Min-Elute kolonuna uygulanmış ve 1 dakika 13.000rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilmiştir.

7. Toplama tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.

8. 500 µl QG tampon u kolona uygulanmış ve tüpler 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

9. Toplama tüpünde biriken sıvı atılmış ve boş tüpler aynı koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir.

10. Spin kolonları 1.5ml mikrofüj tüplerine yerleştirilmiştir ve 10 µl Elution çözeltisi DNA elde etmek için kolona uygulanmıştır. 1 dakika inkübasyonun ardından tüpler 1 dakika 13.000rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

11. DNA eldesi kullanılacak süreye kadar buzdolabının derin dondurucu bölümünde muhafaza edilmiştir.

3.3.2.3. Klonlama ve Transformasyon

Klonlama ve transformasyon işlemleri esnasında TOPO TA Cloning® kit kullanılmıştır. Klonlama işleminde kullanılan kimyasallar sırasıyla Tablo 2.2.'de verildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Klonlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasallar	Miktar
$MgCl_2$	2.5 mM
NaCl	30mM
TOPO TA klonlama vektörü	1µl
UARR PZR ürünü	0.5µg
Su	6µl'ye kadar

Karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 30 dakikadan sonra transformasyon aşamasına geçilmiştir. Transformasyondan sonra kalan klonlama karışımı -20 ºC'de muhafaza edilmiştir. Transformasyon aşamaları aşağıda özetlendiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

➢ **Transformasyon Prosedürü**

- 50 µl One Shot® Electrocompetent *E. coli* TOP10 hücresi –80 ºC stoktan çıkarılarak 5 dakika buzda inkübe edilmiştir.
- 2 µl TOPO® klonlama reaksiyonu karışımı Invitrogen *E. coli* Top10 elektrokompetent hücre stoğu üzerine aktarılmıştır. Bu aşamada pipetleme yapılmamıştır.
- Solüsyon 0.1cm elektroporatör küvetlerine hava kabarcığı oluşturmadan aktarılmıştır.
- Elektroporotörün voltajı 1800'e ayarlanmış ve akım uygulanmıştır.
- Elektroporasyondan hemen sonra hücrelerin üzerine 250µl SOC besiyeri ilave edilmiştir.
- Solüsyon 15ml'lik falkona aktarılarak 1 saat 37ºC'de 300rpm'de standard karıştırıcı üzerinde çalkalanarak hücrelerin antibiyotik rezistans genlerinin ekspresyonunu gerçekleştirmeleri sağlanmıştır.
- Petri kablarına 40mg/ml Xgal içeren Dimetil formamid yayılarak mavi-beyaz seçilimin gerçekleştirilmesi mümkün kılınmıştır.

- Transformasyondan 1-10-50 µl alınarak hazırlanan LB-agar besiyerine yayma tekniği ile dağıtılmıştır. Farklı miktarlarda inkübasyon sayesinde petri kabı üzerindeki hücre yoğunluğu ayarlanabilmiştir. Petri kabları etüvde 37ºC'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.3.2.4.Tarama ve Plazmid İzolasyonu

16 saat inkübasyonun ardından agar besiyerinden beyaz koloniler seçilerek 15ml'lik falkonlarda 2ml LB, 2 µl ampisilin içeren besiyerinde 16 saat inkübe edilmiştir. Kültürler 6000g'de 30saniye santrifüj edilerek hücre peletleri oluşturulmuştur. Roche High Pure Plasmid Isolation kit (Katalog # 1 754 785) kullanılarak her kültürden ayrı ayrı plasmid izole edilmiştir. Prosedürün detayları aşağıda verilmiştir

➢ **Plazmid DNA saflaştırma**

1. Kültürler 6000g'de 30saniye santrifüj edilerek hücre peletleri oluşturulmuştur.
2. Supernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
3. Elde edilen pellet 250 µl Suspension +RNase tamponunda çözülmüştür.
4. Karışıma 250 µl Lysis tampon ilave edilmiştir. Tüpler 6 kez ters çevrilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Önceden soğutulmuş Binding solüsyonundan 350 µl karışıma ilave edilmiş ve karışım nazikçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir.
6. Örnekler 13.000g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir.
7. High Pure Filter Tüpleri toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir.
8. Santrifüj sonrası elde edilen supernatant High Pure Filter tübüne aktarılarak 13.000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Koleksiyon tübünde biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
10. 500 µl Wash Buffer I filtre tübüne eklenmiş ve 13.000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Koleksiyon tübünde biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
12. 700 µl Wash Buffer II filtre tübüne eklenmiş ve 13.000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

13. Koleksiyon tübünde biriken sıvı uzaklaştırılmıştır ve boş filtre tübü 13.000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

14. Filtre tübü 1.5ml mikrofüj tübüne aktarılmış, üzerine 100 µl Elution tampon u ilave edilmiştir.

15. Örnekler 13.000g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiş ve saflaştırılan plasmid DNA -20°C'de saklanmıştır.

TOPO TA klonlama vektörüne uygun M13 forward ve reverse primerler kullanılarak sekans PZR kurulmuştur.

3.3.3. Sekans

3.3.3.1. Sekans PZR

Sekans PZR koşulları aşağıda verilmiştir. Kullanılan M13 forward ve reverse primerler bölüm 2.1.5.'de verilmiştir. Sekans PZR aşamasından sonra örnekler sodium asetat sekans PZR saflaştırma protokolüne tabi tutulmuştur.

Tablo 3.3. Big Dye Terminator v3.1 sekans PZR koşulları.

Kimyasallar	Reaksiyon Koşulları	
2µl ABI RR-100 boya	95ºC – 5dk	
2µl ABI 5x PZR tampon	95ºC – 10sn	30 Tekrar
3.2pmole M13 primer (F veya R)	55ºC – 5 sn 72 ºC – 4 dk	
10µl final volume	4ºC – ∞	

➢ **PZR Ürünlerinin Sodyum Asetat ile Çöktürülmesi (Sekans PZR Saflaştırma)**

1. 1 µl 3M pH 4.6 soğuk sodyum asetat ve 25 µl % 95 soğuk etanol bir tüp içinde karıştırılmıştır.

2. 26 µl karışım her PZR ürününe eklenmiş ve örnekler buzda 15 dakika inkübe edilmiştir.

3. İnkübasyondan sonra örnekler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 13.000rpm'de santrifüj edilmiştir.

4. Süpernatant pipet ile çekilerek uzaklaştırılmış ve DNA peleti üzerine 250 µl soğuk %70 etanol eklenmiştir.

5. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 13.000rpm'de santrifüj edilmiştir.

6. Ethanol pipet ile çekilmiş, örnekler 95^{o}C'de 2-3 dakika inkübe edilerek tüp içinde kalan etanol tamamen ortamdan uzaklaştırılmıştır.

7. DNA peleti 20 µl formamid içinde çözülerek sekans analizine hazır hale getirilmiştir. Bu aşamada örnekler sekans cihazına yüklenene kadar aliminyüm folyo ile sarılı bir şekilde +4 ^{o}C'de tutulabilir.

8. Örnekler sekans cihazında yüklenmeden once 95°C 3 dakika ve akabinde 20^{o}C'de 5 dakika tutulmuştur.

Çalışmalar süresince sekans analizi ABI 3100 Avant (PE, Applied Biosystem, CA) otomatik sekans cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.2. Filogenetik Analiz

Hazırlanan örnekler sekans cihazına yüklenmiştir. Oluşturulan sekans kütüphanesi bir sonraki analiz için birbirleriyle karşılaştırılmak üzere MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 4.0) programına [23] aktarılarak analiz edilmiştir. Tüm sekans sonuçları %90 ve %97 üzerindeki benzerliklerine göre gruplandırılarak her grubu temsil eden sekanslar seçilerek analizler gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak her gruba ait tüm rRNA gen sekanslarını taksonomik hiyerarşiye sokabilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca RDPII internet sayfasında (http://rdp.cme.msu.edu/) yer alan "Library Compare" programı kullanılarak birbiri ile ilişkili farklı sınıflandırılmış sekansların birbirine yakınlığını analiz etmek için kullanılmıştır. Gen Bankasında bilinmeyen klonlar ile veritabanındaki sekanslar arasındaki benzerliğin %97 ile %100 aralığında olması durumunda tür düzeyinde doğru bir tanımlama yapıldığı kabul edilmiştir. %93 ile %96 aralığında benzerlik cins düzeyinde doğru kabul edilmiştir [24]. Her bir kütüphaneyi oluşturan sekans ClustalW programı kullanılarak düzenlenmiş ve birbiri ile mukayese edilmiştir (EMBL – EBI Center for Research and Services in Bioinformatics; http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html). Kromatogram dosyalarında eksiklik bulunan sekans sonuçları veya karşılaştırma esnasında belirsizliklerin olması durumunda sorgulanan sekans örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Filogenetik

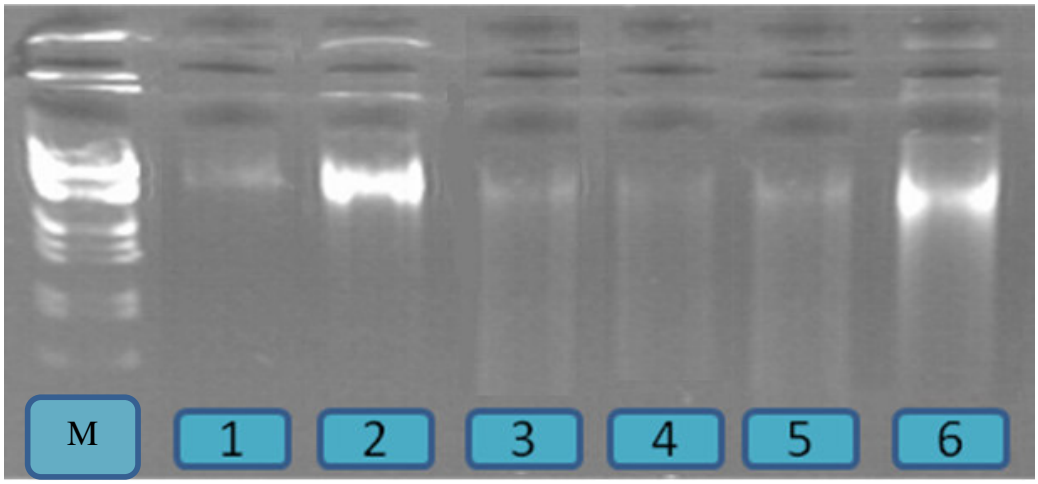
ağaçlar Neighbor-joining metod ile [25] MEGA programı kullanılarak [23] gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1.Numune Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu

Yapılan çalışmalar neticesinde mikrobik yoğunluğun bulunduğu bölgeler deterjan çekmecesi kutusu, körük ön kapak ve kazan çıkış hortumu olarak tespit edilmiş ve bu bölgelerden toplanan numuneler üzerinden çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deterjan çekmecesi kutusu bölümünde oluşan biyofilm katmanı daha ziyade görüntü kirliliğine neden olurken, körük ön kapak bölümündeki biyofilm hem görüntü kirliliği hem de kokuya sebep olmaktadır. Kazan çıkış hortumu çamaşır makinesinde suyun dolaşım yolunun en son durağı olması nedeniyle oluşan biyofilm kompozisyonunu en iyi yansıtacak bölge olarak düşünülmüş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Her iki çamaşır makinesinin Kazan Çıkış Hortumu, Deterjan Çekmecesi Kutusu ve Körük Ön Kapak bölgelerinden toplanan numuneler kompakt ve sert bir yapıda oldukları için genomik DNA izolasyonuna hazır hale getirmek maksadıyla sıvı nitrojen içinde dövülmüştür. Genomik DNA izolasyonu örneklerin içerebileceği mikrobik oluşuma uygun olarak tüm mikroorganizmalardan (ökaryot ve prokaryot) genomik DNA izolasyonu mekanik bir parçalama metodu içeren bir kit ile gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hücre çeperi bakterilere nazaran çok daha kalın olan ökaryotların genomik DNA'sını elde etmek mümkün olmuştur. Genomik DNA izolasyonu sonrası örnekler jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntü şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Genomik DNA izolasyonu jel görüntüsü.

Şekilde görülen bantlar sırasıyla M- marker 1-Arcelik Körük Ön Kapak, 2-Bru-KörükÖn Kapak, 3-Arçelik-Deterjan Çekmecesi Kutusu, 4-Bru-Deterjan Çekmecesi Kutusu, 5-Arçelik-Kazan Çıkış Hortumu ve 6-Bru-Kazan Çıkış Hortumu'na aittir.

4.2.UARR PZR

PZR reaksiyonu numunelerden izole edilen genomik DNA'nın 16s ve 18s rRNA genlerinde *E. coli*'de 909-1404bç bölgelerine tekabül eden bölgenin amplifikasyonunu sağlamıştır. PZR reaksiyonu mikrobik komünitelerin filogenetik analizinin ve diğer birçok moleküler ekolojik yaklışımın ilk aşamasını oluşturmaktadır.

PZR, mikrobik ekolojide kültür ortamında yetiştirilemeyen mikroorganizmaların deteksiyonunu sağlayarak büyük bir çığır açmıştır ve bu yöntem sayesinde mikrobik çevresel değişkenler daha yüksek bir tutarlılıkla belirlenebilmiştir. Kullanılan teknik üniversal primerlerin izole edilen numunelerde bulunan mikroorganizmaların rRNA geninin bir parçasını amplifiye edebileceği kabulüne dayanır. Fakat yeni bulgular halihazırdaki üniversal primerlerin gerçek mikrobik değişkenleri kapsamadığını göstermektedir [38]. Bu durum databaza eklenen yeni 16s ve 18s rRNA genlerinin kullanılan primerlere tam olarak uymamasından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden primer seçimi çalışmaları sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Tez süresince kullanılan primerler SSU (small subunit) rRNA geninde V6, V7, V8 değişken bölgelerini kapsamaktadır [22]. Ayrıca primerler prokaryotlarda 495bç, ökaryotlarda

508bç uzunluğunda ürünler verdiğinden her iki bandı PZR sonrası ayrı ayrı görme şansı vermektedir.

Mikrobik komüniteye ait total nükleik asitten PZR reaksiyonu gerçekleştirilirken Tm derecesi primerlerin Tm değerlerinden 5ºC daha düşük tutulmuştur. Yüksek sıcaklıklar daha yüksek spesifisitenin oluşmasına neden olduğu için PZR reaksiyonu sonucunda kısıtlı miktarda genomik DNA'dan amplifikasyon gerçekleşmiş olur.

PZR reaksiyonu esnasında mutasyonlar, delesyonlar neticesinde çeşitli yan ürünler oluşabileceği gibi kimerik PZR ürünleri de oluşabilir. DNA polimeraz %100 doğruluk oranı ile çalışmadığı için yeni sentezlenen DNA molekülünde nokta mutasyonlar oluşturabilir. Nokta mutasyonların sıklığı kullanılan DNA polimeraza bağlıdır. *Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNA polimeraz gibi 3´-5´ tekrar okuma (proofreading) fonksiyonuna sahip enzimlerin hata yapma şansı, *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz gibi tekrar okuma egzonükleaz özelliği bulunmayan enzimlere nazaran daha azdır. Polimeraz kaynaklı hataların yüzdesi PZR reaksiyonunun tekrar sayısı ve çoğaltılan bölgenin uzunluğu arttıkça artar. Ayrıca rRNA'nın oluşturduğu kararlı sekonder yapılar PZR süresinde sentezlenen DNA'da delesyonların oluşmasına ve daha küçük boyutlarda DNA parçalarının oluşmasına neden olur.

Çalışma süresince kullanılan polimeraz enzimleri Taq ve Platinum Taq DNA polimerazdır (sırasıyla 10:1 oranında kullanılmıştır). Pfu DNA polimeraz gibi tekrar okuma özelliğine sahip bir enzim yerine Taq enziminin kullanılmasının nedeni Taq DNA polimerazın oluşturduğu ürünün 3´ ucuna sentezlediği ürünün nükleotid dizilimine bağlı olmaksızın A nükleotidi eklemesinden kaynaklanmaktadır. 3´ ucundaki A nükleotidleri daha sonra yapılacak olan klonlama işleminde vektörde 3´ ucunda bulunan T nükleotidleri ile bağlanarak ligasyonun gerçekleşmesini mümkün kılmaktadır. Tekrar okuma özelliği bulunan DNA polimerazlar bu özelliğe sahip olmadığından ama aynı zamanda kalıp DNA'ya daha yüksek sadakatla yeni DNA molekülleri sentezlediklerinden reaksiyonda polimeraz enzimi karışım halinde hazırlanmıştır. Bu sayede ürünlerin hem 3´ ucunda A nükleotidlerinin bulunması mümkün kılınmış hem de kalıp DNA molekülüne daha sadık kalınmıştır.

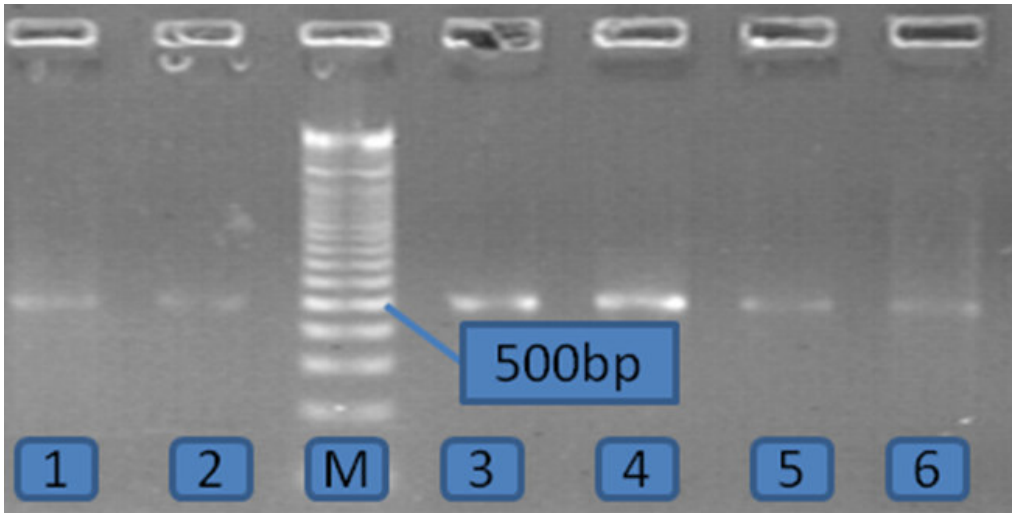
PZR reaksiyonunda karşılaşılacak bir diğer problem ise kimerik PZR ürünlerinin oluşmasıdır [26]. Kimerik ürünler amplifikasyon esnasında rRNA genlerinin sentezinin tam gerçekleşmemesi durumunda gerçekleşir. Eğer tamamlanmamış parça

homolog bir gen fragmanına bağlanırsa heterodupleks bir molekül oluşturur ve sonuçta iki farklı kalıptan oluşan yeni bir ürün ortaya çıkar.

Filogenetik analiz aşamasında elde edilen sekans neticelerinin herhangi bir kimerik oluşum içerip içermediğini anlamak maksadıyla veri tabanında karşılaştırmalı analizi gerçekleştirilerek bilinen herhangi bir rRNA genine benzerlik göstermeyen sekanslar CHIMERA_CHECK adlı programla (http://rdp.cme.msu.edu) kontrol edilmiştir. Program sayesinde kimerik oluşumlar tespit edilmiş ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Çevresel numunelerden izole edilen genomik DNA ve bu genomik DNA üzerinden gerçekleştirilen PZR reaksiyonu mikrobik komünitenin kompozisyonunu yansıtır. PZR reaksiyonu ancak kalıp DNA'ların tamamının eşit derecede primerle hibridize olabilmesi durumunda kantitatif bir değer taşır. Fakat pratikte kalıp DNA'ların içerik farklılıklarından ve PZR reaksiyon koşullarından kaynaklanan sebeplerle PZR reaksiyonu belli eğilimler taşır. rRNA kopya sayısı, rRNA operon heterojenitesi ve G + C içerik farklılıkları, amplifiye edilen sekansın dışında amplifikasyonu inhibe eden sekansların bulunması, kalıp DNA konsantrasyonu gibi kalıba bağlı nedenler farklı kalıplardan farklı oranda amplifikasyonun gerçekleşmesine neden olur. Bu durum da farklı kalıp DNA'ların farklı oranlarda amplifikasyonu gerçekleşir. Deneyler neticesinde elde edilen mikrobik komposizyonun kantitatif bir değer taşımamasının nedeni PZR reaksiyonundaki eğilimlerden kaynaklanmaktadır.

Aşağıdaki şekilde her numuneye ait genomik DNA'dan gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının sonuçları görülmektedir. Bantların yoğunluğundan görülebileceği gibi her numunenin farklı oranlarda amplifiye olması yukarıda bahsedilen sorunlardan kaynaklanabileceği gibi kalıp DNA konsantrasyonu farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Yine aynı şekilde bazı numunelerde (örneğin 4. ve 6. numunelerde) kontaminant ürün oluşumları gözlenmiştir.

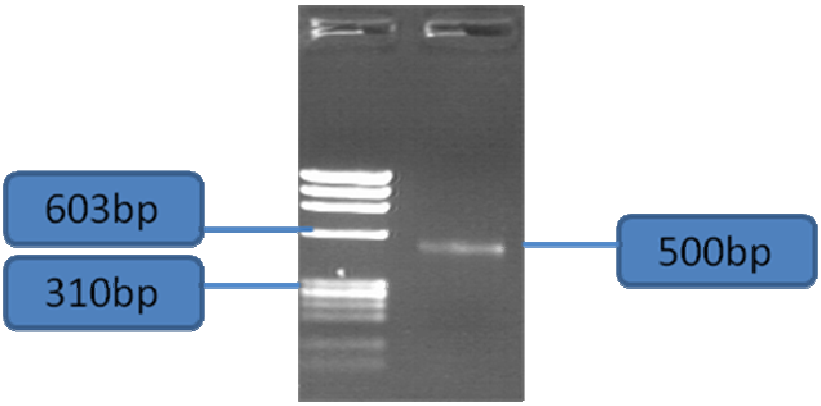


Şekil 4.2. U1F-U1R Universal primer seti ile gerçekleştirilen PZR reaksiyon sonuçları.

Şekilde görülen bantlar sırasıyla 1-Arçelik –Körük Ön Kapak, 2-Bru-Körük Ön Kapak, M-Marker, 3-Arçelik-Deterjan Çekmecesi Kutusu, 4- Bru-Deterjan Çekmecesi Kutusu, 5-Arçelik-Kazan Çıkış Hortumu, 6-Bru-Kazan Çıkış Hortumu'na aittir.

4.3.Jel Ekstraksiyonu

PZR sonrası elde edilen üründen kontaminantları uzaklaştırmak maksadı ile jel ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşama neticesinde şekilde görüldüğü gibi net ve tek bir bant gözlemlenmiştir. PZR sonrası jel ekstraksiyonu gerçekleştirilmesinin en önemli nedeni kontaminant ürünlerin klonlama aşamasına gelmeden uzaklaştırmaktır. Uzaklaştırılmaması durumunda kontaminant DNA'ların da vektöre girme ihtimalinin bulunması sekans analizinin verimsiz gerçekleşmesine neden olacaktır. Ayrıca PZR reaksiyonları ile birlikte gelen primerler enzim ve nükleotid kalıntıları da jel ekstraksiyonu ile solüsyondan uzaklaştırılmıştır.



Şekil 4.3. Jel ekstraksiyonu sonrası izole edilen 500bç'lik PZR ürünü.

4.4.Klonlama ve Transformasyon

Mikrobik komünitenin kültür ortamından bağımsız filogenetik analizinde rRNA geninin amplifikasyonundan sonraki aşama PZR ürünlerinin klonlama vektörüne aktarılmasıdır. Çalışmalar için kullanılan vektörde (TOPO TA Klonlama Vektörü) bulunan ampisilin antibiyotik rezistans geni rekombinant plasmidin konakçı *E. coli* hücresinde kalmasını sağlar. İkinci bir seçilim ise konakçı hücrelerde bulunan plazmidin PZR ürününü içerip içermemesine göre yapılmıştır. Bu seçilim genel olarak vektör üzerinde bulunan β-galaktozidazın (*lacZ*) α subunitesinin PZR ürünün araya girmesiyle inaktivasyonuna dayanır (*E. coli* hücresi defektif bir lacZ kopyasına sahiptir). Antibiyotiğin yanısıra katı besiyeri aynı zamanda *lacZ* geni indükleyicisi olan kromojenik substrat X-gal (5-Bromo-4 Chloro-3-Indolyl-B-D-Galactopyranoside) içermektedir. Eğer hücreler PZR ürünü içermeyen boş vektörlerle transforme olmuşlarsa hücrelerin rengi β-galaktozidaz aktivitesi nedeniyle maviye dönüşecektir. Fakat gen PZR ürünü ile kesintiye uğruyorsa hücreler fonksiyonel β-galaktozidaz üretemeyecekleri için koloniler beyaz renkte kalacaktır.

Biyofilm örneğinde olduğu gibi Heterojenik rRNA sekanslarını klonlamak her bir sekansı klon kütüphanesinde diğer sekanslardan ayırmamızı sağlar. Klonlama aşaması sayesinde aynı baz çifti uzunluğunda fakat farklı baz dizilimine sahip PZR ürünleri sekans analizinde ayrı ayrı okunabilmiştir.

PZR reaksiyonunda olduğu gibi klonlama aşamasında da bazı eğilimler bulunduğu için orjinal mikrobik oluşumun birebir sunulması mümkün değildir.

4.4.1. Klonlama Kütüphanesinin Taranması

Plazmid izolasyonu ve akabinde gerçekleştirilen restriksiyon analizi ile klonlanmaya çalışılan ürünün vertörde bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir. Klonlanan doğru büyüklükteki rRNA gen parçaları üzerinden sekans analizi gerçekleştirilebilir. Fakat kompleks komünitelerin filogenetik analizi ciddi çalışma süreleri gerektiren, maliyetli bir yöntemdir. Özellikle sekans analizinin maliyetinin yüksek olmasından dolayı sekans analizi gerçekleştirilen numune sayısı minimumda tutulmaya çalışılmıştır. Klon kütüphanelerinde gerçek tür kompozisyonunu yakalayabilmek için gerekli sayıda klonu taramış olmak önemli bir sorun teşkil etmektedir. Oluşturulan kütüphanelerden yeterli miktarda örnek alınıp alınmadığını basit bir yöntemle hesap etmek mümkündür:

$$\ddot{O}_x = 1 - (n_x / N) \qquad \textbf{(4.1.)}$$

Bu denklemde n_x oluşturulan bir kütüphanede sadece bir kere karşılaşılan klon tipi sayısıdır. N ise analiz edilen klon sayısına denk gelmektedir. Eğer sekans analizi neticesinde kütüphanede diğerlerinden farklı sekans sayısı oranı toplam sekans analiz sayısına yakın olması durumunda toplam örnekleme sayısı ($\ddot{O}_x$) küçük olacaktır.

Sekans analizi gerçekleştirilen toplam 6 örnek için $\ddot{O}_x$ değerleri tablo 4.1.'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

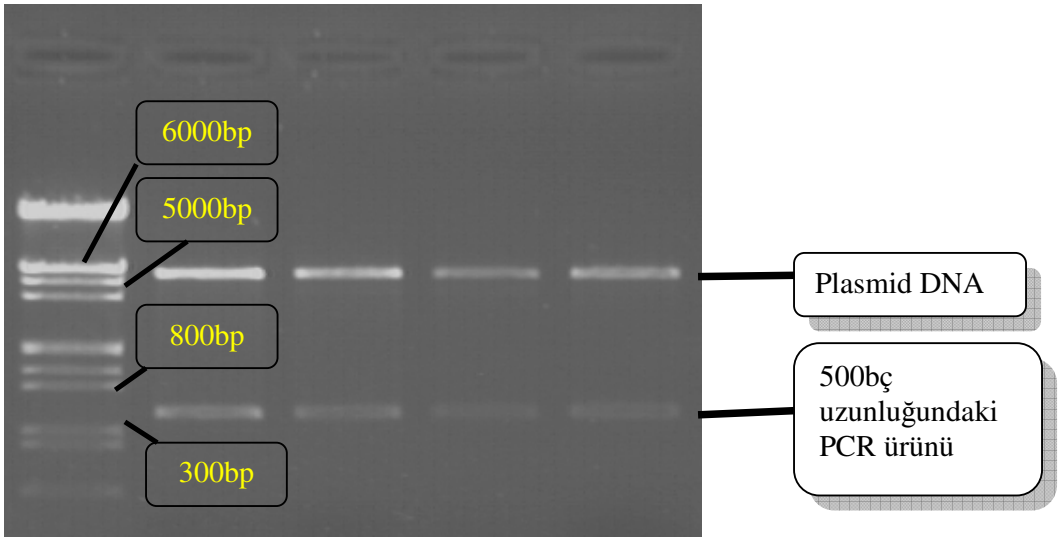
Tablo 4.1. Numunelerin Örnekleme Oranları.

Örnek	n_x	N	$\ddot{O}_x$
Arçelik – Deterjan Çekmecesi Kutusu	11	48	0.77
Arçelik – Körük Ön Kapak	4	12	0.67
Arçelik – Kazan Çıkış Hortumu	6	24	0.75
Bru – Deterjan Çekmecesi Kutusu	7	22	0.68
Bru – Körük Ön Kapak	6	20	0.70
Bru – Kazan Çıkış Hortumu	11	32	0.66

Sekans analizi gerçekleştirilen numunelerde incelenen klon sayısı ve sadece bir kere karşılaşılan klon tipleri tabloda ilgili örneğin isminin yanında verilmiştir. Örnekleme sayısı ile kütüphane içinde tür zenginliği en çok Arçelik – Deterjan Çekmecesi Kutusu Örneği ile Kazan Çıkış Hortumunda görülmüştür. Öre-neklerin kültür kompozisyonunu örnekleme oranları ($\ddot{O}_x$) birbirine yakın çıkmıştır.

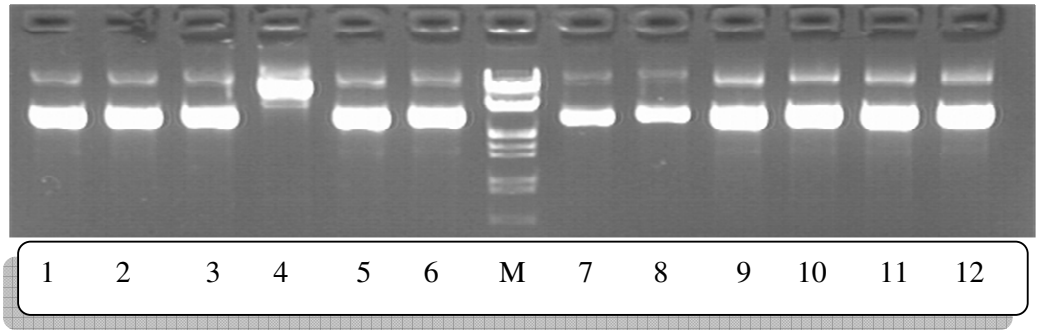
Hesaplamalarda literatürden edinilen bilgi baz alınarak [37] >%97 üzerinde benzerlik gösteren sekanslar birbirinin eşdeğeri olarak kabul edilmiş ve hesaplamaya eşlenik sekanslardan sadece biri dahil edilmiştir.

Klonlama aşamasından sonra sekans analizi gerçekleştirilmeden önce plasmidlerde istenilen uzunlukta PZR ürünü bulunup bulunmadığı restriksiyon enzim analizi ile test edilmiştir.



Şekil 4.4. Restriksiyon enzim kesimi ile klonlama kontrolü.

Şekil 4.4'de ADÇK numunelerine ait klon kütüphanesinden 4 farklı klonun plazmidi izole edilerek PZR ürününün varlığı kontrol edilmiştir. Bu aşama her sekans analizi öncesi tekrar edilerek kütüphanenin güvenilirliği test edilmiştir.



Şekil 4.5. Plazmid izolasyon kontrolü.

Klonlama aşamasından sonra vektöre aktarılan plasmidler katı besiyerine aktarılarak büyütülmüş daha sonra beyaz koloniler sıvı besiyerine aktarılarak plasmid izole edilmiştir. Şekil 4.5.'de jelde izolasyonu kontrol etmek maksadıyla 4-Körük Ön Kapak kütüphanesinden taranan kolonilere ait plasmidler görülmektedir.

4.5.Sekans Analiz

4.5.1. Sekanslama

16s rRNA gen klon kütüphanesi oluşturmanın ana amacı örnekte bulunan organizmaların filogenetik ilişkilerini karşılaştırmalı sekans analizi ile ortaya çıkarmaktır. Sekans PZR normal bir PZR reaksiyonuna benzemekle birlikte iki ana

farklılık içermektedir. Sekans PZR'de sadece bir oligonükleotid primer kullanılır. Bu yüzden PZR ürünü normal bir PZR'de olduğu gibi eksponansiyel olarak değil lineer bir şekilde artar. İkinci olarak PZR reaksiyon koşullarında bulunan dNTP haricinde ortamda nükleotid analogları ddNTP (2´,3´-dideoxynucleoside triphosphate) de bulunmaktadır. Reaksiyon sırasında yeni sentezlenen DNA parçasına ddNTP eklenmesi durumunda reaksiyon sonlanmakta ve DNA diziliminin uzaması sona ermektedir. Bu durum DNA polimerazın zinciri uzatabilmek için ddNTP'de bulunmayan serbest 3´ hidroksil grubuna ihtiyaç duymasından kaynaklanmaktadır. Yeni sentezlenen zincire ddNTP'lerin eklenmesi rastgele gerçekleştiğinden reaksiyon sonunda farklı uzunluklara sahip DNA parçaları oluşur. Florasan işaretli 4 ddNTP sayesinde tek bir tüpte gerçekleştirilen reaksiyon kapiler elektroforez sisteminden geçerek sistem tarafından algılanır. Kapiler içinden DNA parçalarının geçme hızı uzunluklarına bağlı olması ve her florasan boyanın ışıma dalga boyunun diğerlerinden farklı olması nedeniyle kapillerden geçen tüm dizilm hassasiyetle okunabilmektedir.

4.5.2. Filogenetik Analiz

Elde edilen sekans neticelerinin analizi gerçekleştirilmeden önce okuma hatası ihtimali göz önünde bulundurularak kontrol edilir. Sekans neticeleri http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ web adresinden BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı ve ribozomal database project (RDPII, http://rdp.cme.msu.edu/) veri tabanı [27] kullanılarak veritabanındaki 16S ve 18S ribozomal DNA sekansları ile karşılaştırılmıştır. Sekans sonrası elde edilen kromatogram dosyalarından yola çıkılarak vektöre klonlanan bölgenin sekansı tespit edilmiştir. Sorgulanan sekansların hangi türe ait olduğu benzerlik yüzdelerine bakılarak tespit edilmiştir.

Veritabanındaki ribozomal DNA dizileri ile sorgulanan dizilim arasında %97 ve altında benzerliğin çıkması durumunda sorgulanan örnek ile benzerliğin bulunduğu dizilimin farklı türlere ait DNA dizileri olduğu kabul edilir [24]. Bu çalışmadan elde edilen 23 farklı sekansın veritabanındaki sekanslara benzerlik oranı %97'den az çıkmıştır. Fakat sekans bezerlik oranı %97 ve üzerinde çıkması durumunda birçok türün %97'den fazla benzerlik taşımasından dolayı kararın hassasiyetle verilmesi gerekmektedir. Hugenholtz vd. göre [28] dizi analizi gerçekleştirilen dizilimin 500 baz uzunluğunda olması ve databazda karşılaştırılan sekanstan daha uzun bir dizilime

sahip başka bir dizilme benzemesi (karşılaştırılan sekanslarda %90'dan fazla benzerlik bulunuyorsa) durumunda elde edilen sonuç güvenilirdir. Fakat analizi gerçekleştirilen sekansın bilinen herhangi bir sekansa %85'in altında benzemesi durumunda 500 nükleotidden daha az uzunlukta sekansların filogenetik yerleştirmelerini mümkün kılamamaktadır. Ayrıca rRNA geninde değişkenlik gösteren dizilerin bütün gene dengeli bir şekilde yayılmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. 5´ ucu 3´ ucuna nazaran daha çok yüksek varyasyonlu bölge içermesinden dolayı daha fazla değişkenlik göstermektedir .

Filogenetik analizin ilk aşaması elde edilen sekansların dikkatli bir şekilde karşılaştırmasının gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu aşama filogenetik analizde kritik bir aşamadır. Filogenetik analizde dikkat edilmesi gereken husus, organizmalar arası homolog karakterlerin karşılaştırılmasıdır. Bu nedenle çalışmada sadece homolog sekanslar birbiriyle karşılaştırılmıştır.

4.5.3. Karşılaştırmalı Analiz Sonucunda Türler ile İlgili Bilgiler

Aşağıda farklı türlerin 16s rDNA bölgesine ait (E. coli pozisyonunda 909 – 1404 arasındaki bölge) DNA dizileri, dosya isimleri numaraları ve veritabanından elde edilen neticeleri ile birlikte verilmiştir. Numuneler hem forward hem reverse primer ile iki kez sekansa verilerek elde edilen neticelerin güvenilirliği kontrol edilmiştir. Tablolarda kromatogram dosyalarının internet veri tabanlarında karşılaştırmalı olarak analizi sonucunda mevcut sekans sonuçlarına en benzer türlerin isimleri, sekans benzerlik oranları ve mikroorganizmanın biyofilm yapısı içinde ne kadar çok sıklıkla karşılaşıldığı ile ilgili bilgiler bulunmaktadır.

Tablo 4.2. Arçelik Deterjan Çekmecesi Kutusunda belirlenen mikroorganizmalar. Elde edilen sonuçlar içinde ökaryotik mikroorganizma belirlenmiştir.

Arçelik Deterjan Çekmecesi Kutusu Belirlenen Mikroorganizmalar	**Sekans Benzerlik**	**Şube / Sınıf**	**Sıklık**
Rhizobium sp. R-31549	99%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%20
Pseudomonas sp. BSs20166	98% 98%	Proteobacteria / Gammaprotebacteria	%15
Sphingobium yanoikuyae strain BF-18	99%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%10
Comamonadaceae bacterium MWH55	98%	Proteobacteria / Betaproteobacteria	%10
Xanthobacter flavus strain ENV481	98%	Alphaproteobacteria	%15
Hartmannella sp. T5-4	98%	Eukaryota / Lobosea	%5
Bosea sp. L7506	99%	Alphaproteobacteria	%5
Dokdonella koreensis strain NML 01-0233	97%	Gammaproteobacteria	%5
Methylobacterium sp. OSB1	98%	Alphaproteobacteria	%5

➢ ***Rhizobium*** **türleri**

Rhizobium, çubuk şekilli, spor oluşturmayan, gram negatif, motilitesi olan bakteri türüdür. Optimum büyüme sıcaklığı 25-30ºC olup, bazı türler 40ºC'nin üzerine çıkabilmektedir. Koloniler beyaz ya da bej renkli, dairesel, konveks şekillidir. Selülöz ve nişasta kullanmaz. Azot kaynağı olarak amonyum tuzları, nitrat, nitrit ve aminoasit kullanır. Bazı türlerin suşları basit mineral tuzları varlığında büyüme gösterirken, bazı türlerin suşları biyotin, panothenate ya da nisotinik asit gibi büyüme faktörlerine ihtaç duymaktadır. Bütün *Rhizobium* türleri bitkilerde hipertrofizme sebep olmaktadır. Genellikle azot sabitleyici simbiyotik ya da olmayan kök nodülü, bazı türlerde ise düzensiz onkojenik büyümelere neden olur [29].

Tablo 4.3. Bru Deterjan Çekmecesi Kutusunda belirlenen mikroorganizmalar.

Bru Deterjan Çekmecesi Kutusu Belirlenen Mikroorganizmalar	**Sekans Benzerlik**	**Şube / Sınıf**	**Sıklık**
Paenibacillus borealis strain FSL_H8-126	97%	Firmicutes / Bacilli	9%
Crabtreella sp. MI18.1	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9%
Stenotrophomonas maltophilia	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	27
Agrobacterium sp. LW-3	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9
Agrobacterium tumefaciens strain H2	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9
Pedobacter sp. H37	97%	Bacteroidetes / Chlorobi group	9%
Brevundimonas sp. R2A20-7	96%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9%
Brevundimonas sp. 7-4 partial	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9%
Sinorhizobium sp. R-24605	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	9%

➢***Agrobacterium*** **türleri**

Agrobacterium cinsi, bitkilere patojenik olan pek çok tür içermektedir. Bu türler Rhizobium ile benzerlik göstermektedir. En çok incelenen suş tumefaciens suşudur.

Agrobacterium tumefaciens, çubuk şekilli gram negatif bakteri türüdür. Hücre yerleşimi tek ya da çiftli olabilir, motilitesi vardır. Aerobik koşullarda, bir çok farklı ortamda üreyebilmekte, 25-28ºC'de yaşayabilmektedir. Bitkilere patojen olduğu bilinmektedir. Uygun koşullarda bitki dokuları da dahil olmak üzere bir çok yüzeyde biyofilm oluşturmaktadır [31].

➢***Pedobacter*** **sp.**

Aerobik gram negatif çubuk hücrelerdir. Bazı türlerde kayma hareketi gözlenmektedir. Triptikaz soy agarı (TSA) ve besleyici agar üzerinde kirli sarı – kirli beyaz arasında renk vermektedir. Türün bütün üyeleri (P. Piscium hariç) *inducible* enzimler tarafından bozunan heparin üzerinde büyümektedir. Türler 5-30ºC arasında yaşayabilmekte, ancak 37ºC'ye kadar çıkabilen türler de bulunmaktadır. Habitat olarak toprak, aktif çamur ya da balık kullanabilir [35].

Tablo 4.4. Arçelik Körük Ön Kapağında belirlenen mikroorganizmalar. Bu numuneden elde edilen sonuçlarda belirlenen tüm mikroorganizmaların proteobacteria şubesine ait olduğu tespit edilmiştir.

Arçelik Körük Ön Kapağı Belirlenen Mikroorganizmalar	**Sekans Benzerlik**	**Şube / Sınıf**	**Sıklık**
Pseudomonas sp. DK3	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%43
Pseudomonas sp. G1311	98%		
Pseudomonas sp. LW4	99%		
Agrobacterium sp. LW-3	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%14
Rhizobium sp. IRBG 74	99%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%14
Stenotrophomonas sp. T2	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%14
Xanthomonas group bacterium LA37	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%14

➢ ***Pseudomonas*** **Türleri**

Pseudomonas grubuna bağlı, genellikle toprak ve suda yaşayan ayrıca bitki ve hayvanların yüzeylerinde de bulunabilen bir bakteri türüdür. Biyofilm olarak ya da planktonik formda bulunabilir. Tek hücrenin sonraki formunda polar kamçıları sayesinde yüksek motilite göstermektedir. Metabolik versatilitesi sayesinde organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan çok farklı çevre koşullarında büyüyebilmektedir. Genellikle bitkilere patojen oldukları halde insanlara patojen olan pek çok suşu da vardır.

➢ ***Xanthomonas*** **türleri**

Xanthomonas türleri, çubuk şekilli gram negatif canlılardır. *Xanthmonadin* isimli suda çözünmeyen sarı pigmentler ve *xanthna gum* isimli hücredışı heteropolisakkarit üretirler. Xanthna gumları, yüksek spesifik viskozite ve ekstrem çevre koşullarına stabiliteleri nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda sıkça kullanılırlar [30]. Narenciye, pirinç, fasülte, üzüm ve pamuk ürünlerini tahrip eden pitopatojenlerdir.

Tablo 4.5. Bru Körük Ön Kapağında belirlenen mikroorganizmalar.

Bru - Körük Ön Kapağı Belirlenen Mikroorganizmalar	Sekans Benzerlik	Şube / Sınıf	Sıklık
Sphingobacterium spiritivorum	98%	Bacteroidetes/Chlorobi group / Bacteroidetes	%20
Sphingobacterium sp. cxh-2	98%	Bacteroidetes/Chlorobi group / Bacteroidetes	
Pseudomonas mendocina strain zyj1-4	99%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	% 33
Uncultured Pseudomonas sp. clone 3-A	98%		
Pseudomonas aeruginosa strain L36	98%		
Pseudomonas sp. JAM-GA1109	99%		
Acinetobacter sp. PD12	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	% 20
Brevundimonas sp. OS16	97%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%13
Uncultured Brevundimonas sp. clone 7-5	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	
Phenylobacterium sp. G26	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%7
Ochrobactrum sp. ROi15	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%7

Sonuçların %75'ini proteobacteria oluştururken geri kalan kısmı bacteroidetes / chlorobi şubesindendir.

- ***Brevundimonas* sp.**

Baltık Denizi'nden izole edilmiş olan *Brevundimonas* türü; çubuk şekilli, gram negatif bakteridir. Bakteroid ya da vibroid olabilir. NaCl'siz ya da belirli NaCl konsantrasyonlarında optimum büyüme gösteren türleri vardır [36].

Tablo 4.6. Arçelik Kazan Çıkış Hortumunda belirlenen mikroorganizmalar.

Arçelik - Kazan Çıkış Hortumu Belirlenen Mikroorganizmalar	Sekans Benzerlik	Şube / Sınıf	Sıklık
Acinetobacter johnsonii strain B33	97%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%18
Acinetobacter sp. Fsh11	98%		
Sphingobacterium sp. cxh-2	98%	Bacteroidetes/Chloro bi group / Bacteroidetes	%18
Sphingobacterium sp. G-2-27-2	98%		
Comamonas sp. L11	98%	Proteobacteria / Betaproteobacteria	%18
Dokdonella koreensis strain NML 01-0233	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%27
Afipia genosp. 8	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%9,5
Stenotrophomonas sp. T2	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%9,5

Deneysel çalışmalar neticesinde elde edilen bilgiler her bölmeden izole edilen biyofilm örneklerinde benzerlikler bulunmakla birlikte farklı mikrobik komünite oluşumlarının bulunduğunu göstermektedir.

➢ ***Stenotrophomonas maltophilia***

Gram negatif bir bakteri türüdür. Çok farklı çevre koşullarında yaşayabilir. Çeşitli su ortamları (nehir, su kaynağı, kanalizasyon, içme suyu) ile toprak ve bitkiden (çim, buğday, şekerkamışı, lahana, pamuki fasülye, tütün, narenciye vs.) izole edilmiştir. Motilite özelliği gösteren çubuk şekillidir. Mezofiliktir. *In* vitro'da 20-37ºC'de hava ortamında %5 CO_2 varlığında büyüme göstermektedir. Özellikle hastane ortamında (nozokomyal) patojendir. Bir çok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir. Hastanede yatmakta olan hastalarda en çok solunum yollarında enfeksiyona neden olmaktadır. Nadiren menenjite, kemik-eklem ve mide enfeksiyonu ile üriner sistem rahatsızlıklarına da yol açmaktadır. Bu enfeksiyonlardan korunma için uygun dezenfeksiyon yöntemlerinin kullanılması tavsiye edilmektedir [30, 32, 33].

Tablo 4.7. Bru Kazan Çıkış Hortumu belirlenen mikroorganizmalar. Tür zenginliği en fazla olan numune beklenildiği üzere kazan çıkış hortumunda görülmüştür.

Bru - Kazan Çıkış Hortumu Belirlenen Mikroorganizmalar	**Sekans Benzerlik**	**Şube / Sınıf**	**Sıklık**
Methylobacterium extorquens PA1	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%23,53
Methylobacterium extorquens strain UCM B-3368	98%		
Uncultured Pseudomonas sp.	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%17,65
Pseudomonas mendocina strain zyj1-4	98%		
Uncultured Pseudomonas sp. clone Biofilm	98%		
Phenylobacterium sp. G26	99%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%11.76
Alcaligenes sp. T12RB	98%	Proteobacteria / Betaproteobacteria	%5.88
Uncultured alpha proteobacterium clone LV57-1-38	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%5.88
Starkeya sp. M08	97%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%5.88
Uncultured sheep mite bacterium Llangefni 75	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%5.88
Legionella-like amoebal pathogen 1	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%5.88
Ochrobactrum sp. ROi15	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%5.88
Agrobacterium sp. CCNWXJ0088	98%	Proteobacteria / Alphaproteobacteria	%5.88
Alishewanella sp. N5	98%	Proteobacteria / Gammaproteobacteria	%5.88

Sekans neticeleri sayesinde tür düzeyinde tayin gerçekleştirilmiş olup, elde edilen türlerin fenotipik özellikleri hakkındaki bilgiler literatürden taranmıştır. Literatür araştırması sonucunda bazı mikroorganizmalar hakkında bilgiye ulaşabilmek

mümkün olsa da kalan diğer türler hakkında DNA dizilimleri ve izole edildiği bölge dışında pek bir bilgiye ulaşılamamıştır.

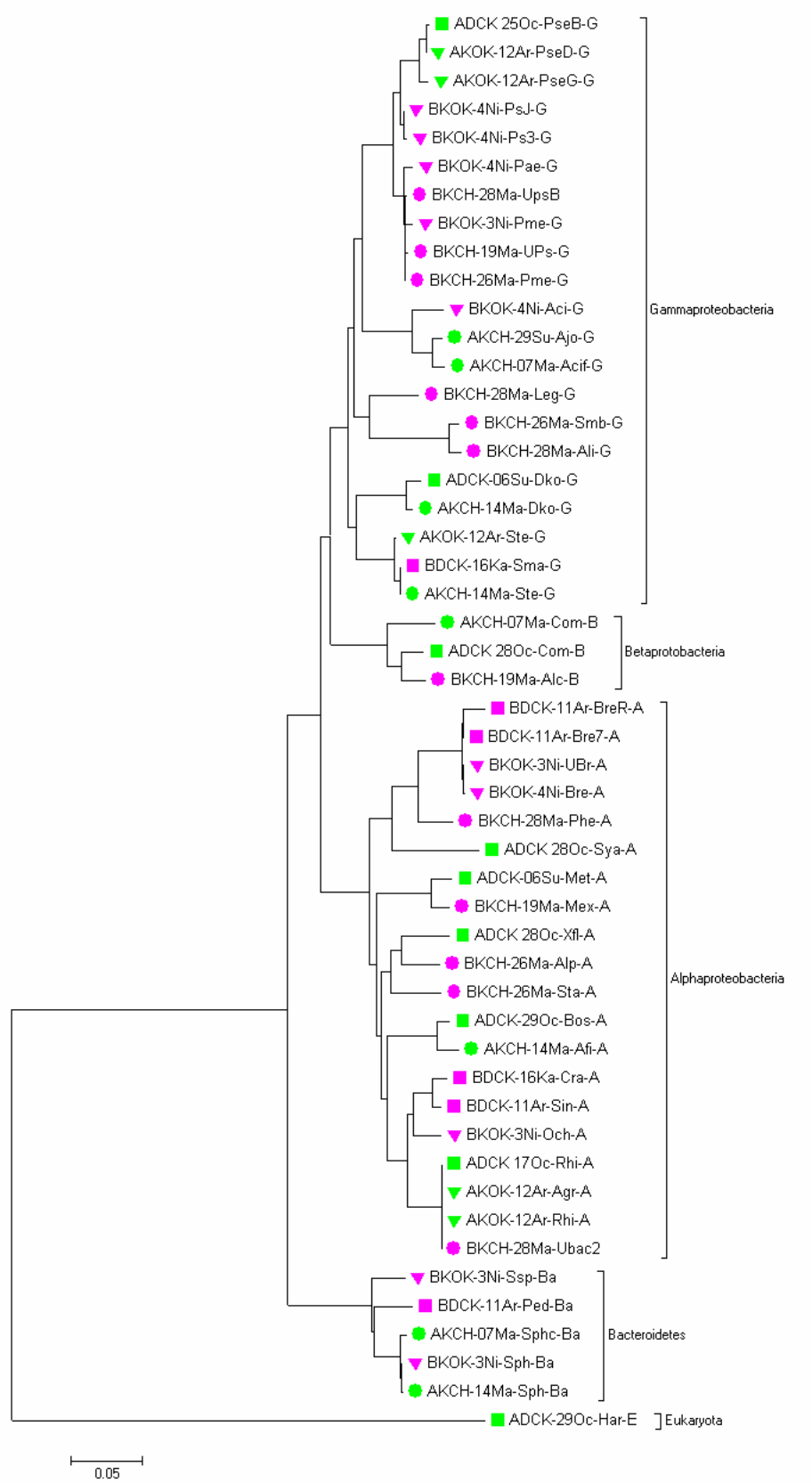
- ***Paenibacillus borealis***

Paenibacillus borealis, ladin ağacında bulunan azot sabitleyici bakteri türüdür. Gram negatif, çubuk şekilli ve hareketlidir. Anerobik oldukları ve 5-40ºC aralığında büyümektedir. Spor oluşturmaktadır [34].

- ***Sinorhizobium* sp.**

Sinorhizobium, baklagil bitkilerinde bulunan azot sabitleyici, gram negatif bir bakteridir. Çubuk şekilli olup motilitesi vardır. Toprakta serbest halde yaşayabileceği gibi baklagil bitkileriyle simbiyotik yaşamda sürebilir (Madigan M.T. vd., 2000).

Çamaşır makinesinin farklı bölümlerinden alınan numunelerin16s rRNA gen sekanslarına dayanılarak çıkarılan filogenetik ağaç şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Ağaç MEGA paketindeki neighbor-joining metodu ve 16s rRNA geninin bir *E. coli*'de 909-140bç bölgesine denk gelen parça kullanılarak oluşturulmuştur. Yeşil renk ile işaretli sekanslar Arçelik numunelerine, eflatun renktekiler Bru çamaşır makinesinden alınan numunelere tekabül etmektedir. Üçgen şekiller körük ön kapaktan alınan numuneleri, daire şekiller kazan çıkış hortumu ve kare şekiller deterjan çekmecesi kutusunu temsil etmektedir.



Şekil 4.6. Filogenetik ağaç.

Filogenetik ağaçtan görüldüğü üzere elde edilen türlerin %88'i proteobacteria şubesine dahildir. Belirlenen türler içerisinde geri kalan örnekler %10 Bacteriodetes şubesine ve %2 ile eukaryota krallığına aittir. Proteobacteria'lardan %48'i gammaproteobacteria sınıfına dahil iken kalan proteobacteria'ların %45'i alphaproteobacteria ve kalan %7 örnek betaproteobacteria sınıfındadır. Ayrıca elde edilen neticelerde rastlanılan tek ökaryot tür dışında kalan mikroorganizmalar gram negatif bakterilerdir.

Biyofilm katmanının oluşumunda en büyük role sahip mikroorganizmaların alphaproteobacteria ve gammaproteobacteria sınıfına dahil olduğu oluşturulan filogenetik ağaçtan kolaylıkla anlaşılmaktadır. Fakat sonuçlar içinde ökaryotik mikroorganizmalara rastlanılmaması şaşırtıcı bir sonuç olmuştur. Bu durum birkaç farklı şekilde izah edilebilir. Birinci ihtimal alınan numunelerde baskın türlerin belirlenen türlerden oluşması olabilir. Bu durumda total mikrobiyal genomik DNA'içinde ökaryotik mikroorganizmalara ait genomik DNA'dan rRNA amplifiye edilememiş ve bu türler tanımlanamamış olabilir. İkinci ihtimal kullanılan "üniversal" primerlerin yeterince üniversal olmamasından kaynaklanıyor olabilir. İdeal olarak kullanılan primerlerin tüm Eubacteria ve Eukarya krallıklarına komplementer olması gerekir. Fakat literatürde üniversal olarak adlandırılan birçok primerin üniversal olmaktan uzak olduğu birçok çalışmada ispatlanmıştır (Forney, Baker).

5. VARGILAR VE ÖNERİLER

Tez süresince gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sayesinde çamaşır makinesinde biyofilm oluşumunda rol alan mikroorganizmalar nihai olarak belirlenmemiş olsada komünite içinde sıkça rastlanan mikroorganizmaların belirlenmesinde ilk aşamayı oluşturmuştur. Kullanılan teknik daha önceden kültür ortamında yetiştirilememiş fakat önemli biyojeokimyasal fonksiyonlara sahip taksonomik grupların keşfi için gerekli ön bilgiyi sağlayabilir. Örnekler içinde bulunan mikroorganizmaların izolasyonu veya 16s rRNA-yöntemine dayalı tekniklerin fonksiyon analiz yöntemleri ile birlikte kullanılması durumunda biyofilmi oluşturan organizmalar hakkında ayrıntılı bilgi edinmek mümkün olabilecektir. Ayrıca biyofilm yapısının 16s rRNA yöntemi ile analizi, Arçelik A. Ş. – İ.T.Ü. MOBGAM arasında gelecekte gerçekleştirilecek çalışmaların temelini oluşturacağı için büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Chappell, M.A ve Evangelou, V.P., 2002, Surface chemistry and function of microbial biofilms, *Advances in Agronomy*, **76:** 163-199.

[2] Allison, D.G., 1998, Exopolysaccharide production in bacterial biofilms, *Biofilm Journal,* **3**(2).

[3]Lawrence J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991, Optical sectioning of microbial biofilms, *J. Bacteriology*, **173**: 6558-6567

[4]Bressel, A., Schultze, J.W., Khan, W., Wolfaardt, G.M., Rohns, H.P., Irmscher, R., Schöning M.J., 2003, High resolution gravimetric, optical and electrochemical investigations of microbial biofilm formation in aqueous systems, *Electrochimica Acta*, **48:** 3363-3372**.**

[5] Oliveria, R., Melo, L., Oliveria, A., Salgueiro, R., 1994, Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescen*: effects of pH and surface material, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **2**(1-3): 41-46.

[6] Burne, R.A., Marquis R.E., 2004, Biofilm acid/base physiology and gene expression in oral bacteria, *Methods in Enzymology,* **337:** 403-415

[7] Lindsay, D., Holy, A., 2006, Bacterial biofilms within the clinical setting: What healthcare professionals should know, *Journal of Hospital Infection*, **64:** 313-325.

[8] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, **284**: 1318-1322

[9] Elder M. J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K., 1995, Biofilm-related infections in ophthalmology, *Eye*, **9:** 102-109

[10]Brown, M.R., Allison, D.G., Gilbert, P., 1988, Resistance of bacterial biofilm to antibiotics: A growth-rate related effect, *J. Antimicrob. Chemoter.*, **20**:777

[11] Cirillo, J.R., 1999, Exploring a novel perspective on pathogenic relationships, *Trends in Microbiology,* **7**(3): 96-98.

[12] Barbeau, J., 2000, Waterborne biofilms and dentistry: The changing face of infection control, *Jour. Of Can. Dent. Association,* **66:** 539-541.

[13] Berry, D., Xi, C., Raskin, L., 2006, Microbial ecology of drinking water distribution systems, *Current Opinion in Biotechnology,* **17**(3): 297-302.

[14] Todar, K., 2007, Todar's online textbook of bacteriology, http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html

[15] Halam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J., 2001, The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Research,* **35,** 4063-4071

[16]Chongdar, S., Gunasekaran, G., Kumar, P., 2005, Corrosion inhibition of mild steel by aerobic film, *Electrochimica Acta,* **50,** 4655-4665

[17]Gagnon, G.A., Slawson R.M., 1999, An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *Journal of Microbiologic Methods*, **34**: 203-214.

[18] Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read R.R., 2002, Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Canadian Journal of Veterinary Research,* **66**, 86-92.

[19] Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa M.A., Monistrol, I.F., Laborda, F., SanJose C., 2006, Bacterial biofilm using fungal enzymes, *Enzyme and Microbial Technology,* **40,** 51- 56.

[20] Schmidt, W., 2004, Using Chlorine Dioxide for Drinking Water Disinfection by the Application of the Chlorite/Chlorine Process, *Acta hydrochimica et hydrobiologica,* **32,** 48-60

[21] Chen, X., Stewart S.P., 2000, Biofilm removal caused by chemical treatment, *Wat. Res.,* **34**, 4229-4233.

[22] Rivas, R., Velazquez, E., Zurdo-Pineiro, J.L., Mateos, P.F., Molina, M.E., 2004, Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes, **56,** 413-426

[23] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007*, MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution **24**, 1596-1599

[24]Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994, A place for DNA—DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44,** 846–849

[25] Saito, N., Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, **4**,406-425

[26] Wang G.C.Y., Wang, Y, 1997, Frequency of formation of chimeric molecules is a consequence of PCR coamplification of 16s rRNA genes from mixed bacterial genomes, *Applied Environmetal Microbiology*, **63**, 4645-4650

[27]Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2007, The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and

quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.,* 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889

[28]Hugenholtz, P., Pituelle, C., Hershberger, K.L., Pace, N.R., 1998, Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring, *J. Bacteriol*, **180**, 366-376

[29] Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2001, A revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations*: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. Undicola and R. Vitis*, *Int. Jour. Of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51,** 89-103

[30] Moore, E.R.B., Krüger, A.S., Hauben, L., Seal, S.E., Baere, R., Wachter, R., Timmis, K. N., Swings, J., 1997, 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*, *FEM Microbiology Letters*, **151,** 145-153.

[31]Tzfira, T., Citovsky, V., 2008, Agrobacterium from Biology to Biotechnology, Springer, New York

[32] Denton, M., Kerr, G. K., 1998, Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clinical Microbiology Reviews*, **11**, 57-80.

[33] Öngüt, G., Özcan, A., Kandişer, A., Öğünç, D., Çolak, D., Gültekin M., 2005, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas Maltophilia* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının E test ile araştırılması, *Turkish Journal of Infection*, **19**(4): 425-428.

[34]Elo, S., Suominen, I., Kampfer P., Juhanoja, J., Salkinoja- Salonen, M., Haahtela, K., 2001, *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogenfixing species isolated from spruce forest humus in Finland, *Int. Jour. Of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 535-545.

[35] Steyn, P. L., Segers, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K., Joubert, J.J., 1998*,* Classification of heparinolytic bacteria into a new genus*, Pedobacter,* comprising four species*: Pedobacter heparinus* comb. nov*., Pedobacter piscium* comb. nov*., Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. ov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov*., Int. Jour. of Systematic Bacteriology,* **48,** 165-177.

[36] Abraham, W.R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E.R.B., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B.J., Bennasar, A., Smith, J., Tesar, M.,

1999, Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*, *Int. Jour. Of Systematic Bacteriology*, **49,** 1053-1073.

[37] Giovannoni, S. J., Mullins, T. D., Field, K.G., 1995, Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study ofunculturable microbes, *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*, **25,** 217–248. Berlin: Springer-Verlag.

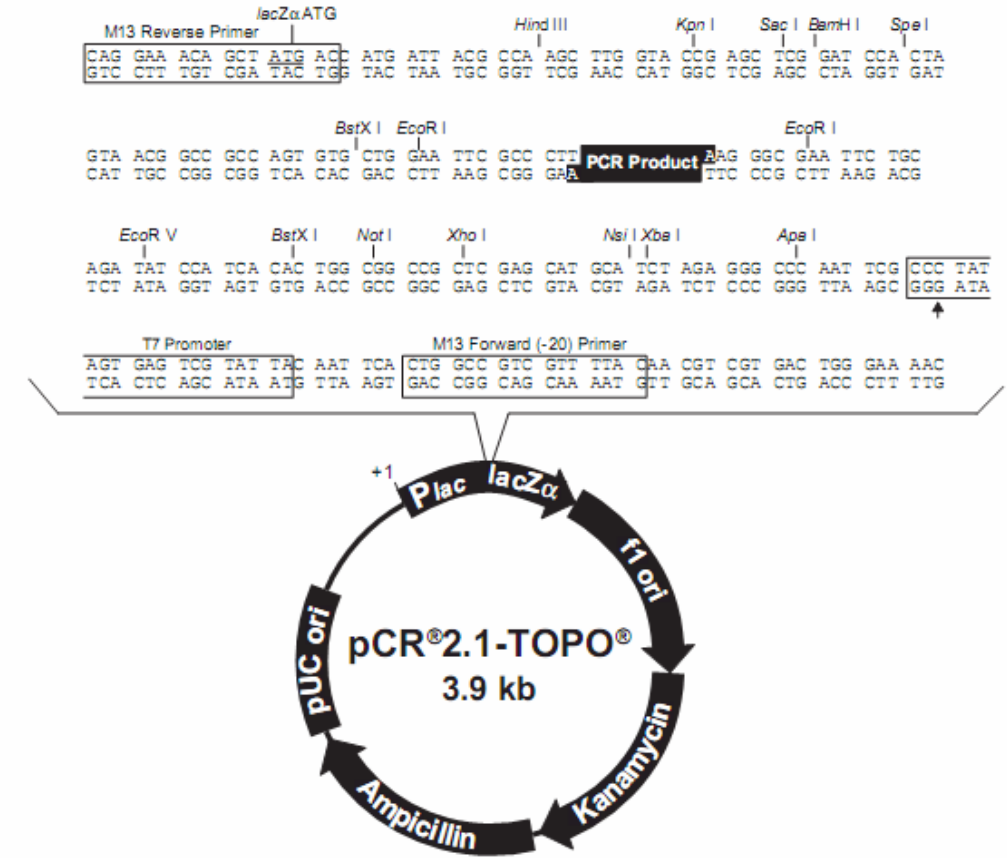
[38] Forney, L., J., Zhou, X., Brown, C.J., 2004, Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king, *Current Opinion in Microbiology,* **7,** 210-220

EKLER

Ek A.

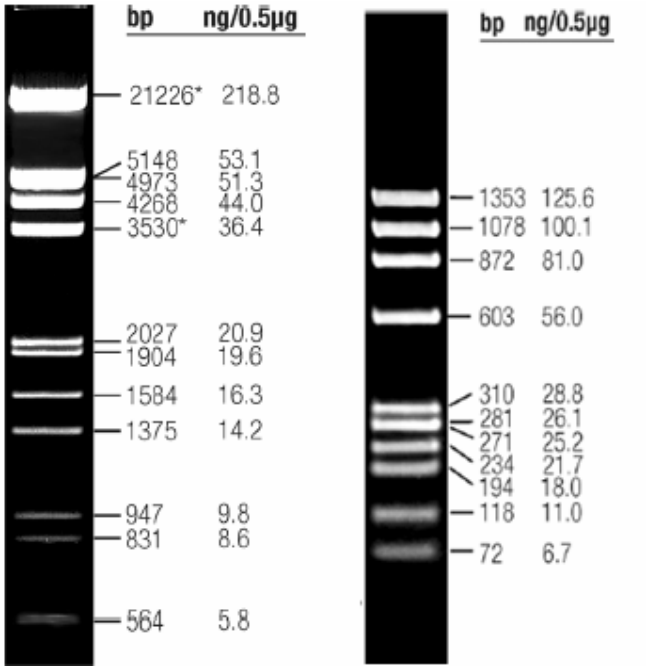
pCR®2.1-TOPO® vektörünün haritası

Pozisyon (bç)	**Element**
1 – 547	LacZα fragmanı
205 - 221	M13 reverse priming bölgesi
234 - 357	Çoklu Klonlama Bölgesi
364 - 383	T7 promoter / bağlanma bölgesi
391 – 406	M13 Forward (-20) bağlanma bölgesi
548 - 985	f1 orijin
1578-2852	gene III CDS (start 1578)
1319 - 2113	Kanamisin resiztans ORF
2131 - 2991	Ampisilin Rezistans ORF



Ek B.

Moleküler Ağırlık İmleyiciler



a) b)

a) λ DNA *EcoRI* and *HindIII* ile kesilmiş imleyici (marker-3), 1.0% agaroz, 0.5µg/lane, 8 cm jel uzunluğu, 1X TAE, 17V/cm. (Katalog # SM0191, NBI Fermentas).

b) ΦX174 DNA *Bsu*RI ile kesilmiş imleyici (marker-9), 1.7% agaroz, 0.5µg/lane, 8 cm jel uzunluğu, 1X TBE, 5V/cm. (Katalog # SM0251, NBI Fermentas).

Ek C.

LAB EKİPMANLARI

Otoklavlar	**:** 2540 ML benchtop autoclave, Systec GmbH Labor-Systemtechnik.
	: NuveOT 4060 vertical steam sterilizer, Nuve.
Santrifüjler	**:** Avanti J-30I, Beckman Coulter.
	: Microfuge 18, Beckman Coulter.
Santrifüj Rotorları	**:** JA30.50Ti, Beckman Coulter.
	: F241.5P, Beckman Coulter.
Derin Dondurucu ve Buzdolapları	**:** Heto Polar Bear 4410 ultra freezer, JOUAN Nordic A/S, Katalog# 003431.
	: 2021 D derin dondurucu, Arçelik.
	: 1061 M refrigerator, Arçelik.
Elektroforez Ekipmanları	**:** E-C Mini Cell Primo EC320, E-C Apparatus.
	: Mini-V 8.10 Vertical Gel Electrophoresis System, Life Technologies GibcoBrl (now Invitrogen), Katalog# 21078.
Jel Dokümantasyon Sistemi	**:** UVIpro GAS7000, UVItec Limited.
Buz Makinası	**:** AF 10, Scotsman.
İnkübatör	**:** EN400, Nuve.
Orbital karıştırıcı	**:** Certomat S II, product# 886 252 4, B. Braun Biotech International GmbH.
Magnetik Karıştırıcı	**:** AGE 10.0164, VELP Scientifica srl.

	: ARE 10.0162, VELP Scientifica srl.
Pipetler	**:** Pipetteman P10, P 100, P1000, Eppendorf
pH metre	**:** MP 220, Mettler Toledo International Inc.
	: Inolab pH level 1, order# 1A10-1113, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co KG.
Güç Kaynağı	**:** EC 250-90, E-C Apparatus.
Saf Su Sistemi	**:** USF Elga UHQ-PS-MK3, Elga Labwater.
Spektrofotometre	**:** DU530 Life Science UV/ Vis, Beckman.
	: UV-1601, Shimadzu Corporation.
Sterilizatör	**:** FN 500, Nuve.
Transilluminator	**:** UV Transilluminator 2000, Katalog# 170-8110EDU, Bio- Rad.
Vorteks Cihazı	**:** Reax Top, product# 541-10000, Heidolph2.2.

ÖZGEÇMİŞ

Emrah Yelboğa, 15.05.1981 tarihinde Ankara'da doğdu. 1999 yılında Çankırı Fen Lisesinden mezun oldu. 2005 yılında İ.T.Ü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü bitirdi, 2006 yılında Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji yüksek lisans programına başladı.