

T. C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKRODALGANIN *Bacillus Subtilis* ve *Escherichia coli* K₁₂
suşu ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ELEKTROFORETİK İNCELENMESİ**

(YÜKŞEK LİSANS TEZİ)



Murat KIZIL

T. C.	
DİCLE ÜNİVERSİTESİ	
KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	10037297
Tasnif No.	589-9
	1412

1991

DIYARBAKIR - 1991

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ

1. 1. TERMOFİL BAKTERİLER ÜZERİNE GENEL BİLGİLER.....	1
1. 2. MİKRODALGA VE MİKRODALGANIN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....	8
1. 3. ÇALIŞMANIN AMACI.....	16

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. BİYOLOJİK MATERYAL.....	17
2. 2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	23
2. 3. KULLANILAN ALETLER.....	23
2. 4. ELEKTROFOREZ İŞLEMİ.....	24
2. 5. BAKTERİLERE LAM ÜZERİNDE YAPILAN MİKRODALGA UYGULAMASI.....	31
2. 6. BAKTERİLERİN ÜRETİLMESİ VE MİKRODALGA UYGULAMASI.....	32
2. 7. BAKTERİ SAYIMI.....	33
2. 8. BAKTERİLERİN PARÇALAMA İŞLEMİ.....	34
2. 9. ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTAR TAYİNLERİ.....	34

3. BULGULAR.....	35
------------------	----

4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI.....	37
---------------------------------	----

5. ÇİZELGELER VE RESİMLER.....	42
--------------------------------	----

6. İLAVELER I. B.subtilisin Teşhisi İçin Hazırlanan Besiyerlerinin Bileşimi.....	57
---	----

7. İLAVELER II. B.subtilis'in Teşhisi İçin Hazırlanan Boyalar, İndikatörler ve Reaktiflerin Bileşimi.....	60
8. İLAVELER III. Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Reaktifin Hazırlanması.....	61
9. İLAVELER IV. Çermik Belkışhatun Termal Kaplıcasının Özellikleri.....	62
10. ÖZET.....	63
11. KAYNAKLAR.....	64

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Y.Doç.Dr.Çetin Aytekin'in danışmanlığında yapılmıştır.

Bu olanagi sağladıklarından ve yakın ilgilerinden ötürü kendilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında bazı sonuçların tartışılmasında yol gösterici yardımlarından dolayı Y.Doç.Dr. Sayın Yavuz Ensari'ye, Elektroforez profillerinin resimlerinin çekiminde yardımcı olan Y.Doç.Dr. Sayın Erhan Ünlü'ye teşekkür ederim.

Ayrıca Biyokimya Araştırma laboratuvarımızda, birlikte çalıştığımız ve birlikte çalışmaya güzel bir örnek oluşturduğumuza inandığım arkadaşlarım Zübeyde Kaya, Arş.Gör. Birol Otludil ve Arş. Gör. Fikret Uyar'a teşekkür etmek isterim.

Bu vesile ile çalışmamı DÜAP - 88 - FF 94 nolu proje ile kısmen de olsa destekleyen Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

1. 1. TERMOFİL BAKTERİLER ÜZERİNE GENEL BİLGİLER

Sıcaklık organizmalar için en önemli çevre faktörlerinden birisidir. Canlı organizmaların üremeleri ve yaşamsal faaliyetlerini yerine getirmelerinde sıcaklığın büyük bir etkisi vardır. Her organizma yaşamsal faaliyetlerini belirli sıcaklıklarda sürdürür. Bu faaliyetlerin sürdürüldüğü en düşük sıcaklık derecesine minimum, en yükseğine maksimum sıcaklık denir. Bu her iki uç sıcaklık derecesinde organizma normal gelişemez. Ancak faaliyetlerini normal sürdürdükleri bu iki uç arasında optimum bir sıcaklık derecesi vardır. Her organizmanın optimum sıcaklık değeri diğerlerinden farklıdır(1). 50 °C'lik bir sıcaklık çok hücreli hayvanlar veya bitkiler için kritik seviyede yüksek olmasına rağmen, bazı organizmalar için bu sıcaklık düşüktür(2.3).

Son yıllarda yaşamın en üst sıcaklık derecesinin ne olduğu sorusu bilim adamlarının çözüm bulmaya çalıştığı konulardan biri haline gelmiştir.

Bazı grupların büyümeleri için yaklaşık en üst sıcaklık sınırları tablo (1.1) de görüldüğü gibidir(4.5).

Tablo (1.1). Bazı grupların büyüyebildikleri yaklaşık en üst sıcaklık sınırları.

<i>GRUP</i>	<i>SICAKLIK (°C)</i>
<i>HAYVANLAR</i>	
Balıklar ve diğer sucul omurgalılar.....	38°C
Böcekler.....	45°C - 50°C
Kabuklular.....	49°C - 50°C
<i>BITKILER</i>	
Damarlı bitkiler.....	45°C
Kara yosunları.....	50°C
<i>ÖKARYOT MİKROORGANİZMALAR</i>	
Protozoa.....	56°C
Algler.....	55°C - 60°C
Mantarlar.....	60°C - 62°C
<i>PROKARYOT MİKROORGANİZMALAR</i>	
Mavi yeşil algler.....	70°C - 73°C
Fotosentetik bakteriler.....	70°C - 73°C
Kemolitotrofik bakteriler.....	> 100°C
Heterotrofik bakteriler.....	> 100°C

Yüksek sıcaklıklarda yaşayan mikroorganizmaların doğal çevreleri kaplıcalardır. Sıcak kaplıcaların p^H 'sı 1 ile 9 arasında değişir. Hepsi olmasa bile birçok sıcak kaplıca H_2S ihtiva eder. Yeryüzünde ender bulunan arsenik, florür ve altın gibi elementlerin çoğu kaplıcada farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Bir çok kaplıca yüksek oranda radyoaktivite içerir. Fakat bazılarının içerdigi radyoaktivite yeryüzü sularındakinden pek fazla değildir. Bazı kaplıcalar silikat, bazıları $CaCO_3$ ve bazıları da elementel sülfür içerirler. Yüksek sıcaklıklardaki yaşamın üzerinde; p^H , tuzluluk, besin niteliği ve miktarı, suyun hidrostatik basıncı ve ışık yoğunluğu gibi çevre faktörlerinin etkisi vardır. Mikroorganizmalardan bakterileri optimal üreme sıcaklıklarına göre üç grupta toplayabiliriz(6).

1. Psikrofil Bakteriler: Bu gruptaki bakteriler 0° ile $20^\circ C$ arasında iyi büyürler. $30^\circ C$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda ölmeye başlarlar. Bu bakteriler daha çok buzdolapları, soğuk hava depoları, soğuk tüneller gibi bilhassa et ve hayvansal ürünlerin muhafaza edildiği ortamlarda ürerler.

2. Mezofil Bakteriler: Bu gruptaki bakteriler 20° ile $45^\circ C$ arasında yaşamlarını sürdürürler. İnsanlarda ve evcil hayvanlarda en çok hastalık etkisi oluşturan bakterilerdir. Bu grubun optimum üreme sıcaklıkları $25^\circ C$ ile $37^\circ C$ arasında değişir.

3. Termofil Bakteriler: Büyümeleri için yüksek sıcaklığa gereksinim gösteren bakterilerdir. $45^\circ C$ ile $60^\circ C$ arasında yaşamsal faaliyetlerini sürdürürler. Fakültatif termofiller olarak

adlandırılan bazı bakteri türlerinin büyüme sınırları mezofil organizmaların sıcaklık sınırlarına yaklaşabilir. Diğer taraftan bu grupta öyle organizmalar vardır ki en iyi geliştikleri sıcaklık dereceleri 60°C'nin üzerindedir. Bunlara mutlak termofiller adı verilir. Örneğin, sıcak kaplıcalarda 79°C'de normal bir büyüme gösteren *Thermus aquaticus* bakterisi mutlak termofil bir mikroorganizmadır.

Bazı kaplıcalarda yaşayan mikroorganizmaların yaşamı için en üst sıcaklık içinde yaşadıkları sıcaklık değildir. Bu sıcaklık onların büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan optimum sıcaklığa yakındır. Yine bazı kaplıcalarda yapılan araştırmalar sonucunda suyun kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda bile bazı bakterilerin yaşadıkları tespit edilmiştir(7). Bütün bakteriler hücresel bileşenlerin dönüşümü, hücre içi iyonik denge ve pH'nın korunması gibi başlıca işlemler için enerjiye gereksinim duyarlar. Bu enerjiyi nasıl elde ettikleri konusunda termofil bakterileri ele alacak olursak, kullandıkları enerji kaynaklarına göre farklılıklar gösterirler. Örneğin enerjilerini güneşten alan "Fotosentetik termofil bakteriler" ve enerjilerini biyokimyasal reaksiyonlardan karşılayan "Kemosentetik termofil bakteriler" gibi.

Kemosentetik termofil bakterilerin kullandıkları maddeler arasında genellikle şunlar vardır. Şekerler, polipeptitler, amino asitler, alkoller, karboksilik asitler, hidrokarbonlar, karbonmonoksit ve inorganik (H_2 ve S°) maddeleridir(7).

Diğer yaşam formlarının ölümüne yol açan bu son derece yüksek sıcaklıklarda termofil bakterilerin nasıl yaşadıkları sorusuna yüksek sıcaklıklarda bakterilerin biyomoleküllerin dayanıklılığı temel alınarak yapılan incelemelerle cevap verilebilir.

Termofil bakterilerde önemli biyomoleküllerin analizi yapıldığında proteinlerinde, nükleik asitlerinde ve lipitlerinde detaya inildiğinde yapısal farklılıklar belirlenmiştir. Mutlak termofil bakterilerin membran lipitleri, mezofillerinkinden daha doymuş düz zincirli yağ asitleri ihtiva eder. Bu olgu membranın alışkanlığını sağlayıp termofil bakterilerin daha yüksek sıcaklıklarda yaşamasına yardımcı olur (5,7,8). Termofil bakterilerin nükleik asitleri termal dayanıklılığı sağlamada kalıtımsal bir yapıya sahiptir. Örneğin, mezofillerden ve termofillerden elde edilen nükleik asitlerin Guanin, Sitozin kapsamı önemli bir şekilde farklılıklar gösterir (9,10).

Ayrıca termofillerin t-RNA'ları termal dayanıklılığa sahip olmak için ilginç bir yapı kazanmıştır. Örneğin, *Thermus* türlerindeki t-RNA'nın termofilik koşullara adaptasyonundan sorumlu özgün baz çiftleri daha fazla miktarda Guanin, Sitozin bazları ihtiva eder. Guanin, Sitozin oranının fazlalığı hidrojen bağlarının da fazlalaşmasına ve dolayısı ile artan sıcaklıklara daha dayanıklı bir yapı kazanmalarına neden olur (10,11).

Termofil bakterilerin dayanıklı enzimleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bir proteinin yapısında tek bir amino asidin değişmesi proteinin sıcaklığa dayanıklılığını değiştirebilir(11).

Örneğin *Colesteridium*'den elde edilen saf ferrodoksilerin yapısı incelendiğinde, çok sayıda bazik amino asitlere rastlanmıştır. Bu durum proteinin içerisinde daha fazla iyonik bağların oluşmasını sağlamakta ve bu sayede protein sıcaklığa dayanıklı hale gelmektedir. Ayrıca mezofil ve termofil *Bacillus* türlerinden saflaştırılan laktat dehidrojenaz enziminin aktif bölgesinde Arginin ve Lizin gibi polar aminoasitlerin sayısı karşılaştırıldığında, termofil bakterilerde bu amino asitlerin sayısında bir fazlalık olduğu görülmüştür. Bu da moleküllerin iç tarafında hidrojen ve iyonik bağların etkileşiminin fazla olmasına ve dolayısıyla termal dayanıklılığın artmasına neden olur(11).

Yüksek sıcaklıklarda yaşamın ve eşsiz makromolekül özelliklerinin bir sonucu olarak termofil bakteriler, fiziksel ve kimyasal olarak dayanıklı enzimlere sahiptir. Bunun için son yıllarda termofil bakterilerin enzimleri, enzim teknolojisinde, (Gen Mühendisliğinde) sıkça kullanılmaya başlanmıştır(5).

Örneğin, mezofillerden elde edilen DNA polimeraz enzimi (bu enzim DNA sentezini gerçekleştirmektedir) yüksek sıcaklıklarda yeterince işlev görmeyişi nedeniyle, *Thermus aquaticus*' dan saflaştırılan sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanılarak daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir(10). Atık

maddelerin değerlendirilmesinde yakıt üretiminde , kömürden gaz eldesinde, biyopolimerlerin enzimatik hidrolizinde ve düşük rezervlerden termofilik asidofillerle metallerin ekstraksiyonu, gibi yeni uygulamalar termofil bakterilerin biyoteknoloji alanlarında kullanımını kaçınılmaz kılmıştır(5.7).

Çesitli termofil bakterilerin türleri sayesinde odun selülozdan etanol üretimi gerçekleştirilmektedir. Bazı termofil metanojen bakteriler de hiçbir organik besine gereksinim duymadan hücrenel bileşenlerini CO_2 ve H_2 den sentezleyebilmektedir(12.13).

1. 2. MİKRODALGA VE MİKRODALGANIN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

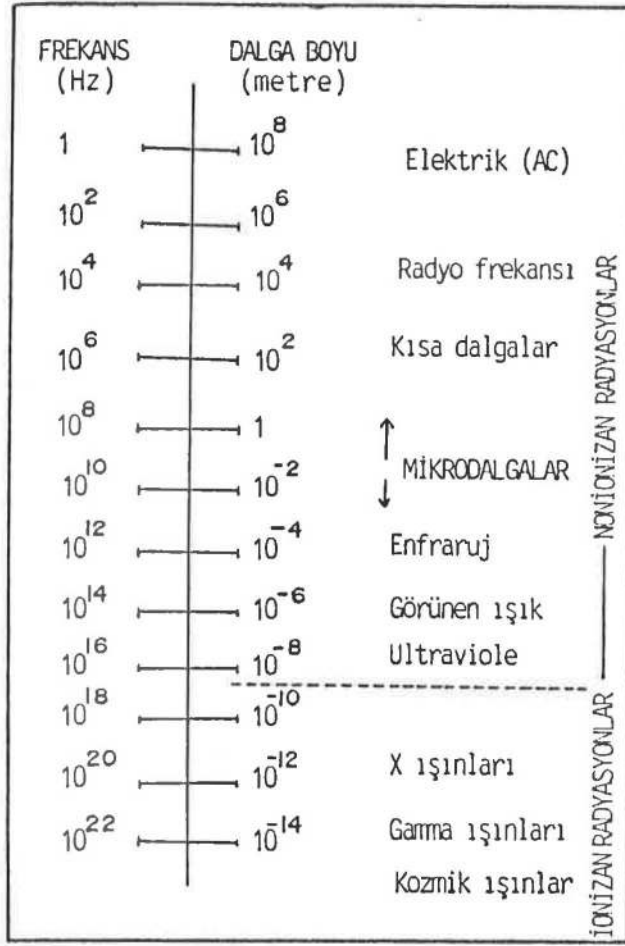
Dalga boyu ($0.1 - 10^7$ cm) arasını kapsayan mikrodalga ve radyo dalgaları her zaman atom veya molekül düzeyinde bir enerji salınması sonucu meydana gelmezler. Mikrodalgalar; bir iletken üzerinden şiddeti ve yönü zamana bağlı olarak değişen bir elektrik akımı geçirilmesi ve böylece elektrik - manyetik alanın periyodik olarak değişime uğraması sonucunda oluşurlar. Bu esnada, periyodik bir kuvvet etkisinde kalan katı, sıvı ve gaz ortamlardaki moleküller, alan değişimlerine ve ortamın yapısına bağlı olarak belirli yönelme hareketlerinde bulunurlar. Ortamın dielektrik sabiti (ϵ) ve kırılma indisi (n), moleküllerin alan içindeki yönelme dereceleri ile yakından ilgilidir. Kuramsal olarak dalga boyunun büyük olması koşulu ile;

$$\epsilon \approx n^2 \dots \dots \dots (1.1)$$

olduğu saptanmıştır.

Mikrodalgaların ve radyo dalgalarının elektromanyetik tayf içinde kapsadıkları bölgeler şekil (1.1)'de görülmektedir.

Dalga boyları 1mm ile 1m arasındaki elektromanyetik dalgalara "Mikrodalgalar" denilmektedir. Mikrodalga elde edilmesinde manyetron ve klistron lambalarından yararlanılır. Bu dalgaların özellikle katı cisimlerin molekül yapılarının belirtilmesinde, radar ve radyo iletişimde geniş kullanım alanı buldukları belirtilmektedir (14) Şekil (2.1).



Sekil (1.1). Elektromanyetik spektrum

Ondokuzuncu yüzyılda keşfedilen ve o günden günümüze kadar, özellikle İkinci Dünya Savaşı sırasında radyo ve radar frekanslarında kullanılan, daha sonra tıpta, haberleşmede, endüstride ve askeri alanda geniş kullanım alanı bulan mikrodalgalar ve bunlardan yararlanılarak geliştirilen aletler evlerimizde kullanılmakta ve günlük yaşantımızın bir parçasını oluşturmaktadır. Günümüzde evlerde kullanılan mikrodalga fırınlar, el telsizleri bu araçlara birer örnek olarak gösterilebilirler (15.16).

Mikrodalgalar elektromanyetik spektruma giren enerji türlerinden biridir.Yüksek frekanslı ışınlar olup,elektromanyetik spektrumun iyonlaşmayan kısmında yer alırlar. Bu dalgaların dalga boyları, frekansları ve enerjileri farklıdır.

Mikrodalgalar organizmadan herhangi bir ağrı, sızı uyandırmadan geçerler. Bir maddeden mikrodalgaların geçmesi durumuna enerji,

$$Q = I^2 R t \dots\dots\dots(1.2)$$

joule bağıntısı gereğince ısı enerjisine dönüşür ve söz konusu madde ısınır(17).

Mikrodalgaların biyolojik etkilerini termal ve termal olmayan etkiler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Termal etkilerin oluşması için 10 mW/cm² yoğunluğunda, hücresel ve biyokimyasal düzeydeki değişikliklerin oluşması içinde 1 mW/cm² yoğunluğunda bir ısınlamaya gereksinim vardır(18).

Mikrodalga radyasyonuna bağlı olarak meydana gelen hücresel tahribatın mekanizması tam olarak bilinmemektedir(19).Bu radyasyonun Nükleik asit, protein ve hücre membranlarının protein-lipopolisakarit bileşimini etkilediğine dair bazı teoriler ileri sürülmüştür(20.21.22.23).

Blevins ve arkadaşları tarafından,2.450.000 Cycle/sn bir moleküller rezonans frekansına karşılık gelen, 2450 MHz frekansta mikrodalgalar kullandılar. Bu frekansın, DNA molekülleri boyunca heliks yapı içindeki Guanin-Sitozin, Adenin-Timin arasındaki hidrojen bağlarının kopmasına ve tek DNA zincirlerinin

kırılmasına yol açabileceğini savundular. Bu baz çifti yer değiştirmesi, ilavesi veya çıkarılması gibi DNA'nın yapısındaki değişimler, dolayısıyla mRNA'da yanlış çevirilmeler sonucu farklı protein sentezlenmesine neden olabilir(19.24).

Mikrodalgaların kısa uygulamaları sonucu, DNA'da kısmi kırılmalara yol açabilirken uzun süreli uygulamalar ise organizmayı öldürebilen (onarılması mümkün olmayan) DNA'da yıkımlara yol açabilir.(19.25)

8 ve 14 saniyelik mikrodalga (2450 MHz) uygulaması ile yüksek mutasyon hızlarına ulaşıldığı saptanmıştır. 15 saniyeden daha uzun süreli uygulamalarında bakteri hücrelerinin ölümünde belirgin bir artış gözlenmiştir(19).

Mikrodalga fırınlar kimyasal bağları koparmaksızın yüzey-sel ısınmaya neden olan enerji içeren ve 12 cm dalga boyu ile 2450 MHz veya 915 MHz frekanslı dalgalar ürettiği schiffman tarafından bulunmuştur.

Mikrodalgalar enerji formundadırlar, ısı formunda değildirler. Mikrodalgalar yiyecek ürünlerindeki yağlar veya su gibi materyallerle etkileştiğinde ısı meydana getirir(26).

Mikrodalga'nın, iyonların hızlanmasına ve diğer moleküllerle çarpışmasına neden olması veya dipol yapıdaki moleküllerin hızlı değişen elektriksel alanda (915 veya 2450 Milyon kere/sn) dönmelerine ve belli bir düzene göre dizilmeleri nedeniyle ısı üretimi sağlanmış olur. Isıtılmış maddelerdeki bu hareketi çok etkili ve hızlı bir ısınma oluşturur. Yiyecekler normal ısınma zamanla-

rının dörtte birinde veya daha az bir zamanda ısıtılabilir.(26.-27.28).

Mikrodalga ile ısıtmanın gelişimi, problemsiz olmamaktadır. Craven ve Lillard; mikrodalga fırınındaki dalga çiftlerinin neden olduğu düzensiz ısı dağılımını açıklayamamışlardır(29).

Bakteriler üzerine mikrodalga ısınlamasının etkisi 1950'lerden önce düzensiz olarak çalışılmıştır. Ingram ve Page; bakteriyofaj T₄, tütün mozaik virüsü (TMV), E.coli ve Saccharomyces cerevisi' yi yüksek voltaj alanlarında, 20 MHz veya 10 MHz'de 12 dakika ısınladığında olası plaka formunda veya bitki lezyonlarında hiç bir etki gözleyememiştir(30).

Dalaney ve arkadaşlarının Aspergillus niger ve Bacillus stearothermophilus sporlarının disk, kâğıt serit üzerinde, Krema, sukroz, kuru süt, fizyolojik serum ve distile su gibi farklı ortamlarda ısınlamaya tabii tuttu. Sonuçlar kuru kâğıt şeritin üzerinde ısınlanan bakterilerin yüksek bir yaşayabilirlik şansına sahip olduklarını gösterdi.

2450 MHz ısınlamanın B. Stearothermophilus üzerinde zararlı bir etkisinin olmadığını, fakat Aspergillus niger'de hücresel tahribata neden olduğu görülmüştür.

Buna karşı deneylerin yapıldığı beş besiyerinde yüksek miktarlarda hücresel tahribat gözlediler. Araştırmacılar 2450 MHz'lik mikrodalga ile, ısıtılan mikroorganizmalarda gözlenen etkilerin bilinen ısıtma yöntemlerinden anlamlı oranlarda farklı olmadığını belirtmişlerdir(31).

Dreyfuss'te yaptığı çalışmada *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* ve *Salmonella enteritidis*' in liyoflize kültürlerinin mikrodalga ısınlamasında etkilenmediğini gözlemlemişlerdir(32). Dreyfuss ve arkadaşları, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *S. enteritidis* kültürlerini bir mikrodalga fırınında (2450 MHz) mikrodalga ısınlamaya tabii tuttular ve hayatta kalan bakterileri incelediklerinde bilinen ısıtma sistemlerinin uygulanması ile mikrodalğanın karşılaştırılmasında genellikle aynı sonuçları elde etmişlerdir. Yani hem mikrodalga uygulaması ile hemde, ısıtma sistemleri sonucu canlı bakteri sayısını yaklaşık eşit olduğu gözlenmiştir(33).

Webb de yaptığı bir çalışmada mikrodalga ısınlamasında (56, 71 ve 73 GHz) sonra 5 dk aralıklarla ölçüm yapıldığında hücrelerin büyümesinin azaldığı ve protein sentezi ile DNA sentezinin azaldığı fakat 71 ve 129 GHz arasındaki frekanslarda RNA sentezinin arttığını bildirmiştir(34).

Dreyfuss ve arkadaşları tarafından *Staphylococcus aureus* hücreleri üzerine öldürücü mikrodalga ısınlamasının bir kısmını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır(35). Bu çalışmada kültürler 10, 20, 30 ve 40 sn' ye süre ile mikrodalga radyasyonuna bırakılmış ve geliş güzel ısıtma uygulamasının etkileri, mikrodalga ısınlamasına maruz bırakılan kültürlerde bulunana eşdeğer sıcaklığa ulaşmak için gereken sürede, kültür içeren şişeler bir kaynar su banyosuna konularak karşılaştırılmıştır. Kontrol, mikrodalga uygulaması yapılan ve geliş güzel ısıtma ile uygulama yapılan kültürler santrifüslenmiş pelletler distile suda yeniden süspanse edilmiş ve sonuçta elde edilen süspanسیونlar bir Fran-

sız basınç hücrelerinden geçirilmiştir. Hücre lizatları ve duvarları daha sonra izole edilerek enzimatik aktivite ihtiva çalışmaları yapılmıştır. Malat, α - Ketoglutarat dehidrogenaz, sitokrom oksidaz ve stoplazmik adenozin trifosfataz aktivitesi mikrodalga uygulaması yapılan hücrelerde, kontrol hücrelerinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Hücreler mikrodalga ışınlamasına maruz bırakıldıklarında membran adenozin trifosfataz alkalın fosfataz ve laktat dehidrogenaz aktivitelerinin mikrodalga ışınlamasına tabii tutulan hücrelerde düştüğünü gözlemişlerdir.

Gelişi güzel ısıtılan hücrelerde, Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz malat dehidrojenaz ve stoplazmik adenozin trifosfat aktivitelerinin yükseldiğini, α -Ketoglutarat ve laktat dehidrojenaz aktivitelerinin düştüğünü, Alkolün fosfataz aktivitesinin ise etkilenmediğini tayin etmişlerdir. Hücreler 10 ve 20 sn mikrodalga ışınlamasına maruz bırakıldıklarında, termonükleaz aktivitesinin düzeyinde artış gözlemlendiği belirtmektedir. sonuçta mikrodalga S.aureus'a etki etmekte, ancak bu sadece termal etkiyle olmamaktaydı.

Mikroorganizmaların ölüm nedeninin mikrodalga radrasyonu tarafından meydana getirilen ısı mı yoksa mikrodalga radrasyonumu bu konuda önemli anlaşmazlıklar vardır. Mikrodalga radrasyonuna tabii tutulan mikroorganizmaların, termal ölüm noktasına ulaşıldığında üremelerinde azalmalar görülmüştür (36).

Bir çok araştırıcı tarafından, mikrodalga radrasyonunun etkisinin termal olduğu tespit edilmiştir (30,36,37,38). Özet olarak, mikrodalga radrasyonu ile ilgili mikrobiyolojik çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Termal etkilerden mikrodalga etkilerinin ayırd etme yetersizliği.
2. Sıcaklık ne olursa olsun mikrodalga etkilerinin ispat edilememesi.
3. Mikrodalga ile termal ve termal olmayan etkilerin gözleme güclüğü(39).

1. 3. ÇALIŞMANIN AMACI

Mikrodalğanın termal olmayan etkileri sonucu, mütajenez (Dokularda mutasyon yapısı), Kataraktogenez (gözde perde yapısı), Tetratogenez (Anormal çocuk doğuşuna yol açısı), Davranış bozuklukları, Nöro-endokrin ve hormonal değişiklikler, prenatal beyinde gelişme geriligi, Kanbeyin bariyerinde düşüş, Hemopoetik sistem değişiklikleri (Fe metabolizma bozuklukları), Kromozomal anormali gibi rahatsızlıkların ortaya çıkabileceği yaklaşık 40 yıldır bilinmekte ve bu konuda bazı araştırmalar yapılmaktadır. Tablonun korkunç olması ve bu hastalıkların mikrodalga risk grubu içindeki insanlarda görülmesi bizi bu çalışmaya yöneltmiştir.

Çalışmalarımızın amacını, literatür bilgisi ışığında mikrodalğanın örnek olarak seçilen termotoleran *B.subtilis* ile mezofil *E.coli* K₁₂ suşu üzerindeki etkisini çözünür plazma protein miktarları ve elektroforez profillerinin incelenmesi oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. BİYOLOJİK MATERYAL

Çalışmalarımızda Çermik Belkışhatun termal kaplıcası kapotaj havuzundan soyutlayarak teşhis ettiğimiz B. subtilis (40,41) ve Ankara Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilen E.coli K12 suşu kullanıldı. B. subtilis'in teşhis işlemlerinde uygulanan testler aşağıda verilmiştir.

2.1.1 Bakteri hücrelerinin ölçülmesi

Mikroskopta inceleyeceğimiz canlı veya cansız maddenin boyutlarını almak mümkündür. Bu işlem için objektif mikrometresi ve oküller mikrometresi kullanılır. Oküller mikrometresinde 5 mm lik bir uzunluk elliye bölünmüş olup, oküller içine yerleştirilir. Oküller mikrometrenin taksimat değeri mikroskopun kullanılan büyütmesine göre değiştiği için, kullanılacak objektif mikrometre taksimatlarına göre hesaplamalar yapılır. Objektif mikrometresinde genellikle 1 mm yüze bölünmüştür. Yani her bir aralık 1/100 mm dir. Önce bir objektif mikrometre taksimatının kaç oküller mikrometre taksimatına karşılık olduğu bulunur. Bundan yararlanarak da oküller mikrometresinde bakterinin boyutları tayin edilir(41).

2.1.2. Gram reaksiyon

Steril öze ile alınan bakteri örneği bir damla steril fizyolojik serum ile lamın üzerinde iyice yayılır. Havada kurutulup, alev ile tespit edilir. Daha sonra jansiyon moru (2 dk süre ile) bırakılır. Çeşme suyu ile yıkanır, 1 dk süre lugol bırakılır. Çeşme suyu ile yıkanır. Etil alkol (1/2 dk süre

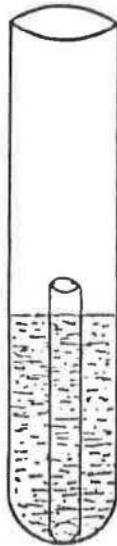
ile) bırakılır. Saf su ile yıkanır ve havada kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra mikroskopta preparat incelenir. Gram(+) bakteriler mor, Gram(-) bakteriler ise pembe boyanır(41).

2.1.3. Hemoliz

Kanlı besiyerine yapılan ekimin 37°C'de 18.saatlik inkübasyondan sonra üremenin olduğu bölgelerde kanın kırmızı renginin sarıya dönüşmesi halinde hemoliz pozitif, kanın rengi değişmez ise hemoliz negatiftir(41).

2.1.4. Hareket

Belli bir düzeye kadar hareket besiyeri ile doldurulmuş bir tüp içerisinde daha küçük çaplı bir cam boru yerleştirilir. Bir iğne öze ile dikkatli bir şekilde cam borunun içindeki besiyerine ekim yapılarak 37°C de 18 saatlik inkübasyona bırakılır. Cam borunun dışındaki besiyerinde üremenin olması üzerinde çalışılan mikroorganizmanın üremenin olması üzerinde çalışılan mikroorganizmanın hareketli olduğunu gösterir ve test pozitifdir denir. Şekil (2.1).(41).



Şekil (2.1);Hareket besiyeri için tüp.

2.1.5. Spor oluşturma

Bakteri önce katı Nutrient Broth besiyerinde maksimum üreme sıcaklığının 3-5°C üzerinde üretilir. 2 gün inkübasyondan sonra optimal üreme sıcaklığına getirilir. Eger bakteri rerse spor oluşturuyor, remezse spor oluşturmuyor denir(41).

2.1.6. Nişasta hidrolizi

Nişasta katkılı katı NB besiyerine ekim yapılır. 37°C'de 3 gün inkibasyondan sonra, besiyerine gramın iyot zeltisi katılır, 2 dakika bekletilir. Iyot nişasta ile mavi bir renk verir, Ancak bakteri amilaz enzimi salgılıyorsa nişasta maltoz ve glikoza hidrolizleneceğinden mavi renk oluşmayacaktır(41,42).

2.1.7. Kazein hidrolizi

Kazein katkılı NB besiyerine ekim yapılır. 37°C'de 3 günlük inkübasyondan sonra besiyerine %1'lik HCl katılır. 5 dakika bekletilir. Daha sonra HCl dökülür. Işıklı bir sahada inceleme yapılır. Eger kazein peptitlere veya kazeinazın etkisiyle hidrolizlenmişse kültürün çevresinde aydınlık bir bölge görülecektir. Hidrolizlenmemiş bölge çöktürülen proteinlerden dolayı donuk olacaktır(42).

2.1.8. Jelatin Hidrolizi

Jelatin katkılı NB besiyerine ekim yapılır. 37°C'de 3 günlük inkübasyondan sonra besiyerine HCl. HgCl₂(5 dk) katılır. Daha sonra reaktif dökülür. Bakteri jelatinaz salgılamış ise kültür beyazımsı bir renk alır. Donuk bir renk görülürse jelatinaz salgılanmadığının bir göstergesidir(42).

2.1.9. Katalaz Üretimi

%3'lük H_2O_2 katkılı Nutrient agara ekim yapıp, $37^\circ C$ de 3 günlük inkübasyon sonunda eğer mikroorganizma H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalayan katalaz enzimi salgılıyor ise besiyerinde hava kabarcıklarının oluşmasına neden olacaktır. Bu durumda uygulanan test üzerinde çalışılan mikroorganizma için katalaz pozitif şeklinde değerlendirilir(42).

2.1.10 Lipaz Üretimi

Yağlı agar besiyerine ekim yapılır. $37^\circ C$ 'de 3 günlük inkübasyondan sonra yağlı agar üzerine $CuSO_4$ 'ün sudaki doygun çözeltisi ilave edilir. 15 dk bekletilir. $CuSO_4$ 'tün fazlası dökülür üremenin olduğu bölgenin altında, üstünde ve çevresinde yağ damlaları incelenir. Lipaz enzimi salgılanmış ise yağ damlaları mat yeşilimsi-mavi bir renkte olacaktır(42).

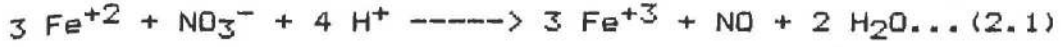
2.1.11. NH_3 Üretimi

Bileşimi ilaveler I'de verilen Amonyum medium(A) besiyerinden steril pipet ile fayans üzerine 1 damla alınır ve yayılır. Aynı işlem ekim yapılmış A besiyeri için yapılır. Daha sonra 2-3 damla Nessler reaktifinden katılır. Kahverenkli çökelti, aşırı miktarda amonyak; Koyu sarı-portakal rengi, önemli miktarda amonyak; Açık sarı renk, az miktarda amonyak; Renksizlik amonyak yokluğunu gösterir(41).

2.1.12. NO_3^- 'I İndirgenme

%1'lik KNO_3 katkılı sıvı NB besiyerine ekim yapıp, $37^\circ C$ de 3 günlük inkübasyona bırakıldıktan sonra, 3-4 damla 0.1 M $FeSO_4$ ilave edilir. Tüpün kenarından da derişik H_2SO_4 konur. Sülfürik

asit tüpün dibinde bir faz oluşturur. Aşağıdaki reaksiyonlara göre iki fazın birleştiği kısımda kahverenkli bir halkanın meydana gelmesi, ortamda NO_3^- iyonlarının varlığının bir göstergesidir.



Çünkü bu durumda mikroorganizma nitrat redüktaz enzimi salgılamamıştır. Aksi halde mikroorganizmanın salgıladığı nitrat redüktaz enzimi nitratın, nitrite indirgenmesini katalizleyeceğinden, ortamdaki nitrat iyonları tükenecek ve yapılan testte iki fazın arasındaki kahverenkli halka gözlenmeyecektir(43).

2.1.13. Tuz Tolerasyonu

NaCl katkısı % 1 ile % 10 arasında değişen bir seri Nutrient Broth besiyerine ekim yapılarak 37°C de 10 saat süre ile inkübasyona bırakılıp bu besiyerindeki üreme durumuna göre üzerinde çalışılan mikroorganizmanın tuz toleransı tayin edilir(41).

2.1.14. Karbohidrat Fermantasyonu

İlaveler-I'de verilen ve farklı karbohidratlar içeren bir seri besiyeri hazırlanarak, ekim yapıldı. 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra bakterinin kullanılan karbohidratları fermente edip edemediği Brom cresol purple indikatörünün pH renk dönüşüm aralığı (5,2-6,8 mordan sarıya) renk değişimine bağlı olarak değerlendirildi(41).

2.1.15. Manitolde Üreme

İçinde Fenol kırmızısı bulunan manitol agar besiyerine ekim yapıldı. 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra, indikatörün

renk değişimine bağlı olarak üremenin olup olmadığına karar verilir(41).

2.1.16. Sitratlı besiyerinde üreme

Sodyum sitrat katkılı katı NB besiyerine ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinde üremenin olup olmadığı kontrol edildi(42).

2.1.16 Anaerobik koşullarda üreme

Glikoz katkılı katı NB besiyerine ekim yapıldı. Ekim yapılmış petri kutusu, içinde oksijeni alabilecek gas üretme kiti bulunan anaerobik jar içine yerleştirildi. 37°C de 2 günlük inkübasyondan sonra besiyerindeki üreme durumu kontrol edildi(41).

2.1.17 Sodyum Asid Formu

Sodyum azid yaşamsal üremeye sahip bir çok enzim için inhibitör. Ancak sodyum azid'in yapısını bozabilen enzim salgılayan mikroorganizmalar bu maddeyi içeren besiyerinde üriyebilirler. Bu kontrolü yapmak için %0.02 lik sodyum azid katkılı katı NB besiyerine ekim yapıldı. 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerindeki üremeye bakıldı(41).

2.1.18. Saburo dekstroзда üreme

Glikozca zengin bir besiyeri olan saburo dekstroza ekim yapıldı. 37°C de 18 saatlik inkübasyondan sonra üreme kontrol edildi(41).

2.1.19. Litmusu indirgeme

Litmuslu süt besiyerine ekim yapıldı. 37°C de 3 günlük inkübasyondan sonra, kabarcıkların varlığı gaz oluşumunu gösterir, Litmusun renginin kırmızıya dönüşmesi mikroorganizmanın

asit ürettiğini gösterir. Sütün bir kısmının beraklaşıp sulanması kazeinin hidrolizini gösterir, Litmusun renginin koyu maviye dönüşmesi alkali üretimini, Litmusun renksizleşmesi indirgenmesinin bir göstergesidir(41).

2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Elektroforez için kullanılan kimyasal maddeler ; Akrilamid , N-N¹-Metilenbis akrilamid , TRIS - Hydroxymetilamino metan , TEMED (N-N-N¹-N¹- Tetrametiletilen diamin) , Amonyum persülfat , SDS (Sodyum dodesil sülfat) , MET (2-Merkapto etanol) , Comanssie Brilant Blue - R 250 , Brom Fenol Blue , Standart proteinler (α - Lakt albümin , Tripsin inhibütör , Tripsinojen , Karbonik Anhidraz , Gliseraldehit 3-Fosfat dehidrojenaz , yumurta albümini , sığır albümini) sigma Chemical Co ., St louis'ten , Na₂HPO₄.7H₂O , NaH₂PO₄.2H₂O , Na-K tartarat , CuSO₄.5H₂O , Gliserin , Na₂CO₃ Merck Darmstad'tan , Nutrient Broth (NB) ve Bacto Agar ise Difco Laboratories'den ticari olarak temin edilmiştir .

2.3. KULLANILAN ALETLER

Elektroforez aygıtı (Gelman Gelcell , Gel Column) , Elektroforez güç kaynağı (Gelman Deluxe Regulated power supply) , santrifüj (Hettich EBA -III) , spektrofotometre (U.V-160 shimatzu U.V-visible Recording spektrofotometre) , Mikrodalga Fırın (2450 MHZ frekanslı , Dokunmatik Vestel-V-8505 T) , Homojenizatör (Ultra tip Lab line wave , Energy systems) , U.V-Lambası , jel tüpleri , Etüv (nüve EN 400) , Otoklav , Termoçift (Ni-Cr/Ni alaşımlı) , Mikroskop (olmpus) .

2.4 ELEKTROFOREZ İŞLEMİ

Bir proteinin taşıdığı net elektrik yükü yapısındaki alt birimlerin (aminoasit atıklarının) taşıdığı pozitif ve negatif yüklerin cebirsel toplamına eşittir .

Bir makromolekülün net elektrik yükü varsa , bu makromolekül yükünün işareti ve büyüklüğüne göre elektrik alanda hareket eder . İşte bu özelliği kullanan metoda elektroforez denir . Diğer bir deyişle elektroforez, partiküllerin elektriksel alanda taşınması olayıdır . Bu olayın matematiksel analizini yapmak oldukça zordur . Çünkü ortamda bulunan diğer iyonlar lokal elektriksel alanı etkilediği gibi makromoleküller de kendi aralarında etkileşirler . Bu yüzden problemi basitleştirip , izole edilmiş küresel yüklü tek bir partikülün yalıtkan ve vizkoz bir ortamdaki hareketi incelenir .

Yüklü bir partiküle , bir elektrik alanda etkiyen kuvvet coulomb kanuna göre ,

$$F = Z \cdot e \cdot E \dots\dots\dots (2.3)$$

dir. Burada ; Z : elektron sayısı (yük sayısı) e : elektron yükü , E : Elektrik alan şiddetidir.

Diğer taraftan Stokes yasasına göre sonsuz vizkoz bir sıvıda r yarıçaplı bir küreye etki eden F kuvveti ,

$$F = 6 \pi \eta r v \dots\dots\dots (2.4)$$

bağıntısıyla verilir. Burada ; η :Vizkoziteyi, r:yarıçapı, v:Hacmi göstermektedir. (2.3) ve (2.4) bağıntılarından

$$Z \cdot e \cdot E = 6 \pi \eta r v \dots\dots\dots (2.5)$$

Bu denklem,

$$\frac{V}{E} = \frac{Ze}{6\pi\eta r} \dots\dots\dots (2.6)$$

şeklinde yazılabilir. $\frac{V}{E}$ birimi elektrik alan şiddeti için hızı,

yani mobiliyeti (η) ile ifade edilir.

0 halde $\eta = \frac{V}{E} \dots\dots\dots (2.7)$

$$\eta = \frac{Ze}{6\pi\eta r} \dots\dots\dots (2.8)$$

elde edilir.

(2.8) denklemi, partikül mobilitesinin, partikülün yüklü ile doğru, büyüklüğü ve ortamın vizkozitesi ile ters orantılı olduğunu ifade etmektedir. Fakat gerçek bir hareket denklemi olmaktan çok uzaktır. Daha yaklaşımlı denklemler türetilebilir, ancak bunlar da tam olarak elektroforetik mobilitayı göstermez. Bu yüzden elektroforez metodu mükemmel bir ayırma metodu olmamakla beraber makromolekül sel yapı hakkında pek bilgi vermez.

Kullanılan ayırma ortamının cinsine göre çeşitli elektroforez teknikleri vardır. Bunlar arasında kâğıt, nişasta, Agar ve poliakrilamid jel elektroforezleri sayılabilir. Bunlardan poliakrilamid jel elektroforezi ayırma gücü bakımından diğerlerinden çok üstündür.

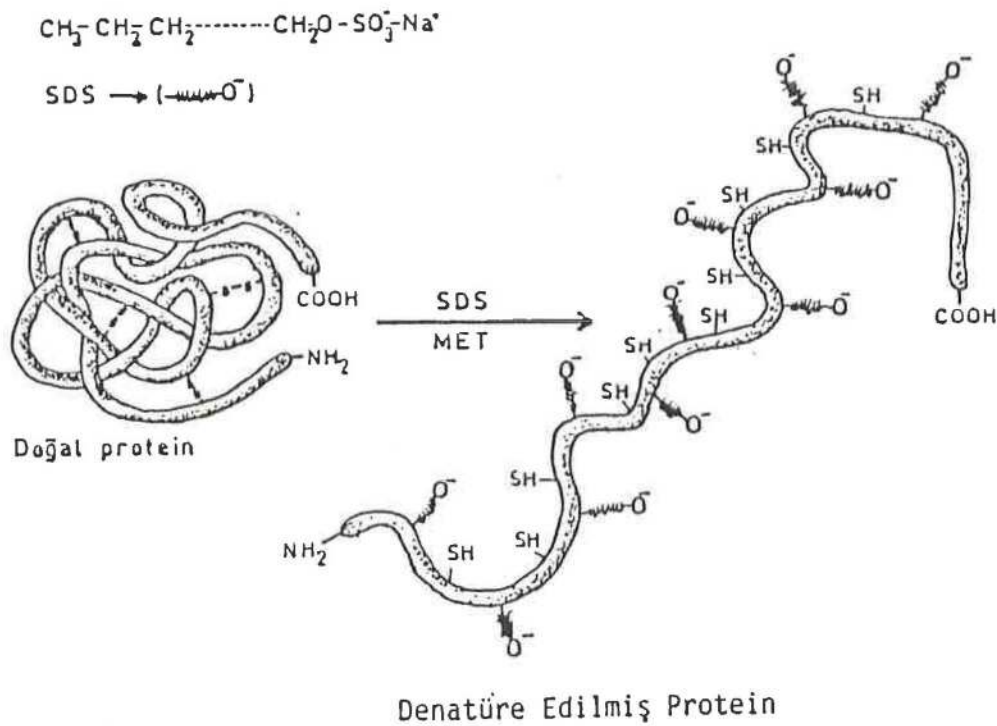
Poliakrilamid jel Elektroforezi (PAGE)'nin ayırma gücü makromoleküllerin molekül ağırlıklarının tayininde hassasiyetle kullanılabilir. Doğru molekül ağırlıklarının bulunabilmesi için mak-

makromoleküller arasındaki elektriksel yük farkını ortadan kaldırmak ve bunları denatüre etmek gerekir. Böylece ayrılmanın yalnızca molekül ağırlığına göre olması sağlanır. Bunun için ortama uygun konsantrasyonlarda sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 2-Merkapto etanol (MET) ilave edilir. SDS bir yağ asididir. Nonpolar özellikteki alifatik zincirinin polar ucunda hidrofilik karakterde negatif yüklü bir sülfat grubu $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10} \text{O SO}_3^- \text{Na}^+]$ taşır. MET ($\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$) ise S-S köprüleri ile özgül olarak etkileşerek onları indirgeyen bir maddedir.

Sekil (2.1)'de görüldüğü gibi, makromolekülün S-S köprüleri MET tarafından indirgenirken, SDS'nin bağlanmasıyla makromolekülün hidrofobik ve hidrojen bağları kırılır. Böylece Quarterner, tersiyer ve sekonder yapısını yitiren makromolekül, hidrofobik bölgelerine bağlı SDS'nin sülfat grubu vasıtasıyla negatif yüklü bir örtü ile sarılmış olur. Bu durumdaki makromoleküllerin kendilerine özgü net yüklerinin bir anlamı kalmaz, hepsi anyon olarak hareket ederler.

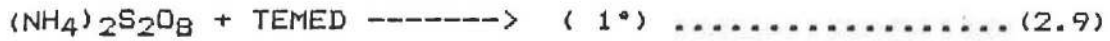
Poliakrilamid jeli, monomer akrilamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$)'nin bir bağlayıcı genellikle N-N¹-Metilenbis akrilamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) ile polimerize edilmesiyle oluşturulur. Böylece rastgele büyüyen poliakrilamid zincirlerinden üç boyutlu bir ağ meydana gelir. Kullanılan akrilamidin ve bağlayıcının konsantrasyonu oluşacak jelin yoğunluğunu, viskozitesini, elastikliğini ve mekanik dayanıklılığını belirler. Bu konsantrasyonların artırılmasıyla oluşan ağın sıklığı artar, gözenek çapı azalır. Böylece içinden yürüyecek makromoleküllerin

hareketi kendi büyüklüklerine (mol ağırlıklarına) göre sıralanmış olur. Akrilamid ve bis-akrilamid için genellikle kullanılan konsantrasyonlar incelenerek makromoleküllerin büyüklüğüne göre, akrilamid miktarının bis-akrilamid miktarına oranı 10 ile 100 arasında ve akrilamid konsantrasyonu % 5'ten büyük seçilir.

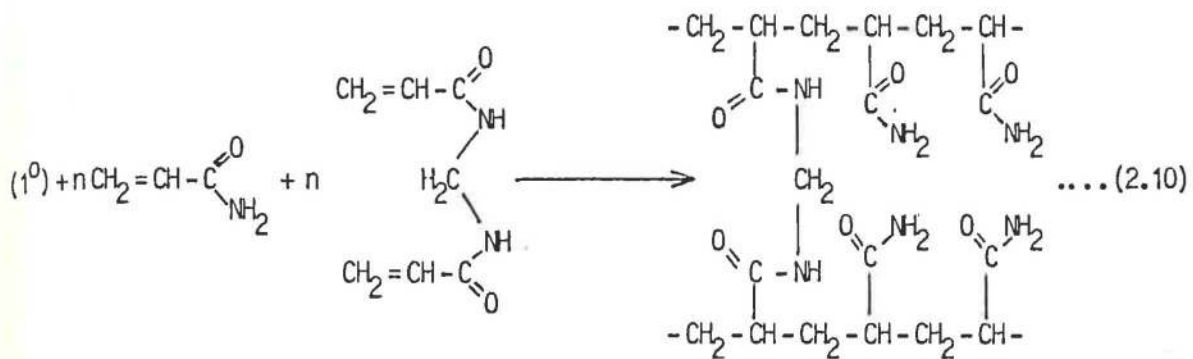


Sekil (2.1) Doğal proteinin SDS ve MET tarafından denatüre edilmesi.

Akrilamidin bis-akrilamid vasıtasıyla polimerizasyonuna katalizlemek için genellikle Amonyum persülfat ve Temed (N-N-N¹-N¹ tetra metilenetilen diamin) kullanılır (44).



Amonyum N,N,N¹,N¹-tetra Serbest redikal
persülfat metiletilendiamin



2.4.1. Jel Tüplerinde jellerin hazırlanması

Temizlenmiş ve etüvde kurutulmuş jel tüpleri (80 x 5 mm) alt tarafları parafilm ile kapatılarak jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Jelleşmenin daha verimli olması için hazırlanan bu düzenek kullanılacak ana kadar buzdolabına kaldırıldı. Bu sırada jel çözeltisi stok çözeltilerin aşağıdaki oranlarda karıştırılmasıyla hazırlandı.

Jel çözeltisi

15 ml A Tamponu

13.5 ml B Çözeltisi

1.5 ml D Tamponu

45 ml TEMED.

2.4.2. Çözeltiler

Çalışmada kullanılan bütün çözeltiler distile suda hazırlanıp, kahverenkli cam şişelerde buzdolabında saklandı.

A - Tamponu;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 38.6 gr.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.8 gr.

SDS 2 gr.

1 lt saf su

B - Çözeltisi;

5.5 gr Akrilamid

0.15 gr N-N¹-Metiletilen bis-akrilamid

25 ml Saf su

C - Çözeltisi;

375 mg Amonyum persülfat

25 ml Saf su

D - Tamponu;

A-Tamponun 1:1 oranında saf su ile seyretilmesi ile hazırlandı.

Boyama Çözeltisi

125 mg Comanssie Brilliant Blue R-250

45.4 ml % 50 Metanol

4.6 ml Glasiyel asetik asit

Boya çıkarma Çözeltisi

75 ml Glasiyel asetik asit

50 ml Metanol

875 ml Saf su

2.4.3. Elektroforez işlemi

B. subtilis ve E.coli K₁₂ süşunun çözünür proteinlerin elektroforez profilleri Weber ve Osborn yöntemiyle elde edildi(45). Öngürülen şekilde hazırlanan jel çözeltisi ile buzdolabından çıkarılan jel tüplerine önce bir kez çalkaladıktan sonra her jel tüpünün 6 cm'lik bölümü bu çözelti ile dolduruldu . Bu çözeltinin üzerine ince uçlu bir pastör pipetiyle tüpün bir kenarından damla damla su akıtılarak çözeltinin hava ile temasını kesmek üzere 4-5 mm'lik bir su tabakası oluşturuldu. Yaklaşık 45 dk süreyle U.V lambasından 3-5 cm uzaklıkta fotopolimerizasyona bırakıldı. Fotopolimerizasyon tamamlandıktan sonra jelin üstündeki su dikkatlice absorban kâğıt yardımıyla alındı.

2.4.4. Jellerin üzerine çözünür protein örneklerinin uygulanması

Hazırlanan jellerden birine molekül ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisinden , diğerlerine farklı dozlarda mikrodalga uygulayarak üretilen bakteri homojenizatındaki

çözünür proteinlerin eşit miktarları verildi. Her bir jel için 8 mA'lık bir akım uygulandı. Çeşitli zaman aralıklarıyla Brom fenol Blue boyasının ilerleyişi kontrol edilerek , elektroforez işleminin ilerleyişi sürekli izlendi. Brom fenol jel tüpünün alt kısmına 2 mm yaklaşıncaya akım kesildi. Jel tüpleri aygıttan çıkarıldı. Jellerin tüplerden çıkarılması işlemi , bir enjektörle jel ile jel tüpü arasına su sıkılarak yapıldı.

2.4.5. Protein Bantlarının Tespit Edilmesi ve Boyanması

Daha önceden hazırlanan Comanssie Brilant Blue R-250 çözeltisi hem elektroforez işleminde işaret boya olarak hem de proteinlerin boyanarak tespit edilmesinde kullanıldı. Jeller bu boya içerisinde 30 dk tutularak boyama ve tespit işlemi gerçekleştirildi. Bu sırada jeller tamamı ile boyandığı için fazla boyanın çıkarılması gerekir. Bunun için , jeller boya çıkarma çözeltisinde 1-2 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda protein bantları gözle görülür duruma getirildi.

2.5.BAKTERİLERE LAM ÜZERİNDE YAPILAN MİKRODALGA UYGULAMASI

Nutrient Broth(NB) katı besiyerine ekim yapıldı. 4 saat inkübasyondan sonra her bir doz için bir öze dolusu bakteri bir lam üzerine yayılarak mikrodalga radyasyonuna (55,110,165,220,275 ve 330W, 15 sn süre) tabii tutuldu. Radyasyona tabi tutulan bakterilerden daha sonra tekrar besiyerine ekim yapıldı. 37°C de 18 saat inkübasyondan sonra tekrar her bir doz ve kontrol için eşit miktarda bakteri alınarak 10 ml'lik Nutrient Broth

sıvı besiyerine ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra bakteri sayımı yapıldı. Bakteri sayımından sonra sıvı besiyerindeki bakteriler 5000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüjlendi. Bakteriler 1 ml'lik 0.05 M Tris-Base, Tris-HCl $pH=7.5$ tamponu içine alınarak çalışıncaya kadar $-20^{\circ}C$ de saklandı.

2.6. BAKTERİLERİN ÜRETİLMESİ VE MİKRODALGA UYGULAMASI

2.6.1. Bakterilerin Üretilmesi ve I.Mikrodalga Uygulaması

Büyüme ortamı olarak seçilen Nutrient Broth sıvı besiyerinin 10'ar ml'sine *B. subtilis* ve *E.coli* K₁₂ suşunun saf kültürlerinden aşılama yapılarak $37^{\circ}C$ de bir gece inkübe edildi. Sıvı besiyerinden alınan örnekler kontrol ve farklı düzeylerde doz uygulanacak bakteriler petri kutularına ekim yapıldı. 4 saat inkübasyondan sonra 55,110,165,22,275 ve 330 Watt lık mikrodalga radyasyonuna 15 sn süre ile tabii tutuldu. $37^{\circ}C$ de 18 saat inkübasyondan sonra kontrol ve doz uygulanan bakterilerden aynı optik yoğunluğa sahip çözeltilerden 0.1 ml alınarak 10 ml'lik sıvı besiyerine ekim yapıldı. Bakteri sayımı yapıldıktan sonra sıvı besiyerindeki bakteriler 5000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüjlendi. Bakteriler 1 ml'lik 0.05 M Tris-Base, Tris-HCl $pH=7.5$ tamponu içine alınıp çalışıncaya kadar $-20^{\circ}C$ de saklandı.

2.6.2. Bakterilere II.Mikrodalga Uygulaması

Daha sonra bir defa mikrodalga uygulanmış bakterilerden eşit hacimde bakteri alınarak petri kutularına ekim yapıldı. $37^{\circ}C$ de 4 saat inkübasyondan sonra bakteriler bir defa daha aynı

dozlarda ve aynı süre ile mikrodalga radrasyonuna tabi tutuldu. 37°C de de 18 saat ünkübasyondan sonra kontrol ve doz kontrol ve doz uygulanan bakterilerden eşit hacimde bakteri alınarak 10 ml'lik sıvı besiyerine ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra bakteri sayımı yapıldı. Bakteri sayımı yapıldıktan sonra sıvı besiyerindeki bakteriler 5000 rpm de 15 dk süre ile santrifüzlendi. Bakteriler 1 ml'lik 0.05 M Tris-base , Tris-HCl pH=7.5 tamponu içine alınıp çalışıncaya kadar -20°C de saklandı.

2.7. BAKTERİ SAYIMI

Her sıvı besiyerinde ulaşılan bakteri sayısı uygun seyreltmeler yapılarak katı besiyerinde yapılan ekim sonucu üretilen koloni sayısı saptanarak tayin edildi. Bunun için sıvı besiyerinde 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra; 1/10.000, 1/100.000 , 1/1.10⁶'lık seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltmeden sonra belli bir hacim (0.1 ml) katı besiyerine ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra en az hata ile saptanabilir koloni elde edilen seyreltmedeki bakteri sayısı tayin edildi. Buradan da ;

$$N = \frac{1}{V} \cdot X \cdot D \dots\dots\dots (2.11)$$

formülünden (42) ana sıvı besiyerindeki bakteri sayısı saptandı.

Burada ; N=Orjinal süspansiyonun ml'sindeki bakteri sayısı.

V=Petri kutularına ekilen inokulun miktarı (0.1 ml veya 0.05 ml)

X=Ortalama mikrop sayısı

D=Seyreltmenin oranı

2.8. BAKTERİLERİN PARÇALAMA İŞLEMİ

1 ml 0.05 M Tris-Hidrokimetilamino metan, Tris-HCl pH=7.5 tamponu içine alınan bakteriler Ultrasonik homojenizatörde (10KHz,100W)10 dk süre ile buz içinde parçalama işlemine tabii tutuldu(46). Bu işlemden sonra +4°C de 5000 rpm de 45 dk santrifüjleme işlemi yapılarak süpernatantlar ayrı tüplere alınıp kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı.

2.9 ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTAR TAYİNLERİ

Çözünür protein miktar tayinleri Lowry yöntemine göre (47) spektrofotometrik olarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Bakterinin Teşhis Edilmesi:

Çermik Belkışhatun termal kaplıca kapotaj havuzundan getirilen ve 2 saat süre ile 2500 rpm'de santrifüjlenen su örneğinin sedimentinden Nutrient Broth besiyerine ekim yapıldı. Kaplıca suyunun pH 'sı 7.3 olduğundan besiyerinin pH 'sı bu pH 'ya ayarlandı.

Kaplıcadan alınan su örneği florası içerisinde zenginleştirilen ve çok sayıda inokülasyon ve tek koloni düşürme tekniği ile soyutlanan bakteriye, uygulanan biyokimyasal testler sonucu, Bergey's Manual of Determinative Bacterology'e göre *B. subtilis* olduğu anlaşıldı (40,41). Uygulanan testler ve elde edilen sonuçlar çizelge 3.1 de verilmiştir. *B. subtilis*in mikroskopta (1360 kez büyütülmüş) görüntüsü resim 3.1 de verilmiştir.

3.2. BAKTERİ SAYIMI :

Sıvı besiyerindeki canlı bakteri sayısı, bu besiyerinde yeterli seyreltmeler yapılarak son seyreltme ile ulaşılan popülasyondan belli miktarda katı besiyerine yapılan ekim sonucu elde edilecek koloni sayısından hesaplandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.2,3.3,3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

3.3 Lam üzerinde yapılan mikrodalga uygulaması sonucu *B.subtilis* ve *E. coli* K₁₂ suşunun çözünür protein miktarları ve Elektroforez Bantları

Lam üzerinde, besiyersiz ortamda mikrodalgaya maruz

bırakılan bakterilerden, üretilen bakterilerin eşit miktarlarının homojenizasyonu sonucu elde edilen süpernatanttaki çözünür protein miktarları çizelge 3.6'da verilmiştir. Bu proteinlerin eşit miktarlarının elektroforez profilleri Resim 3.2.ve 3.3 de gösterilmiştir.

3.4. Besiyerinde Yapılan I.ve II. Mikrodalga Uygulaması Sonucu *B. subtilis* ve *E. coli* K₁₂ suşunun Çözünür Protein Miktarları ve Elektroforez Bantları

Katı besiyerinde 1. ve 2. kez 15'er saniyelik sürelerle belirli dozlarda mikrodalgaya maruz bırakılan bakterilerden sıvı besiyerine yapılan inokülasyonlar sonucu üretilen bakterilerin eşit miktarlarının homojenizasyonu sonucu elde edilen süpernatanttaki çözünür protein miktarları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

B. subtilis ve *E. coli* K₁₂ suşunun her bir mikrodalga uygulama serisi için çözünür proteinlerinin eşit miktarlarının elektroforez bantları Resim 3.4,3.5,3.6 ve 3.7 de gösterilmiştir.

3.5. 20,37 ve 50°C de Üretilen *B. subtilis*'in Çözünür Protein Miktarları ve Elektroforez Bantları

Mikrodalga ile termal etkiyi karşılaştırma amacıyla 20, 37, 50°C 'lerde üretilen eşit sayıda *B. subtilis* çözünür protein miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda üretilen *B. subtilis*'in homojenizasyonu sonucu süpernatantta eşit miktarlardaki proteinlerin elektroforez profilleri Resim 3.8'de gösterilmiştir.

3.6. Termoçift ile Mikrodalga Fırın İçindeki Sıcaklık Ölçümleri
Ni-Cr/Ni alaşımından yapılmış termoçift ile ölçülen mV ve
ona karşılık gelen sıcaklık değerleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI.

Çermik Belkışhatun termal kaplıcası kapotaj havuzundan getirilen su örneği bakteri florası içerisinde zenginleştirerek soyutladığımız bakterinin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'ye (40) göre B.subtilis olduğu saptanmıştır. Çizelge 3. 1.'de verilen denel sonuçlarla referans kaynakta verilen özelliklerin çok az bir kısmı arasında farklılıklar görülmesi soyutlanan bakterinin soyutlandığı çevre koşullarına bağlı olarak alt bir tür düzeyinde değişiklikler gösterebilmesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin, soyutladığımız B.subtilis için Xylos fermentasyon testi negatif sonuçlanmışken bu bakteri için referans kaynakta anılan testin pozitif sonuçlandığı belirtilmiştir. Alt tür düzeyinde teşhis yapmak için genetik materyal DNA'nın en azından baz kompozisyonu açısından incelenmesi gerekir.

B.subtilis ve E.coli K₁₂ suşuna lam üzerinde besiyersiz ortamda uygulanan mikrodalga sonucu, çizelge 3. 6.'da görüldüğü gibi çözünür protein miktarlarının uygulanan doza bağlı olarak kontrolle kıyaslandığında önemli miktarda farklılık gözlenmemesi bu bakterilerin kuru ortamda mikrodalgadan etkilemediğini düşündürmektedir. Resim 3. 2. ve 3. 3'te görüldüğü gibi bakterilerin çözünür proteinlerinin elektroforez bantları da

bunu destekler niteliktedir. Elektroforez profillerinde, jellerin polimerleştirilmesi sabit koşullarda yapılmasına karşın bütün tüplerde ideal homojen polimerizasyon sağlanmadığından jelin boyasını bırakmasındaki farklılıklar nedeniyle yanıltıcı koyuluklar görülmektedir. Bu durum besiyersiz ortamda yapılan çalışmalarla elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir (26, 27, 28, 30, 32). Çünkü mikrodalga'nın termal etkiyi gösterebilmesi için ortamda bulunan iyonların hızlandırılmaları ve birim zamanda çarpışma sayılarının artırılmış olması veya dipol yapıdaki bileşiklerin alternatif alanda hızlı dönme hareketleri yapmaları gerekir ya da mutajenik etki için risk faktörü olarak öngörülen radikaller mikrodalga etkisiyle ancak besiyerli ortamda meydana gelmektedir.

Farklı dozlarda mikrodalga uygulanan hem *B. subtilis* hem de *E. coli* K₁₂ suşunun çözünür protein miktarları kontrolle kıyaslandığında, uygulanan mikrodalga dozuyla paralellik içinde olmayan düzensiz değişiklikler göstermektedir. Bunun nedeni, mikrodalga uygulandığı esnada mikrodalga fırın içerisinde çok kısa süreli olsa da anormal ısı değişimi sonucu termal etkideki farklılıklar olabilir (Çizelge 3.9). Bu sonucun bir diğer nedenide mikrodalga uygulanma esnasında bakterilerin farklı bölünme evrelerinde olması gerekçe olarak gösterilebilir. *B. subtilis* için 220, 275 ve 330 Watt'lık mikrodalga uygulaması ile, *E. coli* K₁₂ suşu için 165 Watt'lık uygulamadan itibaren protein miktarlarındaki düzensiz değişikliklerin paragraflık başında verdiğimiz fikirlerle açıklanabileceği kanısındayız.

Protein miktarlarındaki düzensiz artışlar *B. subtilis*'e nazaran *E. coli*'de daha fazla olmaktadır. Bu olgu *B. subtilis*'in termotoleran bir bakteri olması nedeniyle koşullarına adaptasyonundan dolayı termal etkiden etkilenme olasılığı daha zayıf olmaktadır. Bu sonuç Dalaney ve arkadaşlarının, *Aspergillus niger* ve *B. stearothermophilus* üzerine yaptıkları çalışmayla uyum içindedir(31). 1.Mikroalga uygulaması ile *B. subtilis* ve *E. coli* K12 süşunun kendi içinde eşit sayıda bakteri hücrelerinde protein miktarı 165 watta kadar artma göstermektedir. Bu sonuç şu şekilde açıklanabilir. Mikroalga uygulaması ile protein sentezinden sorumlu yapısal genlerin aktivitelerini düzenleyen represörün (baskılayıcının) sentezinden sorumlu gende bir mutasyon meydana gelmekte ve sentezlenen represör operatöre bağlanamadığından yaşamsal öneme sahip olmaması koşulu ile ihtiyacı fazla protein sentezlenebilmektedir. veya represörün aktivitesini kontrol eden bir indikatörün represörle kompleksleşerek onu inaktif hale getirmesi sonucu represör, operatöre bağlanamamakta ve yapısal genlerin kontrolsüz bir biçimde çalışması sonucu protein sentezinde bir artış gözlenebilmektedir. Özet olarak indikatör, represör ve operatör arasındaki dengenin mikroalga etkisiyle bozulduğu kanısını uyandırmaktadır (48, 49, 50). Mikroalga uygulamasından sonra bizim ürettiğimiz bakterilerde böyle bir mutasyonun mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü yaşamsal öneme sahip proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin yapısında anlamlı bir mutasyonun meydana gelmesi yaşamın devamını olanaksız kılar.

Mikrodalga uygulama ile eşit sayıdaki bakterinin içerdigi protein miktarındaki azalma yapısal genlerin birleştiği yerde bir nokta mutasyonunun gelmiş olabileceğini sezindirmektedir. Böylelikle ardışık genlerin kodladığı küçük moleküllu proteinler yerine, daha büyük moleküller sentezlenmekte bunun sonucunda uygulanan protein test yönteminde absorpsiyonda bir azalma meydana gelmektedir.

Protein miktar analizleri ve elektroforez bant profillerinden mikrodalga uygulanmış *B.subtilis* ve *E.coli* Kız suşuna ikinci kez aynı dozlarda ve sürede mikrodalga uygulanmasının yukarda açıklanan, nisbeten şiddeti azalmış etkilere neden olduğu kanısındayız. Birinci ve ikinci mikrodalga sonucu kantitatif protein tayininde gözlenen farklılıklara ilişkin yapılan yorumlar ile Resim 3. 4. , 3. 5. , 3. 6. ve 3. 7.'de görülen elektroforez profilleri uyum içerisindedir. Elektroforez bantlarının incelenmesinden mikrodalğanın termal olmayan etkilerde bulunduğu anlaşılır. Mikrodalga uygulanmış hücre homojenizatlarının elektroforez profillerinde, 20, 37 ve 50 °C'de üretilen bakterilerin homojenizatının elektroforez profillerinde görülmeyen küçük molekül ağırlıklı protein bantlarının varlığı bu sonuca götürecektir yeterli kanıt olabilir.

Termal etkinin *B.subtilis*'in çözünür proteinleri üzerindeki etkisini incelemek üzere farklı sıcaklıklarda yapılan inkübasyonlar ve bu sıcaklıklarda üretilen eşit sayıdaki bakterinin çözünür protein içeriği çizelge 3. 8.'de verilmiştir. 20°C'de üretilen bakterinin protein içeriğinin 37 ve 57°C'de

retilenlerinkinden düşük olduğu görülmektedir. Bizce bunun nedeni 20°C'de üretilen bakterilerin metabolik faaliyetler sonrası açığa çıkan enerjinin büyük bir kısmını yaşamsal öneme sahip proteinlerin sentezlemede kullanmasıdır. 37°C ve 50°C lerde üretilen bakterilerin çözünür protein içeriği birbirine eşit kabul edilebilir, aradaki küçük fark deney hatası veya daha çok bakteri süspansiyonunda l bakteri sayısındaki farktan kaynaklanabilir. Elektroforez profillerinde de 20°C'de üretilen bakteriler için elde edilen protein bantlarının sayısının 37°C ve 50°C lerde üretilenler için elde edilenlerinkinden daha az olması yukarıdaki yorumumuzu destekler niteliktedir. (Resim 3. 8.).

Tartışmalarımızı nükleik asitlerin yapısında meydana gelebilecek değişmeler üzerinde yoğunlaştırmamızın nedeni daha önceki çalışmalarda mikrodalğanın DNA'nın ikili sarmalını açma veya DNA iplikciklerinde kırılmalara neden olabileceği (19, 24) ve mikrodalga uygulanmış bazı enzimlerin aktivitesinde bir değişiklik gözlenmesinden (50, 51) dolayısıdır.

5. ÇİZELGELER VE RESİMLER

Çizelge 3.1. Soyutlanan Bakteri için Uygulanan Biyokimyasal Testler ve Elde Edilen Sonuçların Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ile Karşılaştırılması

YAPILAN TEST	SONUÇ	
	DENEL	Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Büyüme sıcaklık		
Maksimum	45-53.5	45-55
Minimum	5-18.5	5-20
Genişlik, mm	0.4-0.8	0.7-0.8
Uzunluk, mm	2.6-4.2	2-3
Gram reaksiyon	+	+
Hemoliz	+	değişken
Hareket	+	+
Spor oluşturma	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+
Kazein hidrolizi	+	+
Jelatin hidrolizi	+	+
Katalaz üretimi	+	+
Lipaz üretimi	+	Belirtilmemiş
NH ₃ üretimi	+	Belirtilmemiş
NO ₃ indirgeme	+	+
Tuz Tolerasyonu		
%3 NaCl	+	Belirtilmemiş
%7 NaCl	+	+
%10 NaCl	-	Belirtilmemiş
Karbonhidrat fermentasyonu		
Sukroz	+	Belirtilmemiş
Xyloz	-	+
Laktoz	-	Belirtilmemiş
Glukoz	+	+
Manitolda üreme	+	+
Sitratlı besiyerinde üreme	Zayıf	Değişken
Glikozlu Anaerobik agar	+	+
Sabura dextroz	+	+
Sodyum Azid (%0.02)	-	-
Litmusu indirgenme	+	+
Aktif üreme pH'sı	5.3-8.3	5.5-8.5

Çizelge 3. 2. Lam Üzerinde Yapılan Mikrodalga Uygulaması ile B.subtilis ve E.coli'nin Koloni Sayıları ve Ana Besiyerinin Mililitresindeki Bakteri Sayısı.

Uygulanan Güç(Watt) Uygulanan Süre(15 sn)	B.subtilis'in koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^7$	E.coli'nin koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki koloni sayısı ⁸ (tane/ml) $\times 10^8$
KONTROL	240	2,4	25	2,5
55	133	1,33	14	1,4
110	144	1,44	12	1,2
165	215	2,15	15	1,5
220	245	2,45	12	1,2
275	600	6,00	13	1,3
330	323	3,23	14	1,4

Çizelge 3. 3. Besiyerinde Yapılan Mikrodalga Uygulaması ile B.subtilis'in Koloni Sayıları ve Ana Besiyerinin Mililitresindeki Bakteri Sayısı.

Uygulanan Güç(Watt) Uygulanan Süre(15 sn)	B.subtilis'in I. Mikrodalga uygulaması koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^7$	B.subtilis'in II.Mikrodalga uygulaması koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki koloni sayısı ⁷ (tane/ml) $\times 10^7$
KONTROL	393	3,93	393	3,93
55	245	2,4	200	2,00
110	248	2,48	348	3,48
165	438	4,38	215	2,15
220	343	3,43	221	2,21
275	323	3,23	300	3,00
330	340	3,4	325	3,25

Çizelge 3. 4. Besiyerinde Yapılan Mikrodalga Uygulaması ile E.coli'nin Koloni Sayıları ve Ana Besiyerinin Mililitresindeki Bakteri Sayısı.

Uygulanan Güç(Watt) Uygulanan Süre(15 sn)	E. coli'nin I. Mikrodalga uygulaması koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^8$	E. coli'nin II.Mikrodalga uygulaması koloni sayısı	Ana sıvı besiyer- inin ml'sindeki koloni sayısı (tane/ml) $\times 10^8$
KONTROL	40	4	40	4,0
55	32	3,2	61	6,1
110	97	9,7	107	10,7
165	41	4,1	79	7,9
220	55	5,5	60	6,0
275	23	2,33	35	3,5
330	50	5	137	13,7

Çizelge 3. 5. 20, 37 ve 50°C'de Üretilen B.subtilis'in Koloni Sayıları ve Ana Sıvı Besiyerinin Mililitresindeki Bakteri Sayısı.

SICAKLIK (°C)	B.subtilis'in koloni sayısı	Ana sıvı besiyerinin ml sindeki bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^8$
20	310	3,10
37	393	3,93
50	635	6,35

Çizelge 3.6. Lam Üzerinde 15 Saniye ile Farklı Dozlarda Mikrodalga Radrasyonuna Tabii Tutulan B.subtilis ve E.coli Esit Miktardaki Bakteri Sayılarına Bağlı Olarak Çözünür Protein Miktarları.

Uygulanan Güç (Watt) Uygulanan Süre (15 sn)	Protein miktarı (mg/ml)	
	B.subtilis (1.33×10^7 tane/ml)	E.coli (1.2×10^8 tane/ml)
KONTROL	3,00	4,00
55	3,09	3,89
110	2,98	3,95
165	3,01	4,08
220	3,11	4,10
275	2,95	3,78
330	3,02	4,05

Çizelge 3. 7. Nutrient Broth Besiyesinde B.subtilis ve E.coli I. ve II.Mikrodalga Uygulama Sonucu Tayin Edilen Çözünür Protein Miktarları.

Uygulanan Güç (Watt) Uygulanan Süre (15 sn)	Protein Miktarı (mg/ml)			
	B.subtilis I.uygu lama $2,4 \times 10^7$ t./ml	B.subtilis II.uygu lama 2×10^7 t./ml	E.coli I.uygulama $2,3 \times 10^8$ t./ml	E.coli II.uygulama $3,5 \times 10^8$ t./ml
KONTROL	(2.4x10 ⁷ tane/ml) 2,50		(2.3x10 ⁸ tane/ml) 5,50	
55	2,68	2,32	6,90	6,70
110	3,19	2,89	9,50	5,64
165	3,43	2,58	5,48	5,48
220	2,83	2,63	5,71	5,75
275	2,68	2,12	4,43	4,83
330	3,56	3,09	5,69	6,36

Çizelge 3. 8. 20, 37 ve 50°C'de Üretilen B.subtilis'in Çözünür Protein Miktarları

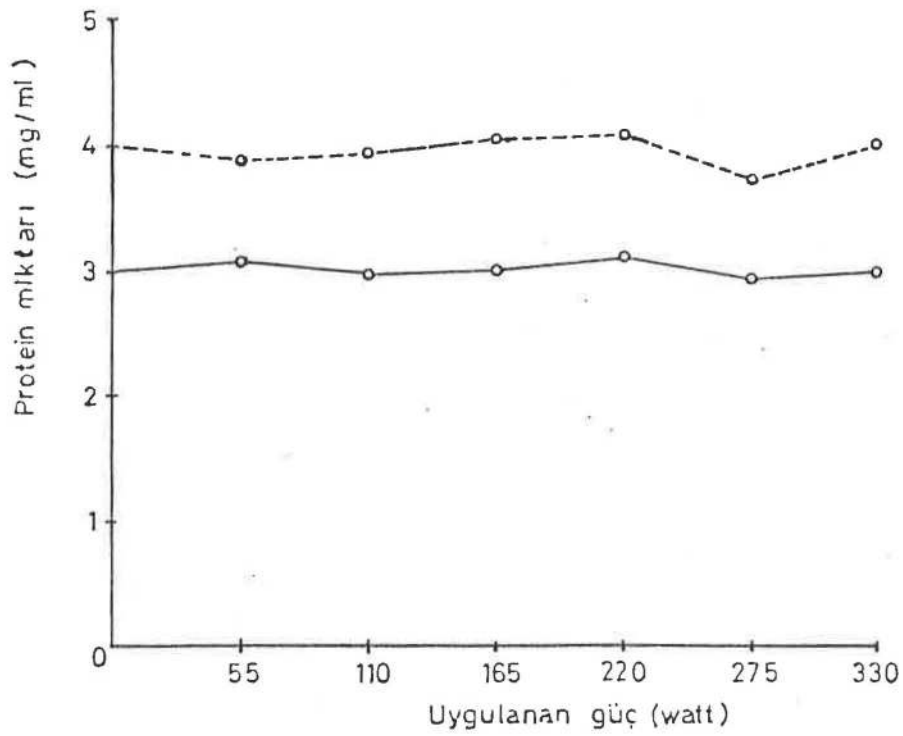
SICAKLIK (°C)	Protein miktarı (mg/ml) (3,1.10 ⁷ tane/ml)
20	1,18
37	3,23
50	3,12

Çizelge 3. 9. 15 Saniye Süre ile Değişik Dozlarda Mikrodalga Sonucu Mikrodalga Fırın içinde Oluşan Ortalama Ve Maksimum mV ve Ona Karşılık gelen Sıcaklık Değeri

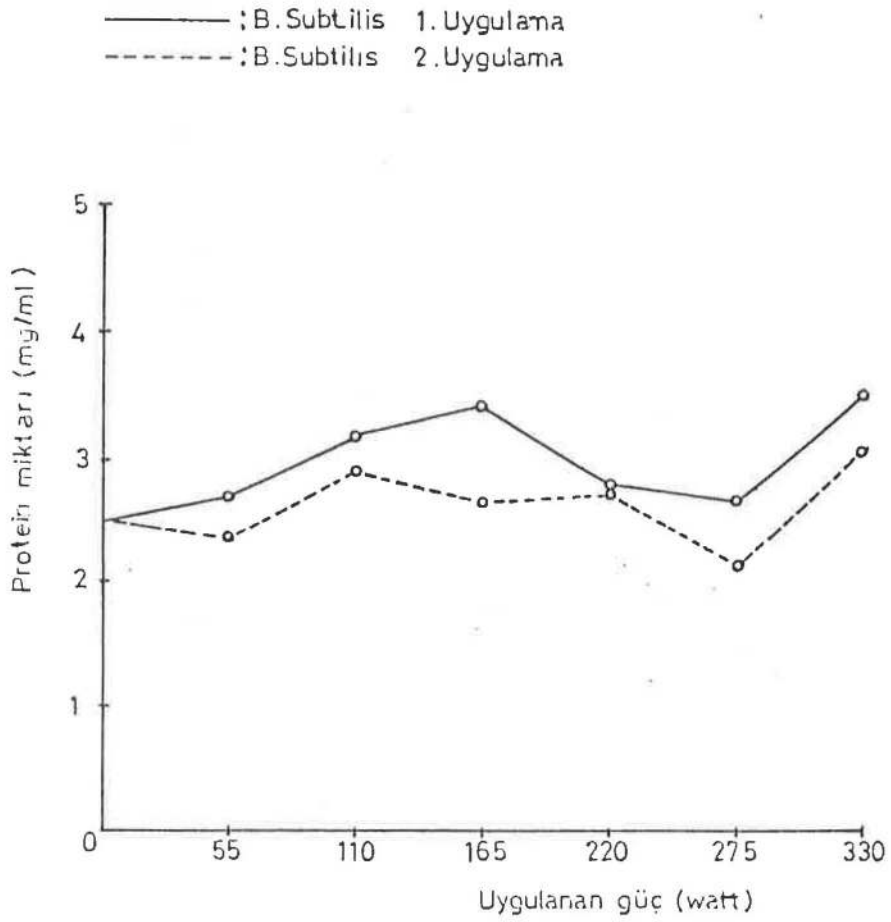
NOT: Deney sırasında oda sıcaklığı 37°C bu sıcaklığa eklenmiştir.

Uygulanan Güç,Watt Süre(15 sn)	Ortalama mV Değerleri	Sıcaklık (°C)	Maksimum mV Değerleri	Sıcaklık (°C)
55	0.1	39.5	17.9	472.4
110	0.3	44.5	44.3	1083.6
165	0.3	44.5	5.5	134.3
220	0.4	47	28.2	677.8
275	0.4	47	8.3	204.2
330	0.6	52	14.3	350.2

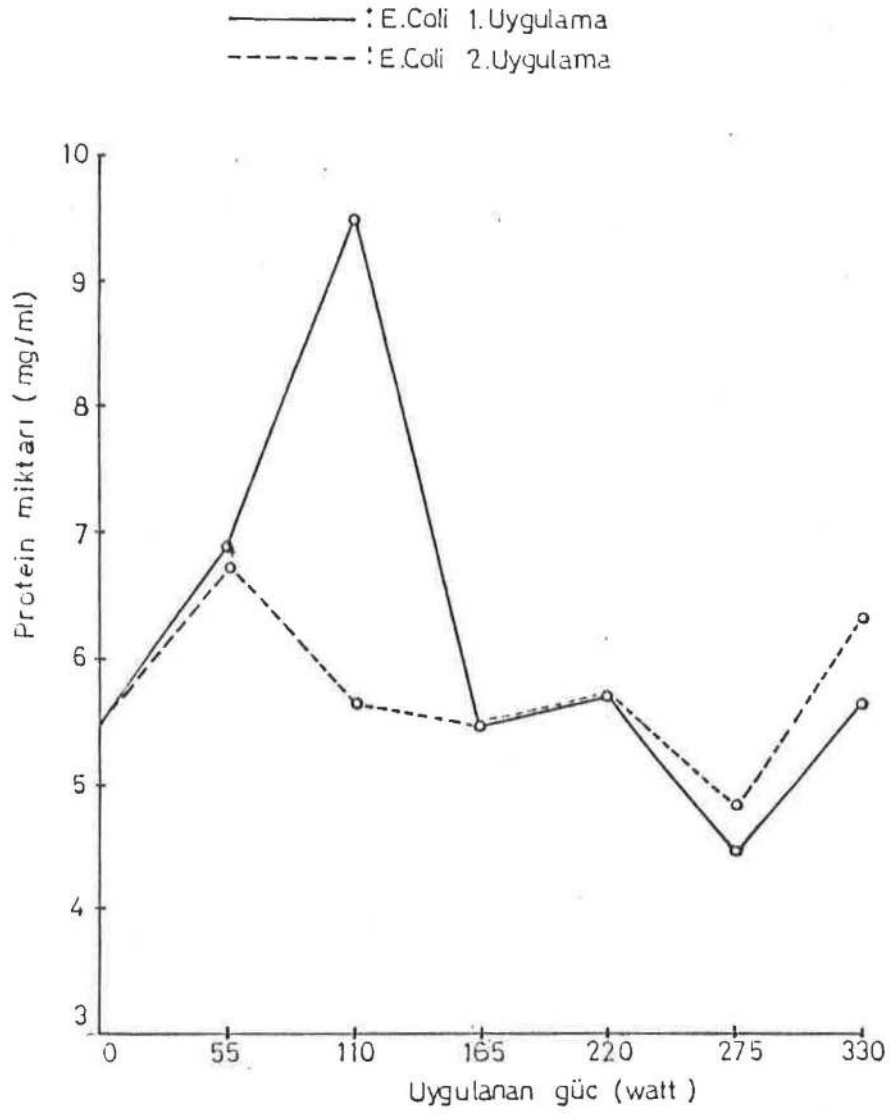
— : B.Subtilis lam üzerinde mikrodalga uygulama
 - - - : E.Coli lam üzerinde mikrodalga uygulama



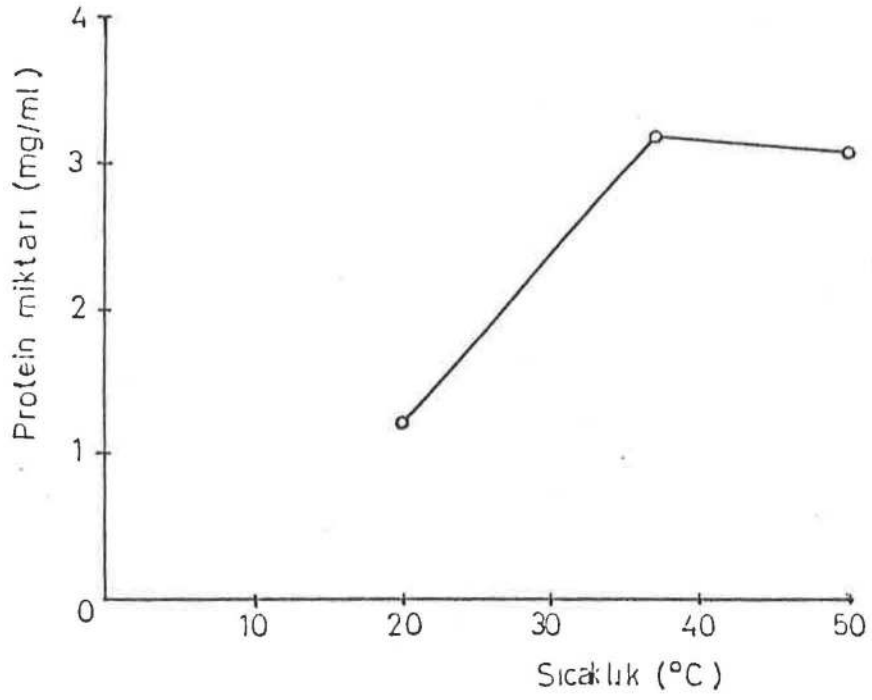
Şekil 3.1. Lam üzerine yayılmış B.subtilis ve E.coli üzerine mikrodalga uygulanması sonucu çözünür protein miktarı değişimi



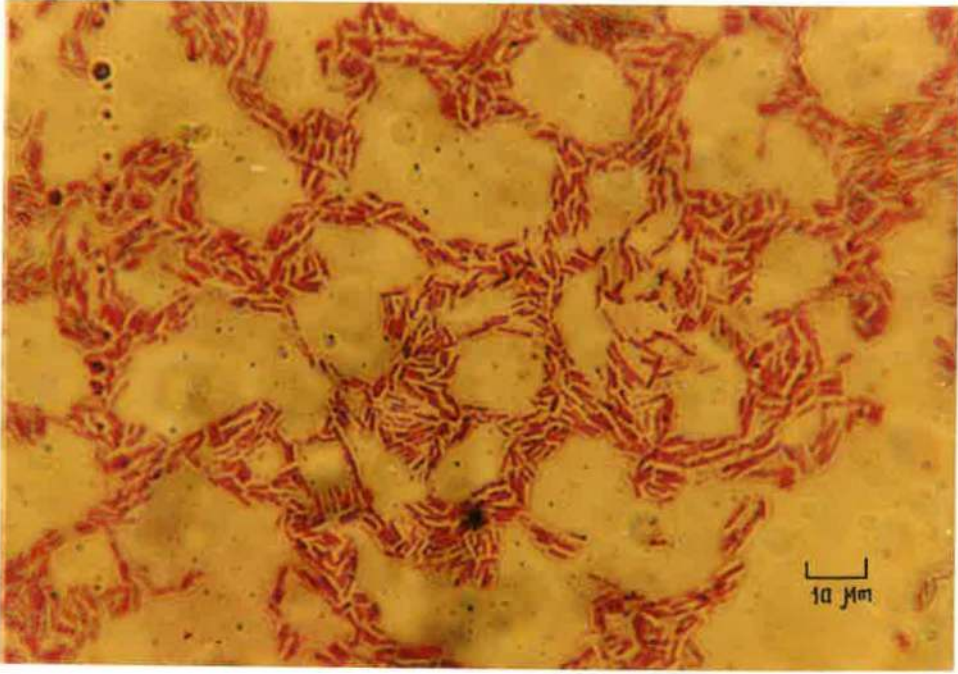
Sekil 3.2. Mikrodalga'nın B.subtilis'in çözünür proteinleri üzerine etkisi



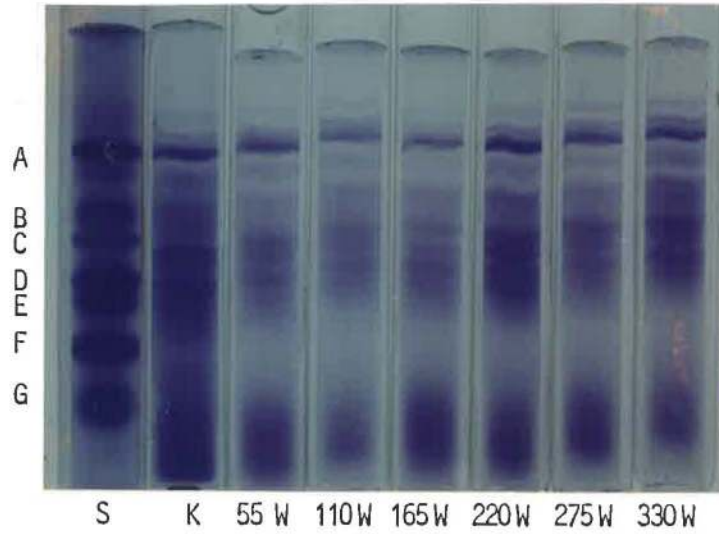
Sekil 3.3. Mikrodalga'nın E.coli K₁₂ suşu'nun çözünür proteinleri üzerine etkisi



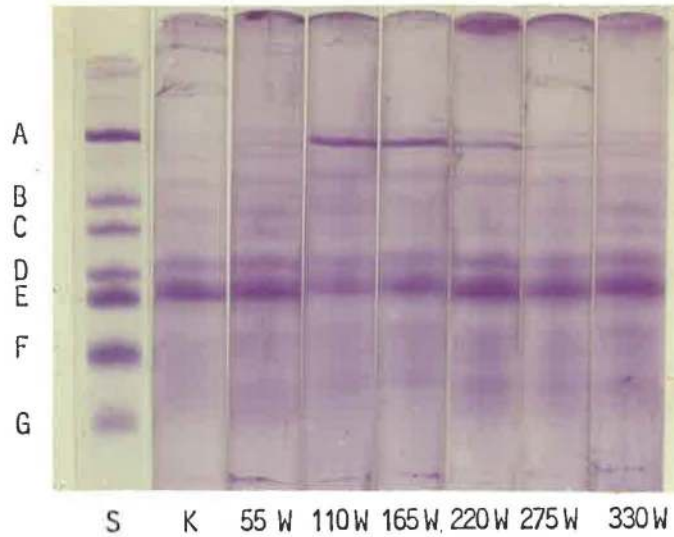
Sekil 3.4. Sıcaklığa bağlı olarak *B. subtilis*'in çözünür protein miktarları



Resim 3.1. *B. subtilis*'in Mikroskoptaki Görüntüsü (1360 kez büyütülmüş)



Resim 3.2. Lam Üzerinde Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış *B. subtilis*'in Eşit Miktarda Proteine (0.11 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroforez Bantları.



Resim 3.3. Lam Üzerinde Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış *E. coli* K₁₂ suşunun Eşit Miktarda Proteine (0.204 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroforez Bantları

S: Standart proteinler

K: Kontrol

A: Sığır Albümini (66.000 Dalton)

B: Yumurta Albümini (45.000 Dalton)

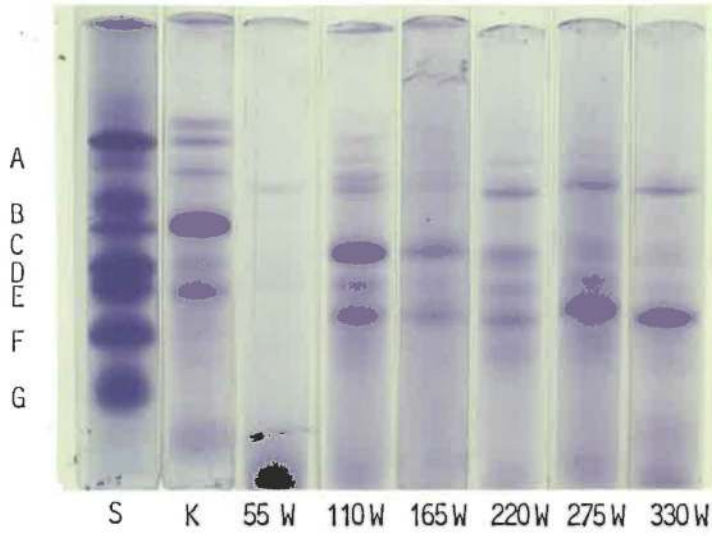
C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36.000 Dalton)

D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton)

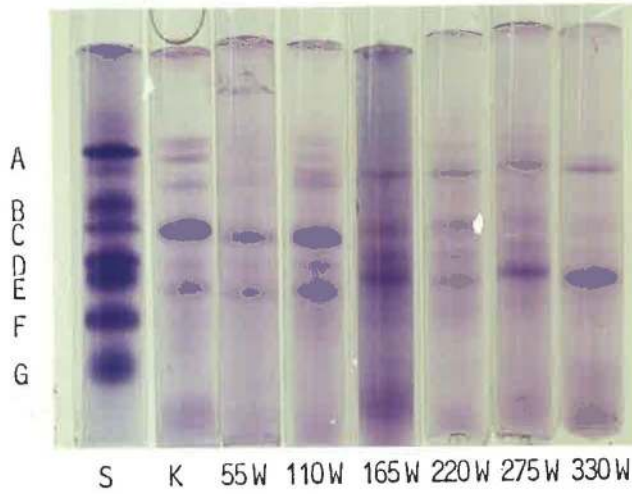
E: Tripsinojen (24.000 Dalton)

F: Tripsin inhibitör (20.100 Dalton)

G: α - Lakt Albümin (14.200 Dalton)



Resim 3.4. Besiyeri Ortamında Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış (I. Mikrodalga Uygulaması) *B. subtilis*'in Eşit Miktarda Proteine (0.134 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroferez Bantları



Resim 3.5. Besiyeri Ortamında Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış (II. Mikrodalga Uygulaması) *B. subtilis*'in Eşit Miktarda Proteine (0.106 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroferez Bantları

S: Standart proteinler

K: Kontrol

A: Sığır Albümini (66.000 Dalton)

B: Yumurta Albümini (45.000 Dalton)

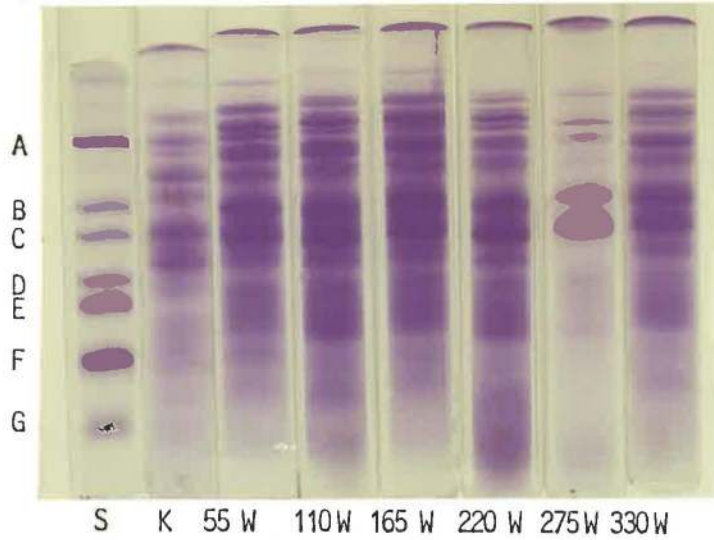
C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36.000 Dalton)

D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton)

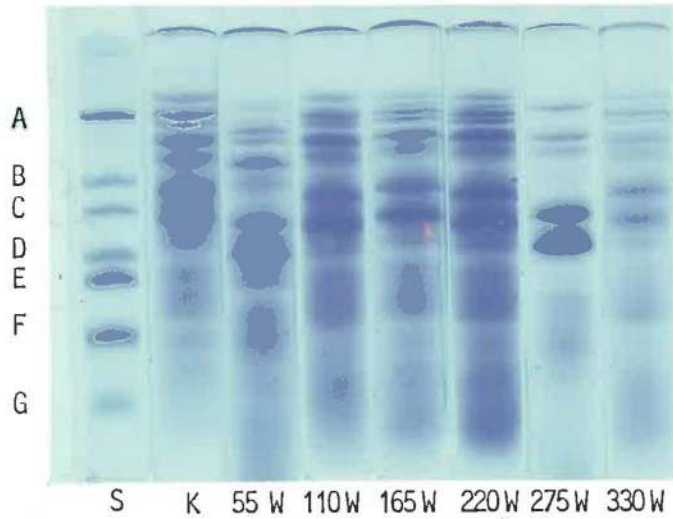
E: Tripsinojen (24.000 Dalton)

F: Tripsin inhibitör (20.100 Dalton)

G: α - Lakt Albümin (14.200 Dalton)



Resim 3.6. Besiyeri Ortamında Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış (I.Mikrodalga uygulaması) E.coli K₁₂ suşunun Eşit Miktarda Proteine (0.220 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroferez Bantları



Resim 3.7. Besiyeri Ortamında Değişik Dozlarda Mikrodalga Uygulanmış (II.Mikrodalga uygulaması) E.coli K₁₂ suşunun Eşit Miktarda Proteine (0.174 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroferez Bantları

S: Standart proteinler

K: Kontrol

A: Sığır Albümini (66.000 Dalton)

B: Yumurta Albümini (45.000 Dalton)

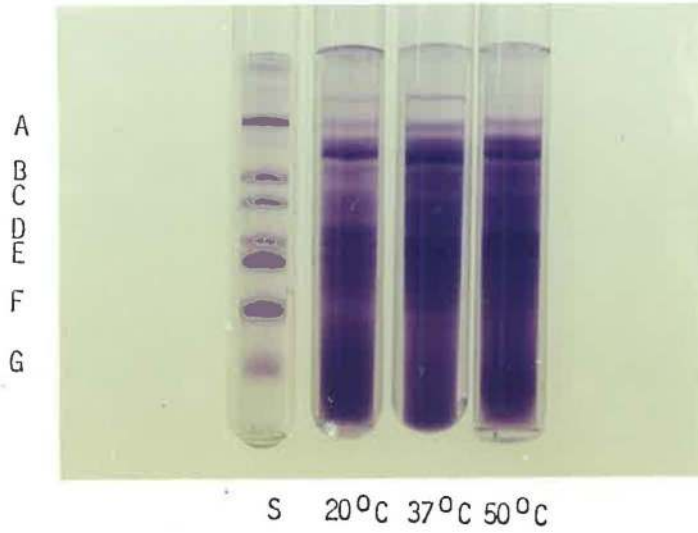
C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36.000 Dalton)

D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton)

E: Tripsinojen (24.000 Dalton)

F: Tripsin inhibitör (20.100 Dalton)

G: α - Lakt Albümin (14.200 Dalton)



Resim 3.8. 20, 37 ve 50°C de Üretilen *B. subtilis*'in Eşit Miktarda Proteine (0.064 mg/ml) Göre Verilmiş Çözünür Proteinlerinin Elektroferez Bantları

S: Standart proteinler

- A: Sığır Albümini (66.000 Dalton)
- B: Yumurta Albümini (45.000 Dalton)
- C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36.000 Dalton)
- D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton)
- E: Tripsinojen (24.000 Dalton)
- F: Tripsin inhibitör (20.100 Dalton)
- G: α - Lakt Albümin (14.200 Dalton)



Resim 3.9. Elektroforez Kabı ve Güç Kaynağı

İLAVELER I: B.subtilis'in Teşhisi İçin Hazırlanan Besiyerlerinin Bileşimi

I.1. Kanlı Agar Besiyeri

Bacto Agar		17gr.
Pepton		10gr.
NaCl		5gr.
Et özütü		5gr.
Kan		100ml.
Saf su		1000ml.

I.2. Hareket Besiyeri

Pepton		5 gr.
Et Özütü		1.5 gr.
NaCl		2.5 gr.
Agar		0.8 gr.
Saf su		500 ml.

I.3. Nutrient Broth (Katı) Besiyeri

Pepton		5 gr.
Et özütü		3 gr.
Agar		15 gr.
Saf su		1000 ml.

I.4. Nutrient Broth (Sıvı) Besiyeri

Pepton		5 gr.
Et özütü		3 gr.
Saf su		1000 ml.

I.5. Nişasta Agar Besiyeri

Et özütü		3 gr.
Pepton		5 gr.
Çözünür nişasta	..	4 gr.
Agar		15 gr.
Saf su		1000 ml.

I.6. Jelatin Agar Besiyeri

Jelatin		2 gr.
Et özütü		1.5 gr.
Pepton		2.5 gr.
Agar		7.5 gr.
Saf su		1000 ml.

I.7. Kazein Agar Besiyeri

Sodyum kazeinat	..	2 gr.
Glikoz		1 gr.
MgSO ₄		0.2 gr.
K ₂ HPO ₄		0.2 gr.
FeSO ₄		Eser miktarda
Agar		15 gr.
Saf su		1000 ml.

I.8. Yağlı Agar Besiyeri

Et özütü	1.5 gr.
Pepton	2.5 gr.
Agar	7.5 gr.
Tereyağı	5 gr.
Saf su	1000 ml.

I.9. Amonyum Medyum (A) Besiyeri

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 gr.
K_2HPO_4	0.5 gr.
MgSO_4	0.25 gr.
FeSO_4	0.05 gr.
MgCO_3	2.5 gr.
Saf su	500 ml.

I.10. Sukrozlu Besiyeri

Sukroz	0.5 gr.
Trypton	1 gr.
Et özütü	3 gr.
Brom krezol moru..	0.4 gr.
Saf su	100 ml.

I.11. Xylozlu Besiyeri

Xyloz	0.5 gr.
Trypton	1 gr.
Et özütü	3 gr.
Brom krezol moru..	0.4 gr.
Saf su	100 ml.

I.12. Laktozlu Besiyeri

Laktoz	0.5 gr.
Trypton	1 gr.
Et özütü	3 gr.
Brom krezol moru..	0.4 gr.
Saf su	100 ml.

I.13. Glikozlu Besiyeri

Glikoz	0.5 gr.
Trypton	1 gr.
Et özütü	3 gr.
Brom krezal moru..	0.4 gr.
Saf su	100 ml.

I.14. Manitol besiyeri

Manitol salt agar ..	11.1 gr.
Saf su	1000 ml.

I.15. Glikozlu Anaerobik Agar Besiyeri

Glikoz		2 gr.
Pepton		3 gr.
Et özütü		2 gr.
Agar		5 gr.
Saf su		1000ml.

I.16. Sitratlı Besiyeri

NaCl		5 gr.
MgSO ₄		0.2 gr.
NH ₄ H ₂ PO ₄		1 gr.
KH ₂ PO ₄		1 gr.
Sodyum sitrat		5 gr.
Saf su		1000 ml.

I.17. Saburo Dextroz Besiyeri

Saburo dextroz		65 gr.
Saf su		100 ml.

I.18. Sodyum Azidli Besiyeri

Pepton		5 gr.
Et özütü		3 gr.
Sodyum Azid		0.2 gr.
Agar		15 gr.
Saf su		1000 ml.

I.19. Litmuslu süt Besiyeri

Süt tozu		100 gr.
Litmus		0.75 gr.
Saf su		1000 ml.

I.20. Sodyum klorürlü Besiyeri

Pepton		5 gr.
Et özütü		3 gr.
NaCl		10 gr.
Saf su		100 ml.

İLAVELER II. B.subtilis'in Teşhisi İçin Hazırlanan Boyalar, İndikatörler ve Reaktiflerin Bileşimi.

II.1. Metilen Mavisi Boyası

Metilen mavisi 1.5 gr.
Alkol (%95) 100 ml.

II.2. Jansiyen Moru Boyası

Jansiyen moru 5 gr.
Alkol (%95) 100 ml.

II.3. Fuksin Boyası

Bazik fuksin 3 gr.
Alkol (%95) 100 ml.

II.4. Brom Krezol Moru (BCP)

Brom krezol moru 0.4 gr.
NaOH (N/20) 13.8 ml.
Saf su 86.2 ml.
(pH renk değişim aralığı pH 5.2'de sarı, pH 6.8'da mor)

II.5. İyodür (Lugol) Reaktifi

İyot 1 gr.
KI 2 gr.
Saf su 300 ml.

II.6. HCl.HgCl₂ Reaktifi

HgCl₂ 1.5 gr.
HCl (derişik) ... 20 ml.
Saf su 100 ml.

II.7. Nessler Reaktifi

KI 50 gr.
HgCl₂ 5 gr.
KOH(%50) 400 ml.
Saf su 1000 ml.

1. LAVELELER III: Protein Miktar tayini için Kullanılan Reaktifin Hazırlanması

III. 1. Folin Ciocalteu Reaktifinin (FCR) Reaktifinin Hazırlanışı
500 ml'lik Bir balon jojeye 500 gr $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,5 gr $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 350 ml saf su, 25 ml %85'lik H_3PO_4 , 50 ml derişik HCl ve 10 saat süreyle yavaş bir şekilde geri soğutucu altında kaynatılır. 75 gr Li_2SO_4 , 25 ml saf su ve bir kaç damla Br_2 ilave edilir. Bromun aşırısını tutmak için soğutucusuz olarak 15 dk kaynatılıp, soğutulur. 500 ml seyreltilir.

III. 2. Alkalin Çözeltisinin Hazırlanışı

%4 Na_2CO_3 , %2 CuSO_4 , %4 Na-K Tartarat (Hacimce ; 100 : 1:1 oranında)

1LAVELER IV. Çermik Belkışhatun Termal Kaplıcasının Özellikleri
Yeri: Diyarbakır iline bağlı Çermik ilçesindedir. Kaplıca mahalının yüksekliği 600 metredir.

Kısa tarihçesi: Çermik kaplıcası, tarihi kaplıcalarımızdan olup, Selçuklular zamanında işletilmiştir. Mevcut tarihi havuzlar Selçuklulardan kalmadır.

Konaklama tesisleri: Kaplıcadaki muhtelif konaklama tesislerinin toplam yatak kapasitesi 200 kadardır.

Tedavi tesisleri: Dicle Üniversitesi Fizik tedavi ve Rehabilitasyon merkezi iki adet umumi havuzdan ibarettir.

Yardımcı tesisler: Bir gazino ve lokantalar bulunmaktadır.

Şifalı suyun grubu: Sodyumlu, bikarbonatlı, klorürlü, sülfatlı, iyotlu, bromürlü, kükürtlü.

Şifalı suyun teknik vasıfları: Çermik kaplıcası kaynaklarının sıcaklıkları 52°C, radyoaktiviteleri 10 eman, p^H değerleri ise 7.3 dir.

Endikasyon (Şifa niteliği):

Banyo tedavisi ile: Romatizmalar, nevrit, polinevrit, çocuk felçleri ve kadın hastalıklarında ayrıca serpintileme ile de, dermatozlar ile solunum yolu hastalıkları için tavsiye edilmektedir.

Ulaşım durumu: Kaplıca, Çermik ilçesine 3 Km uzaklıklardadır. Sezon süresince kaplıcaya Çermik'ten devamlı şekilde karayolu taşıt araçları işlemektedir.

Enformasyon (Danışman): Her türlü bilgi ve rezervasyon için Çermik Belediyesine müracaat edilebilir.

ÖZET

Bu çalışmamızda Çermik Belkışhatun termal kaplıcalarından soyutlayarak teşhis ettiğimiz termotoleran *B.subtilis* ve Ankara Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilen Mezofil *E.coli* K₁₂ suşunun çözünür proteinleri üzerine mikrodalganın (2450 MHz) etkisi incelenmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın birinci aşamasında, bakteriler besiyersiz ortamda, Lam üzerinde 15 sn süre ile 55, 110, 165, 220, 275 ve 330 watt güçlük mikrodalgaya tabi tutuldu. Daha sonra çözünür plazma protein miktar tayini yapıp, proteinlerinin elektroforez bantları incelenmiştir.

İkinci aşamada, Nutrient Broth(NB) besiyerinde bakterilere 15 sn süre ile 55, 110, 165, 220, 275 ve 330 watt mikrodalga uygulanmıştır. Mikrodalga uygulanmış bakterilere ikinci kez aynı doz ve aynı sürede mikrodalga uygulanıp, çözünür plazma protein miktar tayini yapılmış ve proteinlerinin elektroforez bantları incelenmiştir.

Ayrıca mikrodalga etkisiyle termal etkiyi karşılaştırmak üzere bakteriler 20, 37 ve 50°C'de üretilip protein miktar tayini yapılmış ve elektroforez bantları incelenmeye çalışılmıştır.

B.subtilis ve *E.coli* K₁₂ suşunun çözünür protein miktarlarının kantitatif tayini ile elde edilen sonuçlar ve elektroforez bant profilleri mikrodalganın termal etkisinin yanında termal olmayan ve mutasyona yol açan etkisinin olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. T.D. Brock, Science., 158, 1012-1019(1970).
2. D.B. Carlisle, Science., 161, 279-280(1968).
3. H.E. Hinton, Nature., 188,336-337(1960).
4. T.D. Brock, Freshwater Res., 5, 233(1971)
5. T.D. Brock, "Thermophiles, General, Molecular and Applied microbiology".New York(1988).
6. M.Öner, "Genel Mikrobiyoloji".Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi No:94.Ege Üniversitesi Basım evi. Bornova 484-487(1986).
7. J.G. Zeikus, Enzyme Microb. Technol., 1,249-252 (1979).
8. M.Sinesky, Proc. Nat. Acad.Sci., 71,522(1974).
9. J.P. Jerome, Advances in Aquatic Microbiology.,3,109-139(1985).
10. A.Z. Kathy and J.P. Jerome, Appl. Microbiol., 9,258-264(1987).
11. O.P. Ward and M.Moo-Young, Biotech. Adv., 6, 39-69 (1988).
12. J.G. Zeikus and R.S.Wolfe, Journal of Bacteriology., 109(2),707-713 (1972).
13. B.K.Ahring and P.Westermann, FEMS Microbiology Letters.,25, 47-52 (1984).
14. E.Gündüz, "Modern Fizige Giriş." Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi No=110 Ege Üniversitesi Basım Evi.Bornova.s.309-312(1988).
15. H. Fleming, Electr.Eng., 63, 18-21(1944).
16. N.C.Doty and C.W.Raker,J.Agric Food Chem., 25, 815-822(1977).
17. G.R.Vela and J.F.Wu,Applied and Environmental Microbiology., 37, 550-553(1979).

18. G.A. Samuel and I.C.D.Wang, Applied Microbiology., 15,1371-1375 (1967).
19. R.D. Blevins, R.C. Crenshaw, JR.E.Arthur, E.Hougland and E.Clark Radiation Research.,82, 511-517(1980).
20. S. Baranski and P.Czerski, Hutchinson Roos, Stroudsburg,PA(1976).
21. B.M.Ames, N.Mc.Cann and E.Yamasaki, Mutat.Res.,31,347-364(1975).
22. I.Carperter, In syposiym proceedings(Richmand VA sept 17(1969).
U.S.Dept of Health, Education and Welfare Report BRH/DB No=70-2 (PB 193 858), Rockville MD (1970).
23. L.Minecki and L.Bilski, Phys Chem Med 1., 11 (1961).
24. Sagripanti, Jose-Luis and M.L. Swicord, Physchem Med.,50 (1), 47-50 (1986).
25. Sagripanti, Jose-Luis, L.Mays,Swicord and C.D. Christopher, Radiat Res.,110(2),219-231(1987).
26. R.F. Schiffmann,Food Proc.Dev.,13,38 (1979).
27. S.A. Goldblith, Adv.Food Res.,15, 277-301 (1966).
28. S.A. Goldblith and R.V.Becareau,"An Annotaled Bibliography on microwaves: Their properties, production and application to food processing."MIT press, Cambridge, Massachussets(1973).
29. S.Craven and H.Lillard, J.Food Sci.,39,211 (1974).
30. M.Ingram and L.J. Page,Proc.Soc.Appl.Bacteriol., 16,69 (1953).
31. E.K.Dalaney,H.J.Van Zonte and P.A Hartman,Microwave Energy Appl.Newsl.,1,11(1968).
32. M.S.Dreyfuss,Thesis Ohio State University, Columbus (1978).
33. M.S.Dreyfuss, J.R. Chipley and B.J.Kolodziej, Appl.Environ Microbiol.(submitted for publication) (1980).

34. S.J.Webb, Ann N.Y. Acad sci., 247,327 (1975).
35. M.S.Dreyfuss and J.R.Chipley, Applied and Environmental Microbiology., 39(1),13-16 (1980).
36. H.Burten, Nature.,166,434 (1950).
37. V.T.Tomberg, In "Biological Effects of Microwave Radiation" (M.F.Peyton,ed).,1,221-228 (1961).
38. G.H.Brown and W.C Morrison, Food Technol.,8,361 (1954).
39. R.Chipley, Adv.Appl.Microbial.,26,129-145 (1980).
40. R.E.Buchanan, N.E.Gibbons, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology".The Williams Wilkins Company.USA(1974).
41. K.T.Crabtree, R.D.Hinsdill, "Fundamental Experiments in Microbiology".W.G. Saunders Company.USA(1974).
42. M.Arda, "Genel Bakteriyoloji".Ankara Üniversitesi veteriner fakültesi yayınları: 342 Ders kitabı: 242 Ankara Üniversitesi Basım evi. Ankara (1978).
43. T.Gündüz, "Yarı-mikro Kalitatif Analiz". Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları Genel 116, Ankara (1973).
44. A.Telefoncu, "Protein yapısı ve fonksiyonu". Biyokimya Lisans üstü Yaz okulu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı. Çeşme (1988).
45. K.Weber and M.J.Osborn, Biol. Ckem., 244, 404-412 (1969).
46. O.Tairo, I.Kazutomo, International Journal of Systematic Bacteriology., 24 (1), 102-112 (1974).
47. O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, Al Farr and R.JJ. Randal, J.Biol.Chem 193:265-275. (1951)

48. M.Akman, "Bakteri Genetigi". Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, No:8 2.Baskı s.118-126. Sivas (1983).
49. A.Telefoncu, "Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya". Arkadaş Tıp Kitapları Sermet Matbaası. s.141-142. Kırklareli (1988).
50. E.M.Gözü kara, "Biyokimya Ders kitabı". Meteksan Basım evi. Ankara (1989).
51. E.K.Yeagers, J.B.Langley, A.P.Sheppard and Y.K.Huddleston, Ann.M.Y Akad. Sci., 247, 301 (1975).
52. H.Tuengler, F.Keilmann and I.Gezel, Z.Maturforsch Teil., 34, 60 (1979).
53. D'Ans-Lax, "Taschenbuch für Chemiker und Physiker" 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1967).