

Bor İçeren Ortamlarda Prokaryotik eşitliliğin Belirlenmesi

Damla Bozkurt

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Haziran 2016

Determination of Prokaryotic Diversity in Environments with Boron

Damla Bozkurt

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

June 2016

Bor İçeren Ortamlarda Prokaryotik eşitliliğin Belirlenmesi

Damla Bozkurt

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof.Dr. Ahmet abuk

Haziran 2016

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Damla Bozkurt'un Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "Bor İçeren Ortamlarda Prokaryotik Çeşitliliğin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ahmet Çabuk

İkinci Danışman : –

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye: Doç. Dr. İlknur DAĞ

Üye: Doç. Dr. Gökalp İŞCAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pınar AYTAR ÇELİK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet Erşahan
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ahmet ÇABUK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bor İçeren Ortamlarda Prokaryotik Çeşitliliğin Belirlenmesi” başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 13 /06/2016

DAMLA BOZKURT

ÖZET

Bor, biyolojik fonksiyonlarının tam olarak bilinmemesine karşın, özellikle bitkiler için mikro besleyici bir element özelliği taşımaktadır. Ancak ülkemiz gibi bor zengini ve yarı kurak iklime sahip olan bölgeler için toprakta ve suda bor birikimi hem biyolojik çeşitlilik hem de çevre için olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Toprakta ve suda bor miktarının azaltılması bu alanlara adapte olmuş bitki ve mikroorganizmalar ile mümkündür. Ayrıca bu adapte canlılardan özellikle mikroorganizmaların bor ile ilişkili metabolik faaliyetlerin anlaşılması ile yeni teknolojilerin geliştirilmesi olasıdır. Bu nedenle bu alanlardaki mikrobiyal çeşitliliğin bilinmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasının öncelikli hedefi, bor içeren su ve toprak örneklerinde yaşayan bakteri çeşitliliğinin belirlenmesidir. Kırka bor maden ocağı çevresinde bulunan drenaj havuzlarından alınan su ve toprak örneklerindeki mikrobiyal komünite, moleküler yaklaşımlar ve klasik mikrobiyal tekniklerin kombinasyonu ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *Halomonas mongoliensis*, *Halomonas campaniensis*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* türlerine ait suşlar ile *Pseudomonas zhaodogensis* türüne ait 4 farklı suş izole edilmiştir.

Anahtar Kelime: Boronofil, boronotolerant, bor içeren ortam, prokaryotik çeşitlilik, Kırka.

SUMMARY

Even though the biological functions of the boron have not been known yet, it has a characteristic of a nutritional element for the plants. However, boron accumulation in semiarid regions which are rich in boron such as Turkey causes adverse effects for both organisms and also environment.

It is possible to reduce the amount of the boron in soil and water thanks to the microorganism and plants adapted to those area. Therefore, it will be important to find out the microbial diversity in these regions. The first aim of the thesis study is determining the bacterial biodiversity living in boron contaminated waters. Very little is known about microbiological diversities of acidic environments in the literature. Microbial communities in boron contaminated environments, Kırka boron mine around Eskisehir were investigated a combination of classical microbiology and molecular biology approaches and examined microbiological diversity. At this study, the strain of *Halomonas mongoliensis*, *Halomonas campaniensis*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* species and the different four strains of *Pseudomonas zhaodogensis* were isolated.

Keywords: Boronophile, boronotolerant, environment with boron, prokaryotic diversity, Kırka.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde akademik bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım değerli Hocam Prof. Dr. Ahmet ÇABUK'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, bilgisiyle ve tecrübeleriyle bana her türlü desteği sağlayan değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Pınar AYTAR'a

Çalışmalarım sırasında ve hayatımın her evresinde bana destek olan, her an yanımda olan, zorlukları göğüslememi sağlayan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, değerli ablam ve çalışma arkadaşım Serap GEDİKLİ'ye,

Gerek bilgi ve tecrübesiyle, gerek manevi desteğiyle her an yanımda olan, birlikte çalışmaktan zevk aldığım değerli arkadaşım Yağmur TOPTAŞ'a

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca daima yanımda olup, destek ve tecrübelerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Belma NURAL ve Hakan ÇAKMAK'a ve tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Bor ve metal analizlerinin yapılmasına destek olan Balıkesir Üniversitesi Merkezi Laboratuvar çalışanlarına,

Hayatımın her anında olduğu gibi tezim süresince de benden maddi manevi desteğini esirgemeyen, büyük anlayış gösteren, bugünlere gelmemde büyük paya sahip olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Damla BOZKURT

Eskişehir 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1.Bor	4
2.2.Borun Canlılar Üzerine Etkisi	4
2.2.1.Borun toprak ve su üzerine etkisi	5
2.2.2.Borun bitkiler üzerine etkisi	5
2.2.3. Borun hayvanlar üzerine etkisi	6
2.2.4. Borun mikroorganizmalar üzerine etkisi	6
2.2.5. Borun insanlar üzerine etkisi	6
2.3. Yüksek Konsantrasyon Bor İçeren Alanlarda Prokaryotların ve Metabolik Fonksiyonlarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	7
2.4.Borla Kirlenmiş Alanlardan İzole Edilen Diğer Mikroorganizmalar	8
3.MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1.Materyal	10
3.1.1.Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	10
3.1.2.Çalışmada kullanılan cihazlar	10
3.1.3.Çalışmada kullanılan besiyerleri	11
3.1.3.1. <u>Luria Bertani(LB)</u>	11
3.1.3.2. <u>Tryptic Soy Broth (TSB)</u>	12
3.1.3.3. <u>Trypton Broth</u>	12
3.1.3.4. <u>Simons's Sitrat Agar</u>	12
3.1.3.5. <u>Triple Sugar Iron</u>	13
3.1.3.6. <u>MR-VP Broth</u>	13
3.1.3.7. <u>Laktoz Broth</u>	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	14
3.1.4.1. <u>TAE 50X</u>	14
3.1.4.2. <u>Eletroforez için Yükleme Tamponu (6X)</u>	14
3.1.4.3. <u>Lizozim Solüsyonu</u>	14
3.1.4.4. <u>KOH çözeltisi (%40)</u>	15
3.1.4.5. <u>α-Naftol Çözeltisi</u>	15
3.1.4.6. <u>Kovaks Çözeltisi</u>	15
3.1.4.7. <u>İyodür (Lugol) Çözeltisi</u>	15
3.1.4.8. <u>Safranin Boyası</u>	15
3.1.4.9. <u>Kristal Viyole Boyası</u>	16
3.1.4.10. <u>Bromtimol Mavisı</u>	16
3.2.YÖNTEM	16
3.2.1.Çalışma alanlarının özellikleri ve su örneklerinin alınması	16
3.2.2.Örneklerin bor ve metal içeriklerinin belirlenmesi	19
3.2.3.Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri	20
3.2.3.1. <u>Kültüre bağlı yöntemler</u>	20
3.2.4. MİK testi ile bor toleranslarının belirlenmesi	27
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1.Örnekleme Yerleri ve Alınan Su Örneklerinin Bor ve Metal Analizleri	28
4.2.Bor İçeren Örneklerden Bakteri İzolasyonları	31
4.3.Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri.....	33
4.3.1.İzolatların biyokimyasal testlerinin sonuçları	33
4.3.2.İzolatların moleküler identifikasyonu	40
4.3.3.Amplifiye edilmiş ribozomal dna restriksiyon analizi (ARDRA) ve PCR	41
ürünlerinin dizi analizi	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR DİZİNİ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Bor madeni ve Civarının Uydu Görüntüsü (maps.google.com)	17
3.2 Eskişehir Kırka Maden İşletmelerine ait bor maden drenaj gölleri.....	18
4.1 İzolatların Gram Boyama Sonuçlarının Bazı Görüntüleri	31
4.2 Biyokimyasal Test Sonuçlarından Bazılarının Görüntüleri	34
4.3 Toplam DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri...	40
4.4 Örneklerin 16S rRNA gen amplifikasyon örnekleri.....	41
4.5 Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon analizi sonucu	42
4.6 İzolat DB4'ün 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı.....	42
4.7 İzolat DB5'in 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı.....	43
4.8 İzolat DB12'nin 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı...	43
4.9 İzolat DB14'ün 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı.....	43
4.10 İzolat DB21'in 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı...	43
4.11 İzolat DB23'ün 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı...	44
4.12 İzolat DB24'ün 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı...	44
4.13 İzolat DB25'ün 16S rRNA Dizi Analizlerine Göre Oluşturulan Filogenetik Ağacı...	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	10
4.2 Örneklerin Alındığı Yerler	28
4.3 Alınan Örneklerin Bor Miktarları	29
4.4 Örneklerin Metal İçerikleri	30
4.5 Saflaştırılan Mikroorganizmaların Makroskobik Görüntüleri	32
4.6 Saflaştırılan Bakterilerin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişebilirliği.....	34
4.7 Saflaştırılan Mikroorganizmaların Biyokimyasal Test Sonuçları	35
4.8 Saflaştırılan Mikroorganizmaların pH'larda Gelişebilirlikleri	36
4.9 Saflaştırılan Mikroorganizmaların Farklı Bor Miktarlarında Gelişebilirlikleri	37
4.10 İzolatların Farklı Besiyerlerinde Kullanılabilirlikleri	39
4.11 Bor içeren alanlardaki bakteri çeşitliliği	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simge** μg μL μm

G

mL

mV

 $^{\circ}\text{C}$ **Açıklama**

Mikrogram

Mikrolitre

Mikrometre

Gram

Mililitre

Milivolt

Santigrat derece

Kısaltma**Açıklama**

ASTM

American Society for Testing and Materials

ATCC

American Type Culture Collection

FISH

Flouresans insitu hibridizasyon

Nt

nükleotit

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SDS

Sodyum dodesil sülfat

SEM

Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

UV

Ultraviyole

XRD

X ray diffraction

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar dünya üzerindeki bitki ve hayvanların ortaya çıkışından milyarlarca yıl önce oluşmuşlardır. Bu nedenle mikroorganizmaların evrimsel çeşitliliği yüksek organizmaların çok ötesindedir. Bu büyük çeşitlilik mikroorganizmalara aşırı ortamlarda yaşayabilmeleri gibi birçok önemli özellik kazandırmaktadır. Aynı zamanda Dünya'daki biyoçeşitliliğin çok büyük bir bölümünü oluştururlar ve jeokimyasal döngülerde önemli görevler üstlenmektedirler. Mikroorganizmalar; organik maddelerin ayrıştırılmasında, mineral maddelerin çözündürülmesinde önemli bir yer tutarlar. Bununla birlikte tarım, endüstriyel süreçler, pestisitlerin kullanımı gibi antropojenik aktiviteler de mikrobiyal çeşitliliği etkileyebilir.

Ülkemizde yer altı zenginliklerinin belirlenmesi ve kullanıma sunulması önemli hale gelmiştir. Bununla birlikte biyolojik zenginliklerin de belirlenerek kayıt altına alınması önemli ve zorunlu olmuştur. Ülkemizin bilinen bitki ve hayvan çeşitliliğinin yanı sıra mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarının da artması bu açıdan önemli bir katkı sağlayacaktır. Mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması, gerek ülkemizin mikrobiyal biyoçeşitlilik envanterinin zenginleşmesi ve gerekse elde edilecek mikroorganizmaların sahip oldukları metabolik çeşitlilik nedeni ile birçok alanda kullanım potansiyellerinin olması açısından önemlidir. Özellikle aşırı ortamların mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek olası endüstriyel potansiyelleri açısından da avantaj sunacaktır.

Mikrobiyal değişiklik birçok açıdan değerlendirilebilir. Örneğin hücre boyutu ve hücre morfolojisinde, metabolik stratejilerde, hücre bölünme mekanizmalarında, patojenitede, gelişim biyolojisinde ekstrem çevresel şartlara uyumda ve hücre biyolojisinin pek çok diğer durumunda varyasyonlar oluşur. Bu da çok büyük bir mikrobiyal çeşitliliğin göstergesidir.

Bor, doğada serbest element haliyle bulunmayıp, oksijen ile yapmış olduğu bileşikler şeklinde bulunur ve bu tür bileşiklere borat adı verilir. Bor, dünyada, özellikle de ülkemizde stratejik öneme sahip en önemli yer altı zenginliklerinden biridir. Bor, yeryüzünde toprak, kayalar ve suda az miktarlarda fakat yaygın olarak bulunur. Bor

mineralleri, yapılarında farklı oranlarda Bor oksit (B_2O_3) içeren doğal bileşiklerdir. Doğada yaklaşık 230'dan fazla bor minerali mevcut olup bunların ticari öneme sahip olan başlıcaları; tinkal, kolemanit, kernit, üleksit, pandemit, borasit, szaybelit ve hidroborasit'tir (Eti Maden İşletmeleri, 2013). Bu mineraller, öncelikle fiziksel işleme tabi tutularak zenginleştirilir (konsantre bor) daha sonra rafine edilerek çeşitli bor kimyasallarına dönüştürülür. Bor mineralleri, ilave edildikleri maddelerin katma değerini yükseltmekte, bu nedenle sanayinin tuzu olarak bilinmektedir. İlerleyen teknolojiler, bor kullanımını ve bor minerallerine olan bağımlılığı artırmaktadır. Bor, cam sanayii, tarım, seramik sanayi, tıp, metalurji sanayi, nükleer sanayi, temizletme ve beyazlatma sanayinde kullanılmaktadır. Özellikle uçak ve uzay sanayilerinde, yapı elemanı ve yakıt olarak kullanımları söz konusudur. Bor mineralleri küflenmeyi önlemek amacıyla, yapay ve yavaş eriyen gübre üretiminde, bakterisit ve fungusit üretiminde de kullanılmaktadır. Ayrıca fenil borik asit ve kaynakları böcek ve bakteri öldürücülerde etki artırıcı madde olarak kullanılırlar ve zehirlidirler (Demirtaş, 2004) Bor, biyolojik fonksiyonlarının tam olarak bilinmemesine karşın, özellikle bitkiler için mikro besleyici bir element özelliği taşımaktadır. Ancak ülkemiz gibi bor zengini ve yarı kurak iklime sahip olan bölgeler için toprakta ve suda bor birikimi hem organizmalar hem de çevre için olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Toprakta ve suda bor miktarının azaltılması bu alanlara adapte olmuş bitki ve mikroorganizmalar ile mümkündür. Bu nedenle bu alanlardaki mikrobiyal çeşitliliğin bilinmesi önemlidir. Bor yatakları, çevre kirliliği tehdidi altında bulunan ülkemizde Eskişehir'in Kırka Beldesi, Kütahya'nın Emet ve Hisarcık ilçeleri, Bursa'nın Kestelek Köyü ve Balıkesir'in Bigadiç İlçe'sinde yaygın olarak bulunmaktadır. Batı Anadolu'da geniş bir alanda yayılan bor madenine bitkiler, hayvanlar ve insanlar çeşitli durumlarda maruz kalmaktadır (Mergen vd., 2006).

Bor, mikroorganizmalar için düşük konsantrasyonlarda gereklidir ve mikroorganizmaların hücresel süreçlerinde önem taşıırken, yüksek konsantrasyonları ise toksik etki gösterebilmektedir (Trajanovska vd., 1997; Nies, 1999).

Yüksek bor konsantrasyonuna sahip alanlar ise mikrobiyal çeşitlilik açısından zengin değildir. Bu tip alanlarda hayatta kalmayı başarabilen mikroorganizmalar boronofil (boru seven) ya da boronotolerant (bora tolerans gösteren) özellik göstermektedirler. Ancak bu tür organizmalar da organik maddelerin ayrıştırılmasında, mineral maddelerin

özündürülmesinde önemli bir yer tutarlar. Aşırı ortam olarak nitelendirilen bor ve tuz içeriği yüksek alkali ortamların mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek olası endüstriyel potansiyelleri açısından da avantaj sunacaktır.

Sunulan tez çalışmasının öncelikli hedefi, Kırka bor maden ocağı civarında bulunan bor içeren alanlar gibi alkali sularda yaşayan bakterilerin çeşitliliğinin belirlenmesidir. Literatürde böyle çevrelerdeki mikrobiyal çeşitlilik hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Borla kirlenmiş alanlarda belirlenen farklı istasyonlardan mikroorganizmaların izolasyonu sağlanmış ve klasik mikrobiyal tekniklerin, moleküler tanılama teknikleri ile kombine edilerek değerlendirilmiştir. Bu yüksek lisans tezinden elde edilecek bilgi ile borla kirlenmiş alanlarda mikrobiyal çeşitliliğe katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Bor

Doğada 230'dan fazla bor minerali bulunmaktadır. Bu mineraller, öncelikle fiziksel işleme tabi tutularak zenginleştirilir (konsantre bor) daha sonra rafine edilerek çeşitli bor kimyasallarına dönüştürülür. Tüketilen bor ürünlerinin %85'e yakını cam (yalıtım tipi cam elyafı, tekstil tipi cam elyafı, borosilikat cam), seramik-frit, tarım ve deterjan sektörlerinde yoğunlaşmıştır. Sektörler içerisinde tarım sektöründe, temizlik/deterjan sektöründe kullanılmaktadır (Woods, 1994). Bor mineralleri; küflenmeyi önlemek amacıyla, yapay ve yavaş eriyen gübre üretiminde, bakterisit ve fungusit üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca Fenil Borik Asit ve kaynakları böcek ve bakteri öldürücülerde etki artırıcı madde olarak kullanılırlar ve zehirlidirler (Demirtaş, 2004). Bunun yanı sıra bor, gıdalara bulaşan mikroorganizmaların ortamdan uzaklaştırılmasında (sterilizasyonda) kullanılmaktadır (Nielsen, 2004).

Bor; havada, suda ve toprakta bulunmaktadır. Ancak buralarda ne kadar süreyle kaldığına dair yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Borun sağlığa olan etkisini belirleyen birkaç faktör bulunmaktadır. Bunlar dozu (alınan miktarı), süresi (ne kadar süreyle maruz kalındığı), hangi yolla maruz kalındığı (solunum, yeme, içme veya deri yoluyla) diğer kimyasal maddeler ve bireysel özelliklerdir (yaş, cinsiyet, sağlık durumu gibi) (US Public Healt Service, 1992).

2.2. Borun Canlılar Üzerine Etkileri

Yüksek konsantrasyonda borik asit canlı hücreler için toksik etki gösterse de bazı mikroorganizmalar da bu duruma tolerans gösterebilirler. Mikroorganizmaların ekstremofil olarak adlandırılan grubu yüksek ya da düşük pH, tuz, basınç, ısı, soğuk, sıcak gibi aşırı ortamlarda yaşamaktadır. Ekstremofiller temel ve uygulamalı bilimlere kaynak sağlamaktadırlar. Bora tolerans gösteren organizmalar da ekstrem organizmalara örnek gösterilmektedir (Nable vd., 1997).

Özellikle sulama suyu için tehlikeli olan bor, sıcak sularda en çok bulunan kirleticilerden biridir. Bor içinde bulunduğu suyun pH değerine göre farklı formlarda yer

alır. Asitli sulara $B(OH)_3$, bazik sulara $B(OH)_4$ şeklinde bulunur (Barth, 2000). Türkiye'de borik asit ile kirlenmiş içme ve yer altı suları düşük yağışlı alanlarda toprakların tuzluluğunun ve alkaliliğin artması gibi bir dizi çevresel probleme sebep olduğu bildirilmektedir. Bor kirliliği yer altı sularında buharlaşma ile birikmektedir (Uygan ve Çetin, 2004).

2.2.1. Borun toprak ve su üzerine etkileri

Bor, yeraltı suyunda doğal olarak, yüzey sularında endüstriyel kirletici olarak veya tarımsal yüzey akışlarının ve çürüyen bitki materyallerinin bir ürünü olarak bulunabilir (Provin ve Pitt, 2002). Borun suya etkisi iki açıdan değerlendirilmektedir. Birincisi, içme sularına olan etkisi, ikincisi ise tarımsal sulara olan etkisidir. Tarımsal faaliyetler ve diğer sektörler geliştikçe çevresel kirlenmeler de artmaktadır. Bitkiler için gerekli olan, ancak özellikle 1 ppm 'den fazla bor içeriğine sahip suların sulamada kullanılması bitkilerde ve topraklarda sorun yaratabilmektedir (FAO, 1976). İçme sularının yüksek oranda bor içermemesi insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

2.2.2. Borun bitkiler üzerine etkileri

Bor, bitkiler tarafından B_4O_7 , H_2BO_3 , HBO_3 ve BO_3 gibi bir ya da birden fazla iyon formlarında alınmaktadır. Bitkiler, bora genellikle az oranlarda ihtiyaç duyarlar (Tisdale ve Nelson, 1983). Fakat buna rağmen, bor bitki beslenmesinde önemli bir mikro element olarak bulunmaktadır. Bitkilerce alınan borun büyük bir kısmı hücre duvarında birikmekte ve stabilitesini yükseltmektedir. Nükleik asit sentezi ve dolayısıyla protein oluşumu için doğrudan önemlidir. Bor genel olarak karbonhidrat metabolizması ve taşınması üzerinde rol oynar. Kök gelişimi, çiçek ve meyve oluşumu üzerinde fizyolojik rollere sahiptir (Finck, 1969). Borun az alınmasında bu işlevler azalmakta, normalin üzerinde bor alınmasında ise zehir etkileri meydana gelmektedir. Yetersiz bor alınımında ayrıca, metabolizma bozuklukları, köklere özümleme ürünü sağlanmasında yetersizlik, aktif iyon alım engellenmesi ve dolaylı olarak su alımı zarar görmektedir. (Finck, 1969; Uygan ve Çetin, 2004).

Bor, bitkileri geliştirmek için kullanıldığı gibi gelişimi önlemek için de kullanılabilir. Yabani ot kontrolünde ve toprak sterilizasyonunda da kullanılmaktadır (Uygan ve Çetin, 2004).

2.2.3. Borun hayvanlar üzerine etkileri

Borik asidin hayvanlar için öldürücü dozu, hayvanın türüne bağlı olarak hayvanın her kg'ı için 1,2-3,45 gr arasında değişmektedir. Hayvan içme suyunda 2500 mg/1 borik asit bulunması büyümeyi engellediği için zararlıdır. Ayrıca yüksek dozlarda alındığında akut zehirlenme belirtileri ve ölüm meydana gelmektedir. (Uygan ve Çetin, 2004).

Borik asit günümüzde zararlılarla mücadelede kullanılmaktadır. Bunun nedeni, kısırlaştırıcı etkisinden dolayı böceğin çoğalmasını önüyor olmasıdır (Uygan ve Çetin, 2004).

2.2.4. Borun mikroorganizmalar üzerine etkileri

Mikroorganizmalar sularda kontaminasyona sebep olan toksik bileşikleri akümüle edebilir veya adsorplayabilir. Ancak bor için böyle bir mikroorganizma bildirilmemiştir (Miwa ve Fujiwara, 2009).

2.2.5. Borun insanlar üzerine etkileri

Bor vücuda girer girmez % 90-95 kadarı vücutta birikmeden genellikle üre, dışkı, süt ve ter ile vücuttan atılır. Yalnızca, kemik, tırnak ve kıllarla karaciğer ve dalak gibi organlarda az miktarda birikmektedir. Yapılan araştırmalar borun toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Borun toksik etkisi çocuklarda havale, koma gibi beyin zarı tahribi; yetişkinlerde ise baş ağrısı, kusma, ishal, heyecan veya depresyon şeklinde etkileri görülmektedir. Parmak uçlarında görülen pembe renk, bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik görünüşlerdir (Mckee ve Wolf, 1963). Öldürücü doz çocuklar için 5-6 g, yetişkinler için ise 10-25 g'dır (Baykut, 1987).

Borun insan vücudu için zararlı etkilerinin yanı sıra, çok yararlı etkileri olduğu da tespit edilmiştir. Borun kalsiyum ve D vitamini olmak üzere vücut minerallerinin düzenlenmesinde rol oynadığı, kalsiyum ve magnezyumun azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca küçük çocukların öğrenme yeteneklerinin ve okul becerilerinin artmasına katkıda bulunduğu, sportif performans ve atletik yapının gelişmesi için tablet şeklinde bor alındığı bilinmektedir (Uygan ve Çetin, 2004).

2.3. Bor İçeren Alanlarda Prokaryotların ve Metabolik Fonksiyonlarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Son yıllarda ekstremofillerle yapılan çalışmalar daha çok bu mikroorganizmaların kendileri ya da ürünlerinin potansiyel biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni mikrobiyal suşların izolasyonu, yeni bileşiklerin ve metabolik yol izlerinin tanımlanması, hücresel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile olası potansiyel de giderek artmaktadır (Satyanarayana vd., 2005).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında, moleküler yöntemler gündeme gelinceye kadar klasik yöntemler kullanılmıştır. Fakat klasik mikrobiyal analizler her zaman mikroorganizmaların kültüre edilmelerine ve karakterizasyonlarına olanak vermemektedir. Biyosferde sıra dışı organizmalarla dolu olan keşfedilmemiş habitaların varlığı buna kanıttır. Bu organizmalar, yeni izolasyon ve kültürasyon teknikleri ile açığa çıkartılabilir (Pondexter ve Leadbetter, 1986). Yapılan mikrobiyal ekoloji çalışmalarına göre, mikrobiyal çeşitliliğin çok azı bilinmektedir. Son 10 yılda mikrobiyolojik teknikler ve moleküler tekniklerin kombinasyonu ile çalışmaların yapılması sonucunda her geçen gün tanımlanabilen tür sayısı artmaktadır. 2000 yılında tanımlanan tür sayısı 5000 civarında iken, günümüze kadar geçen süreçte tanımlanan prokaryotik çeşitlilik üyelerinin toplam cins sayısı 2600, toplam tür sayısı 14800'e ulaşmıştır (online: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>; erişim tarihi: 26/07/2016).

Örneklendirecek olursak, son yıllarda *Bacillus* cinsi incelenmiş, birçok yeni cins kapsamına dayalı 16S rRNA gen dizilimleri ve kemotaksonomik veri için analizler yapılmıştır (Wisotzkey vd., 1992; Ash vd., 1993; Shida vd., 1996; Heyndrickx vd., 1998).

rRNA yaklaşımı gibi kültürden bağımsız yöntemlerle karşılaştırıldığında kültüre bağlı yöntemlerle mikroorganizmaların küçük bir kısmı (<5%) belirlenebilmektedir. rRNA yaklaşımı biyoçeşitliliğin ortaya çıkarılmasında bir kilometre taşı olmuştur. Ancak canlı organizmaların metabolik özellikleri hakkındaki bilgiler bu yöntemle tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle organizmaların biyoteknolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalarda organizmanın kültürel olarak üretilmesi gerekli ve zorunludur (Satyanarayana vd., 2005). İlk çalışmalar çevresel örneklerden direkt olarak izole edilen ribozomal DNA'nın klonlanmasını içerir. Çevresel DNA örneklerinden gelen bu klonların daha sonra

dizi analizlerinin yapılması ile tanımlama gerçekleştirilmektedir. Moleküler mikrobiyal ekoloji çalışmalarını bir adım daha öne götüren diğer teknik ise PCR olmuştur. Çevresel örneklerin rRNA amplifikasyonlarını takiben dizi analizlemeleri komünite analizlerine hız kazandırmıştır (Mullis ve Floona 1987; Saiki vd., 1988).

Grup spesifik primerlerin bulunmasıyla yöntem giderek daha başarılı hale gelmiştir. 16S rRNA'nın çevresel örnekten (karasal ya da sucul ortamlardan) direkt amplifikasyonla eldesinden sonra bunların gen kütüphanesi oluşturulup otomatik dizi analizleme ile yeni tip mikroorganizmalar bulunabilmiştir (Grant, 1999; DeLong, 1993; Benlloch vd., 1995; Benlloch vd., 2001).

Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) ve klonlama gibi moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesi mikrobiyal ekoloji alanında önemli gelişmelere öncülük etmiştir (Hugenholtz vd., 1998).

Diğer bir moleküler yöntem olarak FISH, organizmaları görülebilme, sayılabilme ve komünitedeki dağılımlarını eş zamanlı gösterme açısından önemli bir tekniktir (Aman vd., 1995).

FISH hibridizasyonu hücre içinde hedef rRNA ile işaretelenmiş morfolojik olarak bozulmamış floresansla işaretlenmiş bir nükleik asit problemlerinin kullanımını gerektirir. Hibridize olmuş rRNA'lar floresan mikroskopisi ile görülebilmektedir. Bu korunan ve değişken olan rRNA bölgeleri hedefi seçerek yapılır. Bu şekilde uygun rRNA sekansı seçerek, FISH tüm bakteriyal ya da hücre popülasyonunu tespit edebilmektedir (Zhang vd., 2004).

2.4. Borla Kirlenmiş Alanlardan İzole Edilen Diğer Mikroorganizmalar

Bacillus boroniphilus sp

Gram (+) olan bakteri Ahmed vd.adaşları tarafından Kütahya/Hisarcıktan izole edilmiştir. Bu bakteri 16s rRNA dizi analizine göre ve fenotipik, kemotaksanmik ve filogenetik özellikleri bakımından *Bacillus sp.* ile benzerlik göstermiştir. %7 NaCl toleransı göstermiştir. Yaşadığı optimum pH aralığı da 7.5-8.5'tur (Ahmed vd., 2007).

Gracilibacillus boraciütolerans sp.

Gram (+) olan bu bakteri genotipik, karakteristik, morfolojik olarak yapılan testler sonucunda *Gracilibacillus halotolerans*'a benzer olduğu gösterilmiştir. %11 NaCl toleransı göstermektedir. Yaşadığı optimum pH aralığı da 7.5-8.5'tur (Ahmed vd., 2007).

Variovorax boronicumulans sp.

Gram (-) olan bakteri, 16s rRNA dizi analizine göre ve fenotipik, kemotaksanomic ve filogenetik özellikleri bakımından *Variovorax sp.*'ye benzer olduğu gösterilmiştir. %0-1 NaCl toleransı göstermektedir. Yaşadığı pH aralığı da 5-9'dur (Miwa vd., 2008).

Rhodococcus baikonurensis

Gram (+) olan bu bakterinin 16s rRNA dizi analizi yapılmış ve fenotipik, kemotaksanomic ve filogenetik özellikleri belirlenmiştir. %11 NaCl toleransı göstermektedir. Yaşadığı pH aralığı da 5-9 arasındadır (Yoon vd., 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich, Fluka ve Merck'ten temin edilmiştir. Mikroorganizmaların tanımlanması çalışmalarında kullanılan kimyasal, enzim ve kitler Invitrogen, Fermentas MBI, New England Biolabs, Bionline, Biobasic, Beckman Coulter, Promega ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermal cycler	Techne, Applied Biosystems
pH Metre	WTW, Almanya
Jel Dökümantasyon sistemi	Uvitec, UK
Saf su cihazı	Mes Mp Multipure
Mikrosantrifüj	Centurion Scientific K3 series, UK
Yatay jel elektroforezi	Clever Scientific, UK
Elektroforez için güç kaynağı	Clever Scientific, UK
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Çalkalamalı incubator	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Almanya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya

Çizelge 4.1 (devamı) Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
UV-visible spektrofotometre	Schimadzu, Japonya
Vorteks	IKA MS2 minishaker
Sıcak su banyosu	Memmert, Almanya
Hibridizasyon fırını	Biometra OV3
Stereo mikroskop	Wild M3Z
Etüv	Binder, USA
-85 °C derin dondurucu	Dairei, Japonya
Pipet seti	Nichipet, Eppendorf, Biohit
Mikroskop	Olympus
Hassas terazi	Ohaus

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerlerinin içerikleri izleyen metinde verilmiştir.

3.1.3.1.Luria Bertani (LB) Besiyeri (g/L)

Sodyum klorür	10 g
Maya özütü	5 g
Tripton	10 g
Distile su	1000 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH 7,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmış ve sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması %2 agar ilave edilmesi ile yapılmıştır (Dyall-Smith, 2004). Ayrıca besiyerlerine 1000 mL için sırasıyla 50 mM, 100 mM, 200 mM oranlarında borik asit eklenmiştir.

3.1.3.2. Tryptic Soy Broth (TSB) (g/L)

Kazein pepton	17 g
Soymeal pepton	2,5 g
Dekstroz	2,5 g
Sodyum Klorür	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Distile su	1000 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH 9'a ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması %2 agar ilave edilmesi ile yapılmıştır. Ayrıca içerisine 0,06 g borik asit ilave edilmiştir.

3.1.3.3. Tripton Broth (g/L)

Tripton	10 g
Sodyum Klorür	5 g
Distile su	1000 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.4. Simon's Sitrat Agar (g/L)

Amonyum dihidrojen fosfat	1 g
Dipotasyum Fosfat	1 g
Sodyum Klorür	5 g
Sodyum Sitrat	2 g
Magnezyum Sülfat	0,2 g
Bromtimol Blue	0,08 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir

3.1.3.5. Triple Sugar Iron (g/L)

Enzymatic Digest of Casein	5 g
Enzymatic Digest of Animal Tissue	5 g
Yeast Enriched Peptone	10 g
Dekstroz	1 g
Laktoz	10 g
Sükroz	10 g
Ferrik Amonyum Sitrat	0,2 g
Sodyum Klorür	5 g
Sodyum Tiyosülfat	0,3 g
Fenol Red	0,025 g
Agar	13,5 g
Distile su	1000 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH 7,5'a ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.6. MR-VP Broth (g/L)

Tamponlanmış pepton	7 g
Glukoz	5 g
K ₂ HPO	5 g
Distile su	1000 mL

Tüplere dağıtılan besiyeri 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve sonrasında +4 C'de saklanmıştır (Tamer vd., 1989).

3.1.3.7. Laktoz Broth (g/L)

Pepton	2,5 g
Laktoz	2,5 g
Et ekstresi	1,5 g
Fenol red	0,012 g
Distile su	500 mL

Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'ı 6,9'a ayarlanmış, tüplere 10 mL aktarılıp içlerine durham tüpü atıldıktan sonra 121°C de 15 dakika sterilize edilmiştir (Tamer vd., 1989).

3.1.4.Çalışmada kullanılan çözeltiler

3.1.4.1.TAE 50X (g/L)

Tris base	242 g
Asetik asit	57,1 mL
EDTA (0.5 M pH 8)	100 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

3.1.4.2.Elektroforez için Yükleme Tamponu (6X)

Ksilensiyanol 0,25%

Bromofenol blue 0,25%

Gliserol 30%

Oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

3.1.4.3.Lizozim Solüsyonu (10 mg/mL)

Lizozim	100 mg
EDTA (0.5 M)	1 mL

Tris-HCl (1M)	1 mL
Steril distile H ₂ O	8 mL

Filtre ile sterilize edilerek kullanılır. -20 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

3.1.4.4. KOH çözeltisi (% 40'lık)

40 g KOH, 75 mL distile suda çözülerek çözelti oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve sonrasında 0,3 g kreatin ilave edilerek iyice çözüldükten sonra, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.5. α -Naftol çözeltisi

5 g α -naftol, 100 mL % 95'lik etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4.6. Kovaks çözeltisi

5 g para-dimetil amino benzaldehit 75 mL butil alkolde çözülerek su banyosunda hafifçe ısıtılmış olup tamamen çözüldükten sonra 25 mL % 37'lik HCl dikkatlice ilave edilerek karıştırılmıştır.

3.1.4.7. İyodür (Lugol) çözeltisi

1 g iyot ve 2 g KI havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş 300 mL distile su eklenerek karıştırılmıştır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.8. Safranin boyası

0,25 g safranin 10 mL % 95'lik etanolde çözülerek, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve iyice karıştırılarak filtre kağıdından süzümüştür (Tamer vd., 1989).

3.1.4.9. Kristal viyole boyası

20 mL % 95'lik etanolde 2 g Kritical viyole çözülmüş ve 80 mL distile suda 0,8 g amonyum oksalat çözümlenerek, bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyole'ye ilave edilmiştir (Tamer vd., 1989).

3.1.4.10. Bromtimol Mavisi (g/100 mL)

Bromtimol mavisi	0,4 g
NaOH	6,4 mL
Distile su	93,6 mL

Bromtimol mavisi havana konarak NaOH ile iyice karıştırılarak eritilmiştir. Sonra distile su katılarak iyice karıştırılmış ve besi yerlerine % 0,2 – 0,4 oranında katılır.

3.2. Yöntem

3.2.1.Çalışma alanlarının özellikleri ve su örneklerinin alınması

Örnekleme alanlarının belirlenmesinde hedef organizmaların yaşayabileceği en uygun fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip alanlar seçilmiştir. Bu amaçla örnekleme yeri olarak Eskişehir il merkezinden yaklaşık 150 km uzaklıkta bulunan Eskişehir Kırka Eti Maden İşletmelerine ait maden drenaj havuzundan su örnekleri alınmıştır. Bor madeni ve civarının görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Örnekleme alanlarından 2014 Nisan ayında örnekler alınmıştır. Yapılan örnekleme + 4 °C'de muhafaza edilerek en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır.

Seçilen örnekleme yerlerine ait olan Eskişehir Kırka Eti Maden İşletmelerine ait görüntü, Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bor madeni ve civarının uydu görüntüsü (maps.google.com)



Şekil 3.2. Eskişehir Kırka Maden İşletmelerine ait, Bor maden drenaj gölleri (Fotoğraf, Damla BOZKURT, Nisan 2014)

3.2.2.Örneklerin bor ve metal içeriklerinin belirlenmesi

Alınan su örneklerinde bulunan metal miktarları ICP-AES (Perkin Elmer 3100) cihazında Balıkesir Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında ölçülmüştür. Bor ölçüm yöntemi için öncelikle reaktifler hazırlanmıştır. Bor Stok Çözeltisi (1000 mg/L) için NIST izlenebilir tek element plazma sınıfı standardı kullanılmıştır. Bor Stok Çözeltisi (10 mg/L) için 1000 mg/L B stok çözeltisinin 10 mL'sini 1 L hacimli kap içine pipetle alınmıştır. Saf su ile hacmine tamamlanmış ve iyice karıştırılmış ve plastik bir şişe içinde saklanmıştır. Sonrasında 10 mg/L B stok çözeltisinin 0,1 ve 3 mL'sini pipetle alınmıştır ve saf su ile 100 mL hacme getirilmiştir. Bu sırasıyla 0; 0,10 ve 0,30 mg B/L standart bor konsantrasyonları ile sonuçlanmaktadır. Plastik kap içinde hazırlanmış, saklanmıştır.

Ekstraksiyon için; havada kurutulmuş, 2 mm elekten geçirilmiş topraktan, 125 mL'lik plastik kaplara 4 cm³ (5 g) tartılmıştır. 25 mL saf su ilave edilmiştir. Saf su, ekstre edilebilen B'de hiçbir anlamlı değişiklik olmaksızın süzüntüdeki bulanıklığı azaltmak üzere, 10 mM CaCl₂ ile ikame edilebilmektedir. (Jeffery ve McCallum, 1988 ve Watson, 1988). Kapları, tersine sıcak su çalkalama banyosunda doldurulmuş ve karışımları 30 dakika süreyle 80 °C'de çalkalanmıştır. Whatman #1, 150-mm çaplı filtre kağıdı kullanarak, 125 mL'lik Erlenmeyer kaplar içine filtre edilmiştir.

Analizi için ise; ICP'yi boş çözelti olarak saf su ve 0.30 mg/l bor standartları ile kalibre edilmiştir. 0.10 mg/L standardı eğri doğrulama kontrolü olarak kullanmıştır. Bu standardı kalibrasyondan hemen sonra ve son toprak numunesinden sonra analiz edilmiştir. Süzüntüyü ICP emisyon spektrografında analiz edilmiştir. Analiz edilen numunelerin her bir seti ile bir kalite kontrol numunesi ve bir tekrar numunesi hazırlanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki gibidir.

1. Toprak $B_{mg/kg} = \text{ICP ekstre B okuması} \times 25/5$ (Denklem 3.2.2.1)

2. Toprak $B_{lbs/akre} = \text{toprak } B_{mg/kg} \times 2$ (Denklem 3.2.2.2)

25/5'lik seyreltme faktörü, kullanılan toprağın ağırlığına bölünen, ilave edilen saf suyun hacmidir. 2 faktörü mg/kg'ı lbs/akreye çevirmektedir.

Bor; 0,01 mg B/L hesaplanan yöntem teşhis sınırı ile 249,6 nm dalga boyunda Thermo Jarrell-Ash Enviro 61E ICAP Spektrometre kullanılarak ölçülmüştür. ICP tekniğinin basit ve hızlı olduğu ve sulu ekstreden Bor tayini için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

İşlemler bittikten sonra yeniden bor analizleri için borosilikat olmayan cam kaplarda saklanmıştır.

3.2.3.Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri

Alınan örneklerdeki mikrobiyal komünitenin belirlenmesi için kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler olmak üzere iki ayrı strateji izlenmiştir.

3.2.3.1.Kültüre bağlı yöntemler

i) Mikroorganizmaların izolasyonu ve sayımı

Homojen hale getirilen su örneklerinden bakteri izolasyonu amacıyla 10 mL alınarak 90 mL steril serum fizyolojik çözeltilisinde (%0.9) süspanse edilmiş ve bu çözeltiden 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. Her bir dilüsyondan 100 µl alınarak yayma plaka yöntemi ile hazırlanan besi ortamlarına ekim yapılmıştır. Mikroorganizmalar için toplamda 4 farklı izolasyon ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerleri 50, 100 ve 200 mM borik asit içeren Luria agar ve 10 mM borik asit içeren Triptik soya agardır. Besiyerlerinin içerikleri 3.1.3 bölümünde verilmiştir. Çevresel örneklerden hazırlanan katı besiyerlerine seri dilüsyon ile ekimler yapılmış, 30 °C'de inkübasyona bırakılmış ve mikroorganizma gelişimi takip edilmiş, besi ortamında tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçilerek kendi gelişim gösterdiği besiyerine ekimler yapılmış ve izolatların saf kültürleri elde edilmiştir. Saf kültürler elde edildikten sonra hücre morfolojileri, basit boyama teknikleri ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen kültürlerin saflığının kontrol edilmesi, morfolojilerinin ve Gram özelliklerinin belirlenmesi amacı ile Gram boyama tekniği ile boyama yapılmış, her bir örnek ışık mikroskopunda incelenmiştir. Saf izolatlar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

ii) İzolatların biyokimyasal testleri

Gram boyama

Gram boyama işlemi Smith ve Hussey (2005)' in belirlediği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurutmaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra tesbit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamaların üzerine mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viyole damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Kristal viyole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamaların üzerine lugol dökülerek yine 1 dakika bekletilmiştir. Boya suyla uzaklaştırılmış ve lamalar %95'lik alkol ile 15 - 20 saniye yıkanmıştır. Arındırılan film tabakasını üzerine safranin eklenerek 30 saniye bekletildikten sonra boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar, havada kurutularak immersiye yağ ile 100 X'lik objektifte, ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Koyu mor (menekşe renkli olan mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak tanımlanmıştır (Tamer vd., 1989).

Katalaz testi

Besi ortamlarında geliştirilmiş 24 saatlik kültüre 35 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek bu aktif kültürler üzerine % 3 H₂O₂ damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenip gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilecektir.

İndol testi

İncelenecek bakteri kolonisinden özeye alınarak temiz bir tüp içinde bulunan triptofan bulunan bir sıvı besiyerine ekim yapılır. Tüpler etüvde, 37°C'de 1-5 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtmak suretiyle 0,5 mL kovaks ayırıcı ilave edilir ve tüp çalkalanır. Kovaks yerine Ehrlich ayırıcı da kullanılabilir. Renk değişimi gözlenir; 1-2 dakika içinde besiyerinin üst kısmında, parlak kırmızı bir halka oluşması, testin pozitif olduğunu (indol formasyonunu), sarımsı halka ise testin negatif olduğunu (indol oluşmadığını) gösterir.

Sitrat testi

İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak tüpteki Simon's Sitrat Yatık Agar besiyerinin yüzeyine ekim yapılır. Tüpler etüvde, 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda, orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0,2'lik Bromo timol mavisi kullanılan besiyerinde, besiyerinin rengi maviye dönüşür ve pozitif olarak değerlendirilir.

Voges - Proskauer (VP) testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak tüpteki Glukoz-Fosfat Broth besiyerine ekim yapılır. Tüpler etüvde, 37°C'de 1-7 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üzerine, 1 mL %40'luk KOH, daha sonra 3 mL %5'lik alfa naftol ilave edilir ve karıştırılır. Besiyerinin hava ile temas etmesi için kuvvetli çalkalandıktan sonra 2-5 dakika içinde pembe-kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

Hidrojen sülfid testi

İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak Triple Sugar Iron (TSI) yatık agarlı tüpe dikine ve dibine batırılarak ekim yapılır. Daha sonra yatık olan yüzeye zig zag şeklinde çizilir. Daha sonra 37°C'de 3 gün inkübe edilir. İnokülasyon çizgisi boyunca siyahlaşma H₂S varlığını gösterir. Bu durum bazı mikroorganizmaların kükürt içeren aminoasitleri parçalayarak oluşturdukları H₂S'in ortamdaki ağır metal tuzlarıyla siyah metal sülfürleriyle oluşturmasından ileri gelir.

Fenol testi (Karbonhidrat fermentasyon testi)

İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak içinde durham tüpü bulunan Fenol redli laktoz Brothlu tüplere aşılama yapılır. Daha sonra 37°C'de 3 gün inkübe edilir. Besiyerinde nutrient broth + %0.5 laktoz + fenol indikatörü vardır. Laktoz kullanıldığında asit oluşumu varsa indikatörün rengi kırmızıdan sarıya döner. Asit oluşumuyla birlikte gaz oluşumu da varsa deney tüpünün içindeki durham tüpünde gaz oluşumu görülmektedir.

İzolatların tuz isteklerinin belirlenmesi

Elde edilen izolatlardan tuz isteklerinin belirlenebilmesi için %2, %6, %12, %18 ve %23 oranlarında besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.

İzolatların optimum büyüme için ihtiyaç duyduğu pH değerinin belirlenmesi

İzolatlar pH'sı 5, 7, 9 ve 11'e ayarlanmış LB besiyerlerine ekildikten sonra 37°C, etüvde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında gelişme için optimum pH nın tüm izolatlar için 7-8 arasında olduğu belirlenmiştir.

İzolatların farklı karbon kaynaklarını kullanma durumunun belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test yapılmış izolatlar glukoz, laktoz, galaktoz, sükroz ve dekstroz kullanabilme yetenekleri araştırılmıştır.

iii) İzolatların moleküler identifikasyonu

Stereo mikroskop altında elde edilen saf izolatlardan tek koloni alınarak 20 µL lizis tamponu (%0,25 SDS, 0,05M NaOH) içinde resüspanse edilmiş, reaksiyon tüpü 95°C'de 15 dakika bekletilmiş ve sonrasında 1:5 oranında ultra saf su ile dilüe edilmiştir. Bu lizise uğratılmış bakteri kolonisi, kurulacak PCR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu için alternatif bir yöntem daha kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu için mikroorganizma peleti kullanılmıştır, yöntem Cifuentes vd. (2000) ve Nogales vd. (1999)'a göre bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir: Kısaca pelet, 600 µL ekstraksiyon tamponunda (100 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM EDTA) resüspanse edilmiş ve 6 µL lizozim (3 mg/mL) eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında %10 SDS (60 µL), 9 µL proteinaz K (150 µg/mL) eklenmiş ve bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 120 µL 5 M NaCl eklenmiş ve ters-düz çevrilerek resüspanse edilmiştir. 90 µL CTAB (%10 CTAB, 0.7M NaCl)

resüspanse karışıma eklenmiş ve 10 dakika 65°C'lik su banyosuna alınmıştır. Karışım su banyosundan alınarak 1–2 dakika sıvı azotta bekletilmiştir. Donan tüp yeniden 65°C'lik su banyosunda bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır ve sonra yine sıvı azot işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem en az 3 kez tekrarlandıktan sonra 900 µL Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) karışıma eklenmiş ve 5 dakika 4 °C'de 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz alınmış ve alınan miktar kadar Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) sıvı faza eklenmiştir. Bu işlem protein ara fazı indirgenene kadar devam ettirilmiştir. Sonrasında 80 µL sodyum asetat (3M pH:4.8), 480 µL isopropanol, 8 µL MgCl₂ (1M) eklenmiş ve 30 dakika 13.000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra –20 °C'de bekletilmiş olan %70'lik alkolden 100 µL pelet üzerine eklenmiştir. 15 dakika 13.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Alkol pipet ile uzaklaştırıldıktan ve pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 µL DEPC ile pelet resüspanse edilmiştir (Cifuentes vd., 1999; Nogales vd., 2000). DNA varlığını kontrol etmek için 2 µL örnek %0.8'lik agaroz jelle yüklenmiş ve 1X TAE tamponda yürütülmüştür. İncelenecek nükleik asitin tipine göre jellerde 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) marker olarak kullanılmıştır. Çukurlara 5 µL örnek ve 1 µL jel yükleme boyası olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Tüm jellerde DNA'nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µL konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuşlar ve 312 nm dalga boyunda UV veren transilluminatörler yardımıyla gözlenmişlerdir. Jel fotoğrafları BioRad Jel Dökümantasyon sistemi ile (Digi Doc) elde edilmiştir. DNA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere –20°C'de saklanmıştır (Cifuentes vd., 2000; Nogales vd., 1999).

PCR için kullanılan primerler 27F ve 1492R olmuştur. Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon bileşenleri ve şartları aşağıdaki gibidir (Okibe vd., 2003).

PCR bileşenleri

5X renksiz tampon	4 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL
MgCl ₂	2 µL
İleri primer (bakterie için 27F)	0,4 µL

Geri primer (bakteri için 1492R)	0,4 µL
DMSO	0,4 µL
GoTaq Hot Start enzim	0,2 µL
Ultra saf su	9,6 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR koşulları (16S PCR bakteri)

İlk denatürasyon:

95 °C 5 dakika (Denatürasyon),

Bağlanma:

95 °C 30 saniye

55 °C 1 dakika

72 °C 1 dakika 30 saniye

Bu şekilde 30 döngü devam ettirilmiştir,

Uzama:

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Escherichia coli* DNA'sı Eubacteria için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde (1X TAE çözeltisinde) gözlenmişlerdir (Anton vd., 1999). Elde edilen PCR ürünleri SureClean çözeltisi kullanılarak saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir.

Moleküler identifikasyon için Sanger dizileme tekniği kullanılmıştır. İzolatların dizi analizi sonrası gen analizleri NCBI "National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)" veritabanındaki BLAST (Altschul vd., 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece dizi analizinde elde edilen dizilerin filogenetik benzerlikleri ortaya koyulmuş ve MUSCLE program filogenetik ağaçlar çizilmiştir.

iv) Amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA)

Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon (ARDRA) olarak isimlendirilen teknik 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerinin restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimine dayanmaktadır. İşlem sonunda elde edilen fragmentler jelde elektroforeze tabi tutularak gözlenirler. Bu yöntem ile ortaya çıkarılmış olan profillere göre, çok kısa zaman içerisinde çok fazla izolata ya da klona ait, genotipi yansıtan, karakteristik bantlar belirlenerek bunların analiz edilmesi sağlanabilmektedir. Özellikle çevresel örneklerden gen kütüphanesi kurularak yapılan çalışmalarda, gen çeşitliliğini kısa sürede gözler önüne süren bir tekniktir (Liu vd., 1997; Tiedje vd., 1999).

Karışım 1

Hae III	1 µL
Tampon C	1 µL
Serum Albümin 1/10	1 µL
DNA	5 µL
MQ Su	2 µL

Reaksiyon hacmi 10 mL olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. 2 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır ve sonunda Elektroforez' de (90 V, 4 saat) yürütülmüştür.

Karışım 2

HINF I	0,5 µL
Buffer	1 µL
DNA	5 µL
MQ Su	3,5 µL

Reaksiyon hacmi 10 mL olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır ve sonunda Elektroforez' de (90 V, 4 saat) yürütülmüştür.

Karışım 3

0,5 M CFO	0,5 µL
0,5 M MSP	0,5 µL
DNA	5 µL
Tampon B	1 µL
MQ Su	3 µL

Reaksiyon hacmi 10 mL olacak şekilde karışım hazırlanmıştır ve 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır ve sonunda Elektroforez' de (90 V, 4 saat) yürütülmüştür.

3.2.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu testi ile bor toleransının belirlenmesi

Bir maddenin mikroorganizma ile inkübasyon sonrası büyümesini durduran en düşük doz Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu'dur (MİK). Bu amaçla izolat(lar)ın bor bileşiklerine karşı olan tolerans düzeyi MİK yöntemi ile ölçülmüştür (Yılmaz, 2012; Washington, 1980). Bunun için borik asidin 1/2 ve 1/64 arasında değişen dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Taze mikroorganizma kültüründen 0,5 McFarland turbiditeye sahip kültür hazırlanmıştır (10^8 CFU/mL). Aynı miktarda kültür tüplere ilave edilerek 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmış, pozitif kontrol olarak bor toleransı yüksek olan mikroorganizmalar kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklem Yerleri ve Alınan Su Örneklerinin Bor ve Metal Analizleri

Alınan su ve toprak örneklerinde bulunan bor ve metal miktarları ICP-AES (Perkin Elmer 3100) cihazında ölçülmüştür. Toprakta alınan örneklerdeki bor miktarının belirlenmesi için Gupta, U. C. 1967 tarafından uygulanan metod kullanılmıştır. Örneklerin alındığı alan ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2-4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.2 Örneklerin alındığı yerler

Örnek Adı	Örneğin alındığı alan
1	Fabrika katı atık
2	Ocak tabanı gölet (su)
3	Ocak tabanındaki gölet kenarı (toprak)
4	Cevher Tabakası (toprak)
5	Killi cevher tabakası (toprak)
6	Killi cevher tabakası su birikintisi (su)
7	Cevher üzerindeki örtü tabakası (kireçli)(toprak)
8	Cevher üstü örtü tabakası (su)
9	Cevher üstü örtü tabakası-tumba (pasa)(toprak)
10a	Gölete açılan ağız (su)
10b	Gölete açılan ağızdan önceki birikinti(su)
10c	Gölete açılan ağız(etrafında tuzlanma olan yer) (su)

Çizelge 4.3 Alınan örneklerin Bor miktarları

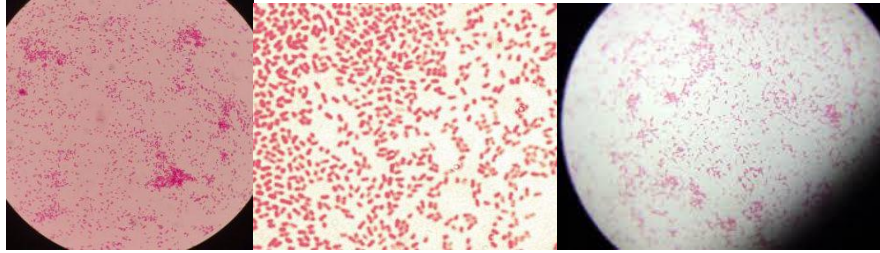
Örnek Adı	Formül	Bor miktarı mg/L	Alındığı yer
ICP2	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*300	3213	Su
ICP6	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*300	4923	Su
ICP8	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*300	2807,7	Su
10a	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*101	3633,98	Su
10b	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*101	3831,94	Su
10c	Bor miktarı mg/L=Kons.(örnek)std.dev.değeri*101	4325,83	Su
ICP1	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	75999	Toprak
ICP3	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	28005	Toprak
ICP4	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	17205	Toprak
ICP5	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	94170	Toprak
ICP7	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	9729	Toprak
ICP9.1	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	3594	Toprak
ICP9.2	Bor miktarı mg/kg=Kons.(örnek)std.dev.değeri*1500	2568	Toprak

Çizelge 4.4. Örneklerin metal içerikleri (g/L)

Metal Adı	V	Ba	Zn	Mn	Cd	Ni	Fe	Pb	Co	Cr	Al	Cu	Sn	Mo	Mg
1	1,4	37,8	32,9	70,4	0,4	3,3	1298	3,8	1,55	9,05	7547	64,15	-	1,25	-
2	-	1,4	0,45	0,5	0,6	0,8	-	0,25	0,65	0,6	-	-	0,8	9,2	772,5
3	0,9	18,5	31,2	45,2	0,3	3,3	1346	4,2	0,85	7,5	2464	32,8	-	-	7280
4	1,15	13,1	42	72,2	0,4	3,6	1612	5,1	0,7	5,4	3027,5	21,95	-	-	7410
5	1,1	18,8	35,25	51,15	0,4	3,6	1271,4	2,05	0,65	5,5	3507	17,35	-	-	-
6	0,25	0,6	0,55	02,2	2,3	0,65	-	0,15	0,15	0,10	-	-	0,55	7,85	252,85
7	-	12,85	21,3	31,3	0,25	2,15	504	0,45	0,55	4,3	3783,5	15,65	-	-	-
8	-	3,85	0,15	0,2	0,25	0,55	-	0,15	0,45	0,25	-	-	-	18,45	2179
9	6	30,4	43,5	139,8	0,25	14,1	5710	14,9	2,75	13,05	16980	12,4	-	-	5750
10a	0,4	11,9	0,65	0,3	0,9	0,65	-	0,05	0,2	0,15	-	-	0,5	606	1050,5
10b	0,45	13,6	0,3	0,15	0,9	0,55	-	0,15	0,1	0,15	-	-	-	6,45	1007,5
10c	0,4	13,65	0,3	0,15	0,9	0,5	-	0,15	0,05	0,1	-	-	0,4	0,4	1014

4.2. Bor İçeren rneklerden Bakteri İzolasyonları

İzolasyon alışmaları için kültüre bağlı klasik izolasyon yöntemleri ile kültürden bağımsız yöntemler eş zamanlı olarak yapılmıştır. Bor içeren alanlardan alınan su örneklerinden izolasyon çalışmalarında standart olarak 2 farklı besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerleri TSA(~pH 9) ve farklı miktarlarda bor içeren LB agar kullanılmıştır. 3 gün sonrasında izolasyon petrilerinde görülen renk ve koloni morfoloji açısından farklı olduğu düşünülen izolatlar taze besi ortamlarına ekilerek saflaştırılmışlardır. remesi sağlanan organizmalardan dilüsyonlar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) yapılarak katı ortamlara ekim yapılmıştır. Ekimler sonucu farklı koloniler belirlenmiştir ve tek koloni yöntemi ile farklı olduğu düşünülen 25 tane izolat saflaştırılmıştır. Şekil 4.1'de farklı renk ve koloni morfolojisine sahip bazı izolatların katı besiyerindeki görüntüleri, Gram boyama sonucu elde edilen bilgiler izelge 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.1 İolatların gram boyama sonuçlarının bazı görüntüleri

Çizelge 4.5 Saflaştırılan mikroorganizmaların makroskopik görüntüleri

Alındığı ortam	İzolatin Besiyeri	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskopik büyüme yoğunluğu ^a	Büyütülmüş makroskopik görünümü (Pasajdan sonra)
6	TSA	DB-1	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük koloniler mevcut
6	TSA	DB-2	Beyaz renkli ve mukoid	+++	Beyaz renkli mukoid kabarık koloniler
7	TSA	DB-3	Beyaz renkli ve mukoid	+++	Beyaz renkli mukoid kabarık koloniler
5	TSA	DB-4	Koyu krem rengi ve parlak	+++	Koyu krem rengi, küçük koloniler mevcut
10C	TSA	DB-5	Koyu krem rengi ve parlak	+++	Koyu krem rengi, küçük koloniler mevcut
3	TSA	DB-6	Kırık beyaz ve parlak	+++	Koyu krem rengi, küçük koloniler mevcut
8	LB 100	DB-7	Krem rengi ve parlak	+++	Krem rengi küçük koloniler mevcut
7	LB 100	DB-8	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve tek koloniler mevcut
7	LB 100	DB-9	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid büyük koloniler mevcut
2	LB 50	DB-10	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve tek koloniler mevcut
9	LB 50	DB-11	Koyu krem rengi ve parlak	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut
6	LB 50	DB-12	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi, mukoid, tek koloniler mevcut
6	LB 50	DB-13	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve tek koloniler mevcut
8	LB 50	DB-14	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut
2	LB 50	DB-15	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut
7	LB 50	DB-16	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut
6	LB 50	DB-17	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut
10C	LB 50	DB-18	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve yayılmış koloniler mevcut

Çizelge 4.5 (devamı) Saflaştırılan mikroorganizmaların makroskopik görüntüleri

Alındığı ortam	İzolatin Besiyeri	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskopik büyüme yoğunluğu ^a	Büyütülmüş makroskopik görünümü (Pasajdan sonra)
6	LB 50	DB-19	Koyu krem rengi ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid kabarık ve yayılmış koloniler mevcut
7	LB 50	DB-20	Koyu krem rengi ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid kabarık ve tek koloniler mevcut
8	LB 50	DB-21	Koyu krem rengi ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid küçük ve tek koloniler mevcut
9	LB 50	DB-22	Koyu krem rengi ve mukoid	+++	küçük, koyu merkezli ve kabarık koloniler mevcut
10C	LB 50	DB-23	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid kabarık ve yayılmış koloniler mevcut
9	LB 50	DB-24	Koyu krem rengi ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid kabarık ve yayılmış koloniler mevcut
10C	LB 50	DB-25	Koyu krem rengi, parlak ve mukoid	+++	Koyu krem rengi mukoid kabarık ve tek koloniler mevcut

4.3. Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri

4.3.1. İzolatların biyokimyasal testlerinin sonuçları

Seçilen mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla, Katalaz, H₂S üretimi, Voges-Proskauer testi, İndol üretimi, Sitrat kullanımı ve Fenol testleri yapılmıştır (Şekil 4.2) Ayrıca tuz konsantrasyonlarını, farklı pHlarda gelişebilirlikleri, farklı bor miktarlarında gelişebilirlikleri, ve bazı karbon kaynaklarında kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla da testler yapılmış ve Çizelge 4.6-4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Biyokimyasal test sonuçlarından bazılarının görüntüleri

Çizelge 4.6 Saflaştırılan bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilirliği

İzolat Numarası	Tuz konsantrasyonları				
	%2	%6	%12	%18	%23
DB1	+	-	-	-	-
DB2	-	-	-	-	-
DB3	+	+	-	-	-
DB4	-	-	-	-	-
DB5	-	+	-	-	-
DB6	+	+	-	-	-
DB7	+	+	-	-	-
DB8	+	+	-	-	-
DB9	+	+	-	-	-
DB10	+	+	-	-	-
DB11	+	+	-	-	-
DB12	+	+	-	-	-
DB13	+	-	-	-	-
DB14	+	+	-	-	-
DB15	+	-	-	-	-
DB16	+	-	-	-	-
DB17	+	+	-	-	-
DB18	+	+	-	-	-

Çizelge 4.6 (devamı) Saflaştırılan bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilirliği

İzolat Numarası	Tuz konsantrasyonları				
	%2	%6	%12	%18	%23
DB19	+	+	-	-	-
DB20	+	+	-	-	-
DB21	+	-	-	-	-
DB22	+	-	-	-	-
DB23	+	+	-	-	-
DB24	+	+	-	-	-
DB25	+	+	-	-	-

Çizelge 4.7 Saflaştırılan mikroorganizmaların biyokimyasal testleri sonuçları

İzolat numarası	İndol Testi	Fenol Testi	Katalaz Testi	Sitrat Testi	Hidrojen Sülfid Testi	Voges Testi
DB1	-	+	+	-	-	-
DB2	-	-	+	-	-	-
DB3	-	+	-	-	+	-
DB4	-	-	+	-	-	-
DB5	-	-	-	-	+	-
DB6	-	+	+	-	-	-
DB7	-	+	+	+	-	-
DB8	-	-	+	+	-	-
DB9	-	-	+	+	-	-
DB10	-	-	+	+	-	-
DB11	-	-	+	+	-	-
DB12	-	+	+	+	-	-
DB13	-	-	+	+	+	-
DB14	-	-	+	-	+	-

Çizelge 4.7 (devamı) Saflaştırılan mikroorganizmaların biyokimyasal testleri sonuçları

İzolat numarası	İndol Testi	Fenol Testi	Katalaz Testi	Sitrat Testi	Hidrojen Sülfid	Voges Testi
DB15	-	-	+	+	-	-
DB16	-	-	+	+	+	-
DB17	-	-	+	+	+	-
DB18	-	-	+	+	+	-
DB19	-	-	+	+	-	-
DB20	-	+	+	+	+	-
DB21	-	+	+	-	+	-
DB22	-	-	+	+	-	-
DB23	-	-	+	+	+	-
DB24	-	-	+	+	+	-
DB25	-	-	+	+	+	-

Çizelge 4.8 Saflaştırılan mikroorganizmaların farklı pH değerlerinde gelişebilirlikleri

İzolat numarası	İzolatların farklı pH'larda gelişebilirlikleri			
	pH5	pH7	pH9	pH11
DB1	-	+	+	+
DB2	-	+	+	+
DB3	+	+	+	-
DB4	+	+	+	+
DB5	-	+	+	+
DB6	+	+	+	-
DB7	+	+	+	-
DB8	-	+	+	-
DB9	+	+	+	-
DB10	-	+	+	-
DB11	-	+	+	-

Çizelge 4.8 (devamı) Saflaştırılan mikroorganizmaların farklı pH değerlerinde gelişebilirlikleri

İzolat numarası	İzolatların farklı pH'larda gelişebilirlikleri			
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
DB12	-	+	+	-
DB13	-	+	+	-
DB14	-	+	+	-
DB15	-	+	+	-
DB16	-	+	+	-
DB17	-	+	+	-
DB18	+	+	+	-
DB19	-	+	+	-
DB20	-	+	+	-
DB21	-	+	+	-
DB22	-	+	+	-
DB23	-	+	+	-
DB25	-	+	+	-

Çizelge 4.9 Saflaştırılan mikroorganizmaların farklı bor konsantrasyonlarında gelişebilirlikleri

İzolat Numarası	İzolatların farklı bor miktarlarında gelişebilirlikleri				
	LB50	LB100	LB150	LB200	LB250
DB1	42	74	88	89	89
DB2	60	62	85	86	87
DB3	54	85	86	86	87
DB4	51	79	81	84	86
DB5	55	85	86	86	86
DB6	70	83	83	86	87
DB7	50	81	85	86	86

Çizelge 4.9 (devamı) Saflaştırılan mikroorganizmaların farklı bor konsantrasyonlarında gelişebilirlikleri

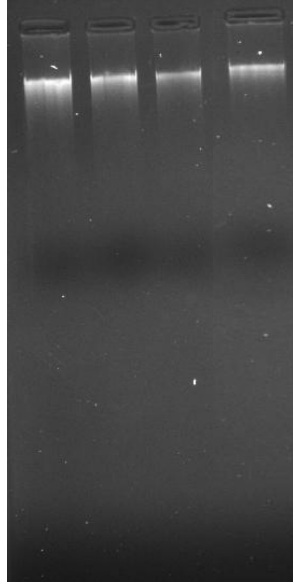
İzolat Numarası	İzolatların farklı bor miktarlarında gelişebilirlikleri				
	LB50	LB100	LB150	LB200	LB250
DB8	60	64	86	88	89
DB9	59	74	84	86	88
DB10	22	68	83	84	85
DB11	34	47	83	83	85
DB12	21	69	78	83	88
DB13	22	46	80	83	83
DB14	0	36	73	83	83
DB15	33	56	72	83	83
DB16	18	22	68	77	85
DB17	0	33	59	83	86
DB18	0	34	83	84	87
DB19	8	36	66	83	87
DB20	10	33	62	84	87
DB21	18	44	83	84	88
DB22	18	52	68	86	88
DB23	16	46	86	88	88
DB24	0	54	86	88	90
DB25	19	72	85	88	89

Çizelge 4.10 İzolatların farklı besiyerlerinde kullanılabilirlikleri

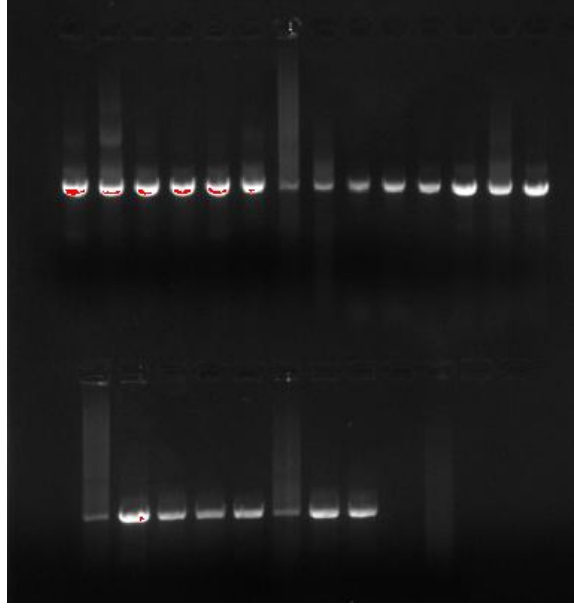
İzolat Numarası	Besiyerinde kullanılan farklı karbon kaynaklarını kullanılabilirlikleri				
	Glikoz	Sükroz	Laktoz	Dekstroz	Galaktoz
DB1	-	-	-	-	-
DB2	-	-	-	-	-
DB3	+	+	+	+	+
DB4	+	+	+	+	+
DB5	+	+	+	+	+
DB6	+	+	+	+	+
DB7	+	+	+	+	+
DB8	+	+	+	+	+
DB9	+	+	+	+	+
DB10	+	+	+	+	+
DB11	+	+	+	+	+
DB12	+	+	+	+	+
DB13	-	+	+	+	+
DB14	+	+	+	+	+
DB15	-	-	+	+	+
DB16	+	+	-	+	+
DB17	+	+	+	+	+
DB18	+	+	+	+	+
DB19	+	+	+	+	+
DB20	-	+	+	+	+
DB21	+	+	+	+	+
DB22	+	+	+	+	+
DB23	+	+	+	+	+
DB24	+	+	+	+	+
DB25	+	+	+	+	+

4.3.2. İzolatların moleküler identifikasyonu

Eskişehir-Kırka'dan alınan su örneklerinin kültüre alma işlemlerinde farklı besiyerlerinden elde edilen tek koloni örnekleri saflık kontrolleri de yapıldıktan sonra izole edilen koloniler lizis edilip DNA'ları ekstrakte edilmiştir. İzolatların total DNA'larına ait jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. 27F ve 1492R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR işlemi ile 16S rRNA geninin çoğaltılmasını takiben PCR ürünlerinin %0.7'lik agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen jel fotoğrafında yaklaşık 1350 bazlık ürün veren jel görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



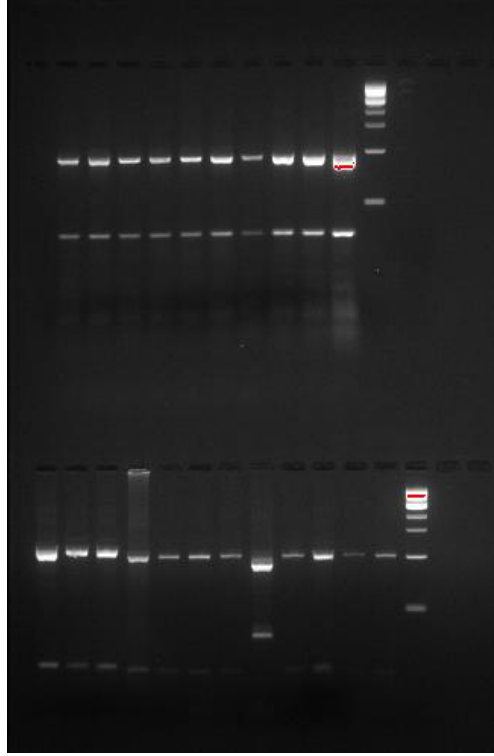
Şekil 4.3 Toplam DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri



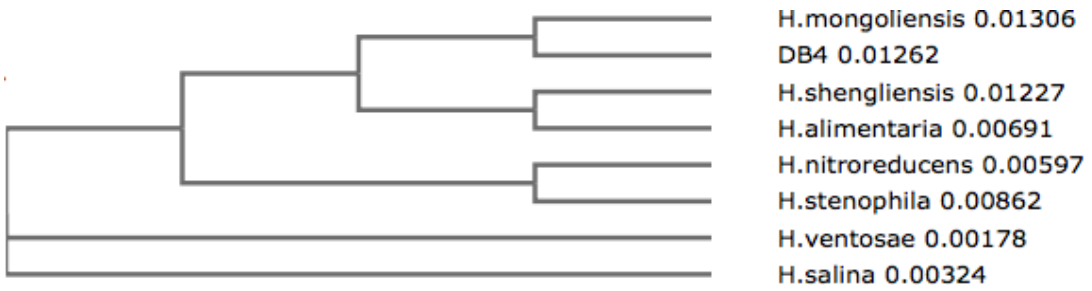
Şekil 4.4 Örneklerin 16S rRNA gen amplifikasyon örnekleri

4.3.3. Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA) ve PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

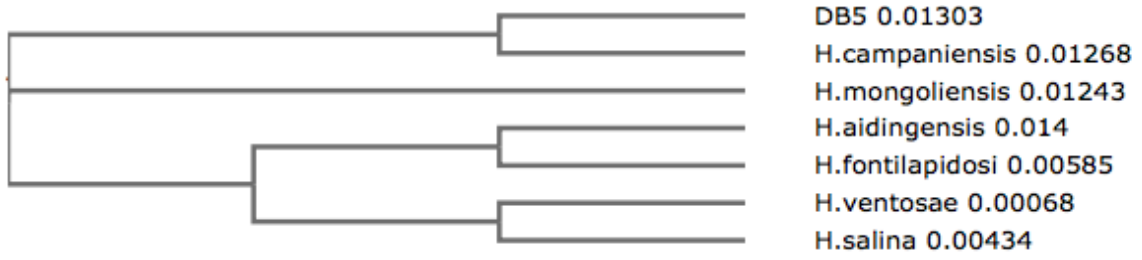
Eskişehir Kırkadan alınan su örneklerinden farklı besiyerlerinde üreme görülen saf izolatların Archaea–Bacteria ayrımı gerçekleştirildikten sonra elde edilen PCR ürünleri *MboI* restriksiyon enzimi ile kesimleri gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforez çözeltisi olarak 1X TBE kullanılarak belirlenmiştir. Kesimler sonucunda Eskişehir Kırkadan alınan örnekte 11 izolattan Bacteria domainine ait 2 patern elde edilmiştir (Şekil 4.5). Bu paternlere ait izolatların 16S rRNA dizi analizlerine göre filogenetik ağaçları Şekil 4.6- 4.13'de gösterilmiştir.



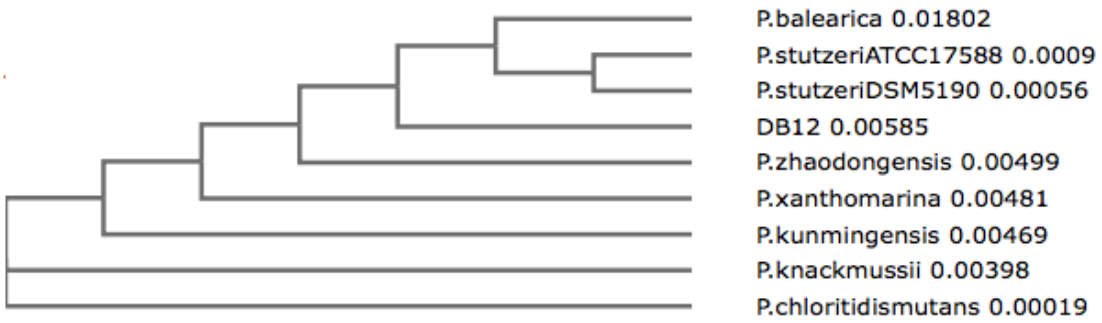
Şekil 4.5 Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon analizi görüntüsü



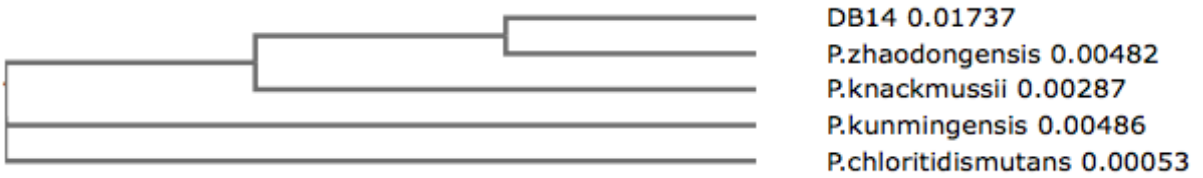
Şekil 4.6 İzolat D.B4'ün 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



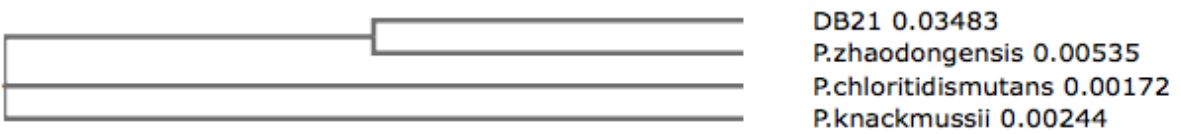
Şekil 4.7 DB5'in 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.8 İzolat DB12'nin 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.9 İzolat DB14'ün 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.10 İzolat DB21'in 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.11 İzolat DB23'ün 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.12 İzolat DB24'ün 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 4.13 İzolat DB25'nin 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağacı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde bor; cam, seramik, sabun ve deterjan sanayisinde yangın önleyici madde üretim sanayisinde, metalurji sanayinde, tarım sektörü gibi birçok alanla kullanılmasının yanı sıra hafifliği, gerilmeye olan direnci ve kimyasal etkilere dayanıklılığı sebebiyle; plastiklerde, sanayi elyafı üretiminde, lastik ve kağıt endüstrisinde, tarımda, nükleer enerji santrallerinde, roket yakıtlarında kullanılmaktadır.

Camın ısıyla genleşmesini önemli ölçüde indirgediği, camı asite ve çizilmeye karşı koruduğu, titreşim, yüksek ısı ve ısı şoklarına karşı dayanıklılığı sağladığı için ısıya dayanıklı cam gereçleri ve elektronik ve uzay araştırmalarında kullanılacak üstün nitelikli camların üretiminde de önemli yeri vardır (Uygan ve Çetin, 2004).

Yaşadığımız biyosferin çok önemli bir parçasını mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bu organizmalardan patojen olanların ve besin üretiminde kullanılanların dışında kalanların hala tanımlanmamış olduğu bilinmektedir (Whitman vd., 1998). Özellikle bor ile kirlenmiş alanların mikrobiyal çeşitliliği ile ilgili veri çok azdır.

Bu tez çalışması kapsamında mikrobiyal çeşitliliği ortaya çıkarmak amacı ile kültürden bağımsız ve kültüre bağlı yöntemler kullanılmıştır. Prokaryotik çeşitliliğin moleküler yöntemler kullanılarak çalışılması son yıllarda giderek popüler hale gelmiştir ve temel olarak neredeyse tüm yöntemler 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında farklı moleküler yöntemler kullanmak olasıdır. Uygulanacak yöntemin seçimi, amaca ve analiz edilecek örnek miktarına bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca tür sayısının ortaya konmasının yanı sıra bir diğer önemli faktör de bu tür içindeki bireylerin dağılımıdır (Ovreas vd., 2003).

Bu çalışmada bor bakımından zengin olduğu bilinen Eskişehir-Kırka yöresinden alınan su örneklerinin prokaryotik çeşitliliği klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılmasını kapsamaktadır.

Toplanan su örnekleri laboratuvara mümkün olan en kısa zamanda taşınmış, bir kısım örnek de kaynaktan alındığında besi ortamına aktarılmış ve saflaştırma işlemi yapılmıştır. Sonucunda borla kirlenmiş farklı bölgelerden 25 izolat elde edilmiştir. Bakteriler nutrient broth ve LB besi ortamında 35°C'deki sıcaklıklarda yoğun üreme göstermişlerdir. Elde edilen 25 izolatın biyokimyasal özelliklerine de bakılmıştır.

Biyokimyasal testlerini yaptığımız suşların hepsinde indol negatif olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7). Ahmed ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda bu tip alanlarda izole ettiği *Bacillus boroniphilus* türünde indol testinde negatif olduğu gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007).

Voges-Proskauer testi sonucunda yaptığımız çalışmada bütün suşlar negatif reaksiyon göstermiştir (Çizelge 4.7). Yapılan çalışmalarda *Bacillus boroniphilus*, Voges-Proskauer testine negatif, *Variovorax boronicumulans*, *Gracilibacillus boraciitolerans* türlerinin Voges-Proskauer testine pozitif sonuç gösterdiği gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007; Miwa vd., 2008).

İzolatlara uygulanan sitrat testleri sonucunda izole edilen örneklerden, DB1, DB2, DB3, DB4, DB5, DB6, DB14, DB21'de negatif sonuç elde edilmiş, diğer suşlardan pozitif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 4.7). *Variovorax boronicumulans* türünün sitrat testi pozitif, *Gracilibacillus boraciitolerans* türünde ise negatif sonuç gözlenmiştir (Miwa vd., 2008 ; Ahmed vd., 2007).

İzolatlarda DB3, DB5, DB13, DB14, DB16, DB17, DB18, DB20, DB21, DB23, DB24, DB25 suşlarının H₂S oluşturduğu gözlenirken, diğer 13 suşun negatif sonuç verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.7). *Bacillus boroniphilus* türünde pozitif sonuç gözlenirken, *Variovorax boronicumulans* türünde ise negatif sonuç göstermiştir (Miwa vd., 2008; Ahmed vd., 2007).

İzolatlara uygulanan katalaz testleri sonucunda, DB3 ve DB5 suşunun negatif sonuç verdiği gözlenirken, diğer suşların pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.7). *Bacillus boroniphilus*, *Gracilibacillus boraciitolerans*, *Variovorax boronicumulans*,

Rhodococcus baikonurensis türlerinin de katalaz testinde pozitif sonuç göstermiştir (Ahmed vd., 2007; Yoon vd., 2010; Miwa vd., 2008).

Fenol testi sonucunda izolatların, DB1, DB3, DB6, DB7, DB12, DB20, DB21 suşlarında pozitif sonuç gözlenmiş olup, diğer bütün suşlarda negatif sonuç gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

İzolatlara uygulanan farklı pH'larda gelişme testleri sonucunda bütün suşlar pH 7 ve pH 9'da üreme gösterirken, pH5'de DB3, DB4, DB6, DB7, DB9, DB18 suşlarında üreme gözlenmiş olup, diğer 19 suшта üreme gözlenmemiştir. pH 11'de DB1, DB2, DB4, DB5 suşlarında üreme gözlenmiş olup, diğer 21 suшта üreme gözlenmemiştir (Çizelge 4.8). *Bacillus boroniphilus*, *Gracilibacillus boraciitolerans* türlerinin optimum pH koşulunun 7.5 olduğu, *Variovorax boronicumulans* ve *Rhodococcus baikonurensis*, optimum pH değerinin 7 olduğu gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007; Yoon vd., 2010; Miwa vd., 2008).

İzole edilen suşlara yapılan NaCl'de büyüme testleri sonucunda yirmibeş izolatın tamamı % 12, %18, %23 tuz içeren ortamda gelişmemiştir. %2 tuz içeren ortamlarda DB2, DB4, DB5'de üreme olmamış, diğer suşların hepsinde üreme gözlenmiştir. %6 tuz içeren ortamlarda DB1, DB2, DB4, DB13, DB15, DB16, DB21, DB22 suşlarında üreme olmamış, diğer suşlarda üreme gözlenmiştir (Çizelge 4.6) *Bacillus boroniphilus* ve *Rhodococcus baikonurensis* türlerinin NaCl içeren ortamda optimum üreme %7, *Gracilibacillus boraciitolerans* türünde %11, *Variovorax boronicumulans* türünde ise %1 olduğu gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007 ; Yoon vd., 2010 ; Miwa vd., 2008).

Karbon kaynağına göre izolatlar için; glikoz, sükroz, laktoz, dekstroz ve galaktoz olmak üzere beş farklı karbon kaynağı denenmiştir. Çizelge 4.10'da belirtildiği gibi DB1 ve DB2 karbon kaynağı olarak hiçbirini kullanmamıştır. DB8 karbon kaynağı olarak Laktozu kullanmamıştır. DB13 karbon kaynağı olarak Glikozu kullanmamıştır. DB15 karbon kaynağı olarak Glikoz ve Sükrozu kullanmamıştır. DB16 karbon kaynağı olarak Laktozu kullanmamıştır. DB20 karbon kaynağı olarak Glikozu kullanmamıştır. Bunların dışındaki diğer suşlar kullanılan bütün karbon kaynaklarını kullanmışlardır. *Bacillus boroniphilus*, *Gracilibacillus boraciitolerans* türlerinin Çizelge 4.10'da belirtilen bütün karbon kaynaklarını kullandığı, *Rhodococcus baikonurensis* ve *Variovorax*

boronicumulans türlerinin belirtilen karbon kaynaklarını kullanmadığı gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007 ; Yoon vd., 2010 ; Miwa vd., 2008).

İzolatların bora toleranslarını belirlemek için yapmış olduğumuz Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu sonucuna göre; içerisinde sırayla 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM bulunan LB agar kullanmış ve yüzdeleri hesaplanmıştır. En yüksek yüzdeyi LB250mM'de DB25 izolatı % 90 olarak gözlenmiştir. En düşük yüzde LB50 mM'da DB14, DB17, DB18, DB24 izolatlarında yüzde 0 olarak gözlenmiştir. LB50'de en düşük yüzde DB14, DB17, DB18, DB24'de 0 olarak hesaplanmış, en yüksek yüzde DB6'da 70 olarak hesaplanmıştır. LB100mM'da en düşük yüzde DB16'da %22 olarak hesaplanmış, en yüksek yüzde DB5'de %85 olarak hesaplanmıştır. LB150 mM'da en düşük yüzde DB17 izolatında %59 olarak hesaplanmış, en yüksek yüzde DB1 izolatında 88 olarak hesaplanmıştır. LB200 mM'da en düşük yüzde DB16 izolatında %77 olarak hesaplanmış, en yüksek yüzde DB1'de %89 olarak hesaplanmıştır. LB250 mM'da en düşük yüzde DB13, DB14, DB15'de yüzde 83 olarak hesaplanmış en yüksek yüzde DB24'de 90 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9). *Bacillus boroniphilus* türünün en iyi toleransı 100-200 mM'da gösterdiği *Gracilibacillus boraciitolerans* türünün en iyi toleransı 200 mM'da gösterdiği *Rhodococcus baikonurensis* türünün en iyi toleransı 200 mM'da gösterdiği *Variovorax boronicumulans* türünün en iyi toleransı 100 mM'da gösterdiği gözlenmiştir (Ahmed vd., 2007 ; Yoon vd., 2010 ; Miwa vd., 2008).

Çalışma kapsamında bakterilerin izolasyonuna yönelik alınan su örneklerinden elde edilen izolatların gram boyamaları sonucunda izolatların Gram (-) ve Gram (+) olduğu, hücre morfolojilerinin ise genel anlamda farklı uzunlukta basil olduğu gözlemlenmiştir. İzolatların kolonilerin makroskobik görünüşleri Çizelge 4.5'te verilmiş, Eskişehir Kırka'ya ait 25 izolat elde edilmiştir. Genel olarak izolatların kolonilerinde kahverengi ve kremrengi pigmentasyon mevcuttur. İzolatların sıvı besiyerine transfer edilip büyümeleri sağlandığında sıvı ortamın inkübasyon süresi ilerledikçe kahverengi bir renk aldığı gözlenmiştir. Elde edilen izolatlar; ve temsili olarak seçildikten ve 16S rRNA bölgeleri çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra 27F ve 1492R primer setleri ile dizi analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar *Pseudomonas* ve *Halomonas* türleri ile eşleşmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *Halomonas mongoliensis*, *Halomonas campaniensis*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* türlerine ait suşlar ile *Pseudomonas*

zhaodogensis türüne ait 4 farklı suş izole edilmiştir. Literatürde bor içeren alanlardan izole edilen bakteri çeşitliliği ile bu tez çalışmasının verileri karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Bor içeren alanlardaki bakteri çeşitliliği

Bakteri adı	İzole edildiği yer	Referanslar
<i>Bacillus boroniphilus</i> sp.	Kütahya/Hisarcık	Iftikhar vd., 2007
<i>Gracilibacillus boraciitolerans</i> sp.	Kütahya/Hisarcık	Iftikhar vd., 2007
<i>Variovorax boronicumulans</i> sp.	Tokyo/ Bor içeren topraklar	Miwa vd., 2008
<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	Tokyo/ Bor içeren topraklar	Yoon vd., 2010
<i>Lysinibacillus</i> <i>Parviboroncapiens</i>	Kütahya/Hisarcık	Miwa vd., 2009
<i>Chimaereicella boritolerans</i>	Kütahya/Hisarcık	Iftikhar vd., 2007
<i>Bacillus safensis</i> MS11	Moğolistan çöl toprağı	Raja ve Omine, 2012
<i>Bacillus firmus</i>	Kaliforniya bor maden ocağı	Verce vd., 2012
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> M1, <i>Bacillus cereus</i> M2 , <i>Bacillus cereus</i> M3, <i>Bacillus pumilus</i> M4	Japonya/Hokkaido maden bölgesi	Raja ve Omine, 2012
<i>Halomonas mongoliensis</i> <i>Halomonas campaniensis</i> <i>Pseudomonas balearica</i> <i>Pseudomonas zhaodogensis</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Eskişehir/Kırka	Tez çalışması

Geçmişteki mikrobiyal ekolojik çalışmaların çoğu, mikroorganizmaların çevreden izolasyonu ve karakterizasyonu ile sınırlı kalmıştır. Bu sebeple biyoçeşitlilik üzerine

değerli bilgiler sağlamış olmasına rağmen bu şekilde elde edilen çeşitlilik tamamen bütünü yansıtamamaktadır.

Miwa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada izole edilen 19 izolatın 16S rRNA dizi analizi ve biyokimyasal testleri yapılmış en yakın cinsler başta *Bacillus* olmak üzere, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Rhodococcus* ve *Mycobacterium* olduğu belirtilmiştir. Yapılan analiz ve testler sonucunda en iyi pH değeri 7-9 arasında gözlenmiş, bor miktarı 100 mM olarak belirlemiştir. Ayrıca en yüksek benzerliğin %99,9 oranıyla *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis* ve %98,1 *Pseudomonas putida*'da gözlenmiştir.

Bu tez çalışması ile Eskişehir Kırka bor madeni bölgesinden alınan çevresel örneklerden bakteri izolasyonları yapılmış, elde edilen izolatların klasik ve moleküler mikrobiyolojik yöntemleri ile tanılamaları gerçekleştirilmiş, aynı zamanda söz konusu izolatların bor tolerans yetenekleri değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda tanılama çalışmaları sonucunda; elde edilen izolatların *Halomonas mongoliensis*, *Halomonas campaniensis*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* türlerine ait suşlar ile *Pseudomonas zhaodogensis* türlerine yüksek oranda benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bor içeren alanlardaki mikrobiyal çeşitliliğin ortaya çıkarılması ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu bağlamda elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ülkelerin sahip olduğu yeraltı zenginlikler kadar biyoçeşitlilik unsurları da önemli bir katma değer sunmaktadır. Türkiye'nin sahip olduğu biyoçeşitliliğin zenginliğinin tespiti için envanter oluşturulmaya hızla devam edilirken, önemli bir durum da bu biyolojik kaynaklardan etkin ve sürdürülebilir yararlanma süreçlerinin geliştirilmesi olmaktadır. Ülkelerin sahip olduğu yer altı kaynakların çeşitliliği ve zenginliği ülke ekonomisi için ne kadar yararlı ve değerli ise, biyoçeşitlilikte benzer bir etkiye sahiptir. Bu anlamda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine koşut olarak biyoteknolojik uygulamaların da birlikte planlanması gerek zaman ve gerekse ekonomik bir kazanç sağlayabilecektir.

Çalışmalarımız DNA dizi analizlerinin yeni primerler ile desteklenmesi ve izole edilen mikroorganizmalar ile yapılacak olan yeni çalışmalar ile sürdürülecek, kültürden bağımsız komünite analizleri ile devam edecek mikrobiyal açıdan keşfedilmeyi bekleyen

bor içeren ortamların mikrobiyal çeşitliliğinin araştırılmasına ve bu ortamlardan elde edilecek izolatların potansiyel uygulama alanlarında kullanımlarına yönelik çalışmalara devam edilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995, Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 1431-69.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., 1999, Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ. Microbiol.*, 1, 517-523.
- Ash, C., Priest, F. G., Collins, M.D., 1993, Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoe*, 64, 253-260
- Barth S.R., Utilization of boron as a critical parameter in water quality evaluation implications for thermal and mineral water resources in SW Germany and N Switzerland, *Env. Geol.*, 2000, 40, 73-89.
- Baykut, F., Aydın, A., Baykut, S., 1987, Çevre Sorunları ve Korunma, İTÜ Yayın No: 3449, 419s.
- Benlloch, S., Martinez-Murcia, A., Rodriguez-Valera, F., 1995, Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment, *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 574-581.
- Benlloch, S., Acinas, S.G., Anton, J., Lopez-Lopez, A., Luz, S. P., Rodriguez-Valera, F., 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR, *Microbial Ecology.*, 41, 12-19.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., Rodriguez Valera, F., 2000, Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments, *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1715-1719.
- Delong, E.F., Franks, D.G., Alldredge, A.L., 1993, Phylogenetic diversity of aggregate attached vs. free living marine bacterial assemblages, *Limnology and Oceanography*, 38, 924-934.
- Demirtaş, A., 2010, Boron compounds and their potential of use in agriculture, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi/Journal of The Faculty of Agriculture*, 37(1).
- Dyall-Smith, M., 2004, *HaloHandbook*, [www.microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).
- FAO, 1976, *Water Quality for Agriculture. Irrigation and Drainage Paper 29*, Rome, pp. 81.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Finck, A., 1969, Pflanzenernährung in stichworten, Verlag Ferdinand Hirt. Kiel.
- Grant, S., Grant, W.D., Jones, B.E., Kato, C., Li L., 1999, Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern, *Extremophiles*, 3, 139-145.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hersberger, K., Pace, N.R., 1998, Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G., Logan, N.A., 1998, *Virgibacillus* : a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight, 1950) Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 99-106.
- Iftikhar, A., Yokota, A., & Fujiwara, T., 2007, *Chimaericella boritolans* sp. nov., a boron-tolerant and alkaliphilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from soil, *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 986-992.
- Iftikhar, A., Yokota, A., Fujiwara, T., 2007, A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth, *Extremophiles* 11, 217-224.
- Iftikhar, A., Yokota, A., & Fujiwara, T., 2007, *Gracilibacillus boracitolerans* sp. nov., a highly boron-tolerant and moderately halotolerant bacterium isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 796–802.
- İlhan S., 2000, Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- Jeffrey, A.J. ve L.E. McCallum., 1988, Investigation of a hot 0.01 M CaCl₂ soil boron extraction procedure followed by ICP-AES analysis, *Commun. Soil Sci. Plant Analysis*, 19: 663 – 673.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997, Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522
- Logan, N.A., 1998, *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*, *Int J Syst Bacteriol* 48, 99–106.
- Hackman, J. R., 2009, Boron Needs Of Soil And Crops In New Jersey, Fact Sheet 873.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hersberger, K., Pace, N.R., 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring, *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376.
- Laboratuvar Hizmetleri, Biyokimyasal Testler 2013. Milli Eğitim Bakanlığı. Ankara.
- McKee, J.E., Wolf, H.W., 1963, *Water Quality Criteria*, California State Water Resources Control Board.
- Miwa, H., Fujiwara, T., Ahmed I., Yoon J., Yokota A., 2008, *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boronaccumulating bacterium isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 286–289
- Miwa, H., Fujiwara, T., 2009, Isolation and identification of boron-accumulating bacteria from contaminated soils and active sludge, *Soil Science&Plant Nutrition*, 55(5), 643-646.
- Mullis, K.B., Floona, F.A., 1987, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.
- Nable, R.O., Banuelos, G.S., Paull, J.G., 1997. Boron toxicity. *Plant Soil* 193, 181–198.
- Nielsen, F.H., 2004, Boron. In *Elements and their Compounds in the Environment*, 2nd edn, pp. 1251–1260. Edited by E. Merian, M. Anke, M. Ihnat & M. Stoepler. Weinheim: Wiley-VCH.
- Nogales, B., Moore, E.R., Abrham, W.R., Timmis, K.N., 1999, Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl polluted moorland soil, *Environmental Microbiology*, 1, 199-212
- online: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>;
erişim tarihi: 26/07/2016
- Provin, T.L., Pitt, J.L., 2002, *Description of Water Analysis Parameters*. Soil and Crop Science Department, The Texas A&M University.
- Pondexter, J.S., Leadbetter, E.R., 1986, Enrichment cultures in microbial ecology, In: *Bacteria in Nature*, Eds: Poindexter J.S., Leadbetter E.R., Plenum Press, New York, USA, Pp.229.
- Raja, C.E., Omine, K., 2012, Characterization of boron resistant and accumulating bacteria *Lysinibacillus fusiformis* M1, *Bacillus cereus* M2, *Bacillus cereus* M3, *Bacillus pumilus* M4 isolated from former mining site, Hokkaido, Japan, 47, 1341-1349.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raja, C.E., Omine, K., 2013, Characterization of boron tolerant bacteria isolated from a fly ash dumping site for bacterial boron remediation, *Environmental Geochemistry and Health*, 35, 431-438.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Schare, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1998, Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Satyanarayana, T., Chandralata, R., Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity an perspectives, *Current Science*, 89, 78-90.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. & Komagata, K., 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov., *Int J Syst Bacteriol* 46, 939-946.
- Tamer, A.Ü., Altan, Y., Gücin, F., 1989, Gülveren Köyü (Erzurum) Florasında Belirlenen Bazı Parazit Funguslar, *Anadolu Üniv. Fen-Ed.Fak Der.*, 1, 45-55
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin. R., 1989, 3-4 Sınıf Laboratuvar Klavuzu, *Anadolu Üniversitesi, Eskişehir*, 81-90.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999, Opening the black box of soil microbial diversity, *Applied Soil Ecology*, 13, 109-122.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., 1983, *Toprak Verimliliği ve Gübreleme* (Çeviri: N.Güzel), 3, Baskı, Ç. Univ., Zir.Fak. Yay., No: 168, Adana, 900s.
- US Public Health Service. 1992. Toxicological Profile for Boron and Compounds. <http://www.ar.sdi.ctif.aov/toxpronji's/jp> 26.
- Uygan, D., Çetin, D., 2004, II. Uluslararası Bor Sempozyumu, 23-25 Ey 10 2004 Eskişehir Türkiye
- Vanechoutte, M., Heyndricks, M., 2001, Application and Analysis of ARDRA Patterns in Bacterial Identification, Taxonomoy and Phylogeny. Elsevier. P:211-247 doi:10.1016/B978-044450740-2/50010-1.
- Verce, M.F., Stiles, A.R., Chong, K.C., Terry, N., 2012, Isolation of an ezxtremely boron-tolerant strain of *Bacillus firmus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 811-814.
- Watson, M. E., 1988, Recommended soil boron test, *In* W. C. Dahnke (ed.) *Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region*. North Dakota Agric. Expt. Stn. Bull. No. 499, p. 23-25

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J., 1998, Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G., Poralla, K., 1992, Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov, *Int J Syst Bacteriol*, 42, 263–26.
- Woods, W.G., 1994, An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives*, 102 (Suppl 7), 5.
- Washington, J.A., 1980, *Dilution Susceptibility Test: Agar and Macro-Broth Dilution Procedures*. American Soc. For Microbiol., Washington, D. C.(USA). 1980.
- Yılmaz, M.T., Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J Med Sci.*, 2012. 42 (Sup.2): 1423 1429
- Yoon, J., Miwa, H., Ahmed, J., Yokota, A., Fujiwara, T., 2010, *Rhodococcus baikonurensis* BTM4c bacterial strain isolated from soil, *Biosci.Biotech.Biochem.*, 74(1),178-181.
- Zhang, D., Zhang, D.M, Liu, Y.P., 2004, Community analysis of ammonia oxidizer in the oxygen-limited nitrification stage of OLAND system by DGGE of PCR amplified 16 S rDNA fragments and FISH, *Journal of Environmental Sciences*, 16, 838–842.