E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 2008
E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 2008
Cilt/Volume 25, Sayı/Issue (1): 31–37

© Ege University Press
ISSN 1300 - 1590
http://jfas.ege.edu.tr/

İzmir İlinde Çeşitli Su Kaynaklarındaki *Caulobacter*'lerin Karakterizasyonu ve Antibiyotik Dirençlerinin İncelenmesi

*Aslı Kaçar[1], Füsun Uçar[2]

[1]*Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Bakü Bul. No:100, İnciraltı, İzmir, Türkiye*
[2]*Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye*
**E mail: asli.kacar@deu.edu.tr*

Abstract: ***Characterizations of Caulobacters in different water sources in İzmir and investigation of antibiotic resistance of them.*** *Caulobacter* is a distinctive genus of prosthecate bacteria. During their life cycle these bacteria alternate between monoflagellated, swarmer cell and a nonmotile cell which has a stalk. They can be isolated from soil and freshwater as well as marine and estuarine locations. In this research, 29 members of *Caulobacter* genus from 10 different water sources which are located in Izmir region were isolated. At the end of the microscobic investigations and biocemical analyses, its observed that 9 strains belong to species *C. leidyi*, 14 strains belong to species *C. variabilis*, 6 strains belong to species *C. intermedius* and effects of the 7 different antibiotic on the growth of these bacteria were researched.

Key Words: *Caulobacter*, stalked bacterium, antibiotic, marine water, freshwater.

Özet: *Caulobacter*, uzantılı bakteriler grubunun farklı bir genusudur. Bu bakteriler, hayat döngüleri boyunca tek flajelli yüzücü hücre ve bir sapa sahip hareketsiz hücre formlarını sırayla oluşturmaktadır. Denizden ve kıyı bölgelerinden olduğu gibi topraktan ve tatlısulardan izole edilebilirler. Bu çalışmada, İzmir ilindeki 10 farklı su kaynağından alınan örneklerden 29 *Caulobacter* genusu üyesi izole edilmiştir. Yapılan mikroskobik incelemeler ve biyokimyasal testler sonucunda, 9 izolatın *C. leidyi*, 14'ünün *C. variabilis*, 6'sının *C. intermedius* olduğu belirlenmiş ve 7 farklı antibiyotiğin bu bakterilerin büyümesi üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Caulobacter*, saplı bakteri, antibiyotik, deniz suyu, tatlı su.

Giriş

Sucul çevrelerde ve toprakta yaşayan bakterilerden biri olan *Caulobacter* sahip olduğu ilginç morfolojiden dolayı dikkat çekicidir. Proteobakteriler bölümüne dahil olan bu bakteri fototrofik olmayan dimorfik (iki farklı görünümlü), prostekalı (uzantılı) bakteriler grubunda bulunmaktadır (Madigan ve ark., 2003). Bu grup *Hypomicrobium*, *Hyphomonas*, *Pedomicrobium*, *Filomicrobium* ve *Caulobacter* genuslarını içermektedir (Stahl ve ark., 1992). Genus *Caulobacter* ilk olarak 1905 yılında Mabel Jones tarafından Chicago'da hem musluk hem de kanalizasyon suyundan izole edilmiş olmasına rağmen, doğru olarak tanılanması ve *Caulobacter* adının verilmesi Henrici ve Johnson tarafından 1935 yılında olmuştur (Poindexter, 1981). Bu güne kadar on üç türü tanılanmış olan *Caulobacter*'ler rod-shape (çubuk görünümlü), fusiform (mekik şeklinde), limonoid (limon şeklinde), ovoid (oval), vibroid (virgül şeklinde) şekillerinde olup, aerobik ve gram (-)'lerdir. Yaşam döngüleri boyunca iki farklı morfolojide bulunurlar. Bunlardan ilki, hücrenin bir kutbunda hareket organeli olarak sadece flajel bulunan ve sap (stalked) yapısı mevcut olmayan hareketli hücreler, diğeri ise flajel bulunmayan, hücrenin tek bir kutbunda sap yapısını içeren hareketsiz hücrelerdir. Sapın uç kısmında yapışmayı sağlayan materyal yani tutunucu ayak (holdfast) bulunabilir (Poindexter, 1991). Birçok gram (-) bakteride olduğu gibi *Caulobacter*'de de dış membranın ana bileşeni lipopolisakkarittir. Hücre yüzeylerinin en dış tabakasında ise iki boyutlu, düzenli parakristalin yapıda yüzey tabaka (surface layer) proteini bulunur (Awram ve Smit, 2001). Bu protein alt birimlerinin direk hücre dışına salgılandığı ve hücre dışında birleşerek yüzey tabaka (S-layer) protenini oluşturduğu bilinmektedir. Bu tabakanın bakteriyi dış çevreden koruyan, bir bariyer olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Reichelt ve ark., 2001). *Caulobacter*'ler kemoorganotrofiktir ve oligotrofik çevrelerde bulunurlar. Önceleri bu bakterilerin daha çok tatlı su alanlarında ve su tesisatlarında bulunduğu, buna karşılık organik maddece zengin ortamlarda bulunmadığı düşünülüyordu, ancak sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *Caulobacter*'lerin çok geniş alanlara yayıldığı belirlenmiş, denizlerden, kanalizasyon sularından ve atık su arıtım tesislerinden de izole edilebilecekleri bildirilmiştir (Macrae ve Smit., 1991). Atık su arıtım sistemlerinin amacı besin elementlerinin, toksik maddelerin ve patojen mikroorganizmaların uygulanabilir kısa sürede ortamdan çıkarılımıdır. Ancak ortamdan fosfatın, nitratın, çözünür organik karbonun önemli oranda azaltılması için mikrobiyel populasyonun kullanımını içeren işlemlere gerek duyulur (Poindexter, 1986). Çeşitli maddelerle, bakteriler yüzeyde ince bir biyofilm ya da kaba taneli agregatlar oluşturur ve bu tabaka sudan ayrılır. İşte *Caulobacter*'de bu biyofilmde yer almaktadır ve sahip olduğu sap yapısı ile tutunma ve yapışma yeteneği ile bu agregatların oluşumuna yardımcı olmaktadır (Macrae ve Smit, 1991). *Caulobacter* türlerinin incelenmesi bir çok açıdan önemlidir. İlk olarak, bu bakteriler yaşam döngüleri boyunca

morfolojilerindeki ayırt edici değişimler, asimetrik hücre bölünmesi ile hücre farklılaşması göstermeleri ve sahip oldukları organellerin pozisyonunun değişimi nedeniyle incelenmiş model sistemlerdir. Özellikle *C. crescentus* türü üzerinde çalışmalar yapılmış, bu türün genom haritası çıkarılmıştır. Hücresel farklılaşma ve hücre döngüsünün kontrolü ile ilgili genleri ve gen ürünlerini belirleme çalışmaları ise günümüzde de devam etmektedir (Wingrove ve Gober, 1995). *Caulobacter*'lerin ikinci bir önemli inceleme alanı sahip oldukları antibiyotik direnç genleridir. Bu genus üyeleri insanlar ve hayvanlar için patojen değillerdir. Ancak *E. coli* ve diğer koliform grubu bakterilerle ilişkili izolatlar arasında konjugatif plazmitlerin transferinin gerçekleştiği ve klinik olarak kullanılan bir çok antibiyotiğe direnç genlerini taşıdıkları belirlenmiştir (Ely, 1979). *Caulobacter*'ler insanlara ve hayvanlara direkt zarar vermemelerine rağmen çevrede insanlarla ilişkili diğer bakterilere bu genlerin geri transferi ile mevcut antibiyotiklerin klinik ilaç olarak kullanımını sınırlayabilir, antibiyotik direncinin rezervuarı olarak hizmet görebilirler (Anast ve Smit, 1988). Sanayi ve teknolojinin her geçen gün gelişmesi, mikroorganizmaların sahip oldukları potansiyel nedeniyle önem kazanmalarını sağlamış ve özellikle biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanlarını arttırmıştır. *Caulobacter*'de özellikle sahip olduğu yüzey tabaka proteini ve çeşitli yüzeylere tutunabilme yeteneğinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Zararsız bir bakteri oluşu ve ürettiği proteinlerini hücre dışına direkt salgılayabilme yeteneğinden dolayı çeşitli aşıların ve yapay proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır (Njaka-Umelo ve ark., 2001; Nomellini ve ark., 1997; Lafferty ve ark., 1988). Gelecekte, çeşitli genetik ve biyoteknolojik çalışmalarda potansiyel kaynaklar olarak değerlendirilebilecek organizmalar arasında *Caulobacter* türlerinin önemli bir yer alacakları düşünülmektedir.

Araştırmalarımızda, çeşitli sucul çevrelerde yaşayan bu bakterinin belirtilen önemleri nedeniyle, İzmir ilindeki farklı su kaynaklarından örnekler alınarak *Caulobacter* türlerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal maddelerin bu bakterinin büyümesi üzerine etkilerinin incelenmesi ve böylelikle antibiyotik direnç genlerinin var olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Tablo 1.'de belirtilen su kaynaklarının yüzey kısmından ve özellikle pelikül oluşmuş bölgelerden steril roux şişelerine ve erlenlere alınan örnekler, laboratuvara getirilip aynı gün içinde % 0,05-0,1 pepton bulunan 500ml'lik steril erlenlere, 100ml aktarılmıştır. Erlenler, oda sıcaklığında 25-27 Cº'de 1,5-2 ay boyunca çalkalamadan, zenginleştirme işlemini gerçekleştirmek için bırakılmıştır. Zenginleştirme süreci, su yüzeyinde bir zar yani pelikül oluşunca tamamlanmıştır. *Caulobacter*'ler, bu yüzey tabakada yoğun olarak bulunduğundan izolasyon için hazırlanmış PYE (Pepton 2.0g, Yeast Ekstrakt 1.0g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g, Agar 15.0g, Distile su 1000ml, pH: 7.1), PCa (Pepton 2.0g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2.2H_2O$ 0.15g, Agar 15.0g, Distile su 1000ml, pH: 6.8), CPS (Pepton 0.5g, Kazaminoasit 0.5g, Agar 15.0g, Deniz suyu 1000ml) ortamları bulunan petrilere, ekimleri yapılmıştır, deniz suyundan alınan örnekler için besiyeri hazırlanırken deniz suyu kullanılmıştır (Poindexter, 1964, 1981; 1986; Anast ve Smit, 1988; Macrae ve Smit, 1991). 27 Cº'de inkübasyona bırakılan petrilerde 48. saatten itibaren üremenin başladığı gözlenmiştir. Koloniler saflaştırma işleminden sonra morfolojik incelemeler ve biyokimyasal testler için stoğa alınmıştır.

Tablo 1. İzmir İlinde Su Örneklerinin Alındığı Kaynaklar.

Örnek No	Numunenin Alınmış Olduğu Kaynak	
1	Balçova Cengiz Saran Barajı	Tatlı Su
2	Sahil Evleri	Deniz Suyu
3	Konak İskele	Deniz Suyu
4	Aliağa Petkim	Atık Su
5	İzsu Çiğli Atık Su Arıtım Tesisi	Atık Su
6	Halkapınar	Atık Su
7	Buca Gölet	Tatlı Su
8	Poligon Deresi	Tatlı Su
9	Buca Kaynaklar	Tatlı Su
10	Süs Havuzu Bornova	Havuz Suyu

Saf bakteri kolonileri elde edildikten sonra, bakteri tanılamasında ilk adım bakteri şeklinin ve gram boyama reaksiyonunun belirlenmesidir (Poindexter, 1991). Bu nedenle izolatlara gram boyama işlemi uygulanmış ve mikroskopta incelenmiştir. *Caulobacter* genusu üyelerinin yaşam döngüleri boyunca hareketli-hareketsiz hücre dönüşümünü periyodik olarak gerçekleştirmelerinden dolayı hareketlilik testi yapılmıştır (Poindexter, 1981). Oksijen gereksinimlerinin belirlenmesi amacıyla, gr (-) aerobik bakterilerle, fakültatif anaerobik bakterilerin ayrılmasında kullanılan enzim olan sitokrom oksidaz enziminin tespitini sağlayan oksidaz testi (Bradshow, 1963) yapılmıştır. İzolatların gereksinim duyduğu büyüme faktörlerinin belirlenmesi amacıyla şekerler (500.0-1000.0µg/ml), nişasta (2000.0µg/ml), amino asitler (200.0µg/ml), organik asitler (500.0-1000.0µg/ml), primer alkoller (500.0-1000.0µg/ml), vitaminler (Biyotin 0.0002µg/ml, Riboflavin 0.04µg/ml) denenmiştir. Kullanılan bu büyüme faktörleri membran filtreden (0,2µm) steril edilerek PYE bazal ortamına eklenmiştir. Büyüme faktörlü PYE bazal ortamında aktive edilen izolatlar 1 ml spotlanmış, 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bunun yanında her seferinde kontrol amaçlı sadece bazal PYE ortamından oluşan petrilere izolatlar spotlanmıştır. Bazal ortamda çok zayıf bir büyüme gözlenmektedir. Bazal ortama ilave edilen büyüme faktörlerinin kullanılması halinde ise bu ortamda belirgin bir büyüme gözlenmekte ise sonuç pozitif, izolatlar eğer bu maddeyi kullanmıyorlarsa bazal ortamın içeriğinden dolayı çok zayıf bir büyüme gözlenmekte ve bu da negatif sonuç olarak değerlendirilmektedir (Poindexter, 1981). İzolatlar, çeşitli oranlarda NaCl ilave edilen PYE ortamında büyümeleri açısından da test edilmiştir. Bu amaçla PYE ortamına %0.5, %2 ve %4 oranlarında NaCl ilave edilmiş ve organizmaların büyüme gösterip göstermedikleri izlenmiştir (Poindexter, 1986).

Ticari olarak hazırlanmış antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, besiyerine karıştırarak organizma ile aşılanmış PYE besi ortamlı petri yüzeylerine belirli aralıklarla yerleştirilir. 3-7 günlük inkübasyondan sonra disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçülerek antibiyotiğin etki derecesi belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler Ampisilin, Kanamisin, Kloramfenikol, Tetrasiklin, Streptomisin, Penisilin G ve Rifampin'dir (Poindexter, 1964; 1986).

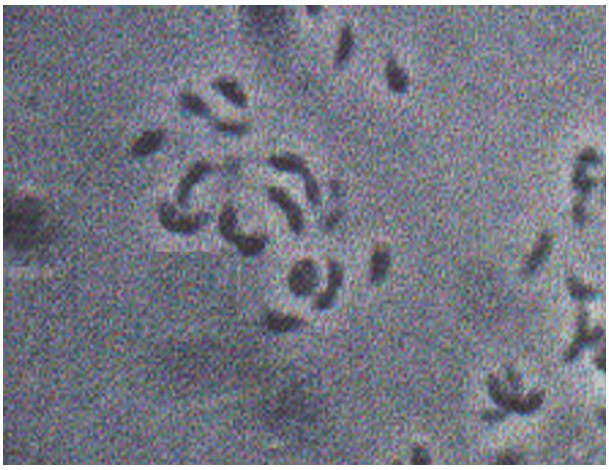
Bulgular

PYE, PCa, CPS ortamlarında büyüme gösteren kolonilerden alınan örnekler incelenmiştir. Deniz suyundan alınan örnekte *Caulobacter* genusu üyelerine rastlanmamıştır. Mikroskobik olarak incelenen ve çeşitli biyokimyasal testler uygulanan izolatların tanılanması gerçekleştirilmiştir. Tanılamada 'The Prokaryotes' kitabının 2 nolu cildindeki 'Dimorphic Prostecate Bacteria' bölümü (Poindexter, 1986), Bergeys Manuel of Systematic Bacteriology (Poindexter, 1991), Bacteriological Rewiews (Poindexter, 1964), Applied and Environmental Microbiology (Anast and Smit, 1988; MacRae and Smit, 1991) dergilerinden yararlanılmıştır. Ayrıca, çalışmada *C. leidyi* DSM 4733=ATCC 15260 tip türü incelenmiştir.

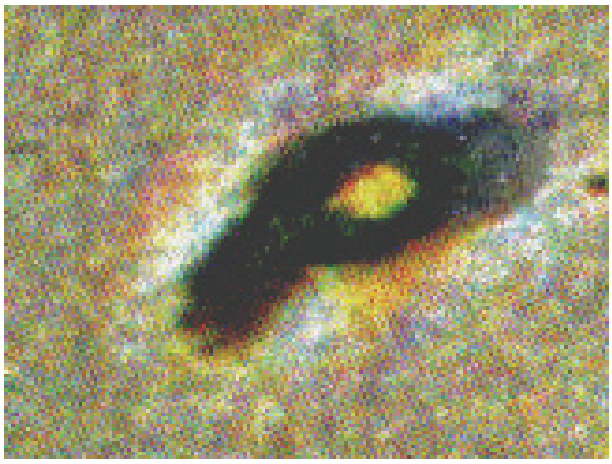
Caulobacter genusu üyeleri, gram boyama yapılarak incelenmiş sonuçta hepsinin gram (-) olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin morfolojik incelenmesinde sap yapısı çok kısa olduğundan ışık mikroskopunda gözlenmesi zorluk yaratcağından grays'in flajel mordantıyla muamele edilerek hücre çeperinin ve sap yapısının kalınlaşması sağlanarak incelenmiştir (Poindexter, 1991) (Şekil1 ve 2). İnceleme sonucunda 8, 11, 12, 22, 23, 25 numaralı izolatların vibroid şeklinde, diğerlerinin ovoid olduğu ve kısa sap yapılarına sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 2).

İzolatların oksijen gereksinimlerini belirlemek amacıyla yapılan oksidaz testi hepsi için pozitif sonuç vermiştir. Yine yapılan hareketlilik testi sonuçlarında da, tüm izolatlar hareketli olarak tespit edilmiştir. *Caulobacter* türleri kemoorganotrofik ve oligotrofik bakterilerdir. Büyümenin teşviklenmesinde çeşitli karbon kaynakları, azot kaynakları, amino asitler, organik asitler, primer alkoller ve vitaminler kullanılmaktadır. Bunları içeren bazal PYE ortamına spotlanan izolatların biyokimyasal testlerinin sonucunda, 29 izolatın 9'unun *C. leidyi* (1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 16 numaralı izolatlar), 14'ünün *C. variabilis* (3, 4, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 29 numaralı izolatlar), 6'sının *C. intermedius* (8, 11, 12, 22, 23, 25 numaralı izolatlar) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

İzolatların antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının belirlenmesi amacıyla penisilin G, ampisilin, kloramfenikol, tetramisin, rifampin, kanamisin ve streptomisin antibiyotikleri denenmiştir. Yapılan test sonucunda izolatların tümünün ampisilin ve penisilin G antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Streptomisin antibiyotiğine karşı ise sadece 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 16 numaralı izolatlar ile 30 numaralı tip tür dirençli iken diğer izolatların duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Kloramfenikol, tetrasiklin ve kanamisin antibiyotiklerine karşı ise sadece 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 16, numaralı izolatlar ile 30 numaralı tip tür duyarlı iken diğer izolatların dirençli olduğu saptanmıştır. Rifampin antibiyotiğine ise 16 numaralı izolat az hassas iken diğer tüm izolatların dirençli oldukları tespit edilmiştir (Tablo 4).



Şekil 1. Graysin Flajel mordantıyla muamele edilen *Caulobacter* (Tip tür ATCC 1560) hücrelerinin (x630) ışık mikroskobundaki görüntüsü.



Şekil 2. Graysin flajel mordantıyla muamele edilen *Caulobacter* (10 numaralı izolat) hücresinin (x630) ışık mikroskobundaki görüntüsü

Tartışma ve Sonuç

Yapmış olduğumuz çalışmada *Caulobacter*'lerin izolasyonu için, literatürlerde belirtildiği gibi PYE ve PCa ortamları kullanılmıştır. Ayrıca, deniz suyundan elde edilecek izolatların belirlenmesi içinde CPS ortamı kullanılmıştır. Ancak deniz suyundan alınan örneklerde *Caulobacter* türleri saptanamamıştır. Araştırmamızda, türlerin karakterizasyonunda klasik kültürel, morfolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır. Ayrıca 13 türü bulunan *Caulobacter*'in, *C. leidyi* tip türüde çalışmada kullanılmıştır. *Hyphomicrobium*'u zenginleştirme basamağında elektron donörü olarak metanole, karbon kaynağı olarak metanol,

metilamin, formaldahite gerek duymaktadır. *Pedomicrobium*'un sıvı ortamda zenginleştirilememesi sebebiyle ayrımı sağlanmaktadır. *Caulobacter* hücreleri çubuk, mekik, virgül, oval ya da limon şekillerinde, hareketsiz formda hücrenin tek kutbunda sap yapısını içerirken, yüzücü hücreler ise bir kutbunda tek bir flajele sahiptir. *Stella* genusu sahip olduğu yıldız şeklindeki hücre morfolojisi ile bu gruptan ayrılırken, *Prosthecobacter* ve *Anchalomicrobium* genusları hareket organeli olan flajele sahip olmamaları ile ayrıca *Anchalomicrobium* hücrede yanal iki uzantıya sahip olması ve fakültatif anaerobik olması ile ayrılmaktadır (Poindexter, 1986; Stahl ve ark., 1992). *Prosthecobacter* genusu ise hücrenin tek bir kutbunda iki tane sap yapısına sahip olması ile farklılık göstermektedir. Genus *Asticcacaulis* ise hücrede yanal bir yada iki sapa sahip olması ve büyüme faktörü olarak biyotine gerek duyması ve çubuk şeklindeki morfolojisinden dolayı bizim elde ettiğimiz türlerden farklılık göstermektedir (Poindexter, 1991). Genus *Gallionella* ise hücre merkezinde yer alan ve demir oksit içeren iki ya da daha çok sayıda sap içermektedir (Madigan ve ark., 2003).

Daha sonra genus içi morfolojik ve kültürel farklılıklara bakılmıştır. Çalışmada elde edilen izolatların 6'sının virgül şeklinde geri kalan 23 tanesinin oval olması nedeniyle mekik şeklinde morfolojiye sahip olan *C. fusiformis*, *C. kusnezovii* türlerinden, çubuk şeklinde olan *C. halobacteriodes*, *C. bacterioides*, *C. maris* ve *C. glutinosu*s türlerinden ayrılmaktadır. Yine elde edilen türlerin petride oluşturdukları koloni rengi kremdir. Bu özellikleri ile sarı ya da altın sarısı-kırmızı koloni oluşturan *C. henricii*'den sarı koloni oluşturan *C. fusiformis*'den ve koyu altın sarısı ve kavuniçi renk oluşturan *C. kusnezovii*'den ayrılmaktadır Enerji kaynağı ve büyüme faktörü olarak çeşitli şekerler, amino asitler, organik asitler, primer alkoller, vitaminler ve antibiyotik testleride kullanılmıştır (Poindexter, 1964; 1981; 1986). Tablo 3'de belirtilen testlerin sonunda tür tanısına gidilmiştir. NaCl'lü ortama ekilen izolatların %2 ve %4 oranlarında NaCl'lü ortamda hiç bir izolat büyüme göstermemiştir. Bu deneme ile *C. maris* ve *C. halobacteroides* türlerinden ayrımları sağlanmıştır (Poindexter, 1964; Anast ve Smit, 1988).

Biyotin ve riboflavin bulunan ortamlar izolatların büyümesini teşviklemediğinden, Biyotine gerek duyan *C. bacteroides* türünden ve riboflavine gerek duyan *C. vibroides* türünden ayrılmaktadır. Yine organizmaların hiçbiri nitratı indirgemediğinden, nitratı indirgeyebilen *C. maris* türünden farklılık göstermektedir.

Tablo 2. İzolatların morfolojik, kültürel özellikleri ve literatürle karşılaştırılması.

İzolat No.	Gr Reaksiyonu	Hücre Şekli	Hareketlilik Testi	Oksidaz Testi
1	-	Ovoid	+	+
2	-	Ovoid	+	+
3	-	Ovoid	+	+
4	-	Ovoid	+	+
5	-	Ovoid	+	+
6	-	Ovoid	+	+
7	-	Vibroid	+	+
8	-	Ovoid	+	+
9	-	Ovoid	+	+
10	-	Ovoid	+	+
11	-	Vibroid	+	+
12	-	Vibroid	+	+
13	-	Ovoid	+	+
14	-	Ovoid	+	+
15	-	Ovoid	+	+
16	-	Ovoid	+	+
17	-	Ovoid	+	+
18	-	Ovoid	+	+
19	-	Ovoid	+	+
20	-	Ovoid	+	+
21	-	Ovoid	+	+
22	-	Vibroid	+	+
23	-	Vibroid	+	+
24	-	Ovoid	+	+
25	-	Vibroid	+	+
26	-	Ovoid	+	+
27	-	Ovoid	+	+
28	-	Ovoid	+	+
29	-	Ovoid	+	+
30(ATCC 15260)	-	Ovoid	+	+
Lit. Özellik.	**Gr Reaksiyonu**	**Hücre Şekli**	**Hareketlilik Testi**	**Oksidaz Testi**
C. leidyi	-	Ovoid	+	+
C. variabilis	-	Ovoid	+	+
C. intermedius	-	Vibroid	+	+

Semboller:+: strainlerin %90'ı ya da üstü pozitif -: strainlerin %90'ı ya da üstü negatif

Tablo3. İzolatların biyokimyasal özellikleri.

Testler	**İzolat No**																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30 (ATCC 15260)
C Kay.																														
Ara.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Rib.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksi.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Glu.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galak.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Man.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Fruk.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lak.	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Malt.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sük.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Niş.Hid.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl																														
%0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.Asit																														
Ala.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaz.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
His.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lös.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Glu.A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Liz.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pro.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ser.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Tir.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Org. Asit.																														
Aset.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Büt.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lak.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Süks.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mal.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Fum.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pür.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Vit.																														
Biy.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribof.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pri. Alkol.																														
Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etan.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prop.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Büt.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pent.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat İnd.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Semboller: +: strainlerin %90'ı ya da üstü pozitif -: strainlerin %90'ı ya da üstü negatif, d: değişken

Caulobacter'lerin insanlara ve hayvanlara direkt zarar vermemelerine rağmen çevrede insanlarla ilişkili diğer bakterilere antibiyotik direnç genlerinin geri transferi ile mevcut antibiyotiklerin klinik ilaç olarak kullanımını sınırlayarak, antibiyotik direncinin rezervuarı olarak hizmet görebilme özellikleri nedeniyle çeşitli antibiyotikler açısından test edilmişlerdir.

Ampisilin ve Penisilin G gibi β-laktam antibiyotikler grubunda olan antibiyotikler daha çok Gr (+)'lerde hücre duvarını ve glikopeptid yapıdan sorumlu transpeptidazı inaktive etmektedir. İncelenen tüm türlerde (Gr -) penisilin G, ampisilin ve rifampin antibiyotiklerine dirençli bulunmuştur. Tetrasiklin ve kloramfenikol, streptomisin kanamisin gibi ribozomların 30S ve 50S alt birimlerine etki eden antibiyotiklerden (Jacob, 1992), tetrasiklin, kanamisin ve kloramfenikole *C. variabilis* ve *C. intermedius* türleri dirençli iken streptomisin antibiyotiğine sadece *C. leidyi* türü üyeleri dirençlidir.

Tablo 4. İzolatların antimikrobiyal alanlara olan duyarlılıkları (Büyüme Zon Çapı mm) ve literatürle karşılaştırılması.

İzolat No.	Amp.	Kloramf	Rif.	Pen G	Strep.	Tetr.	Kan.
1	0	18	10	4	0	21	20
2	0	18	10	4	0	20	18
3	0	0	5	4	15	12	10
4	0	0	12	4	15	10	12
5	0	15	8	0	11	18	18
6	0	19	4	0	10	20	18
7	0	18	13	0	10	20	18
8	0	5	0	5	16	12	4
9	0	15	10	0	11	18	18
10	0	18	10	0	10	18	20
11	0	7	13	4	15	13	12
12	0	8	12	4	18	14	12
13	0	7	10	4	20	14	12
14	0	0	4	0	18	14	4
15	0	22	15	0	9	25	18
16	0	20	18	6	11	22	20
17	0	8	10	0	17	14	10
18	0	0	13	0	20	10	8
19	0	0	15	0	25	14	10
20	0	0	15	6	20	12	10
21	0	7	10	0	20	12	12
22	0	4	10	0	18	10	7
23	0	5	13	4	18	10	12
24	0	0	10	0	18	13	10
25	0	4	5	0	15	10	8
26	0	5	5	0	15	14	10
27	0	4	10	4	20	13	10
28	0	4	14	0	16	14	10
29	0	4	15	0	20	9	12
30(ATCC 15260)	0	18	15	0	11	20	20
Lit.deki Özellik.	Amp.	Kloramf	Rif.	Pen G	Strep.	Tetr.	Kan.
C. leidyi	-	+	-	-	-	+	+
C. variabilis	nd	nd	nd	-	+	nd	nd
C. intermedius	nd	nd	nd	-	+	nd	nd

Semboller: nd: belirlenmemiş.

MacRae ve Smit (1991) adlı araştırıcılar tarafından Amerika'da yapılan çalışmada çeşitli atık su tesislerinden alınan örneklerde benzer yöntemlerle 33 *Caulobacter* üyesi olduğu düşünülen ırkla çalışılmıştır. Kültürel ve biyokimyasal yöntemlerle çalışılan türlere Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-Page) ile total protein profillerine bakılmış, çeşitli DNA fragmentleri kullanılarak gen hibridizasyon yöntemleri uygulanmıştır. İzolatların büyük çoğunluğu ampisilin, penisilin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençliyken, streptomisine duyarlı olduğu görülmüştür.

Anast ve Smit (1987) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, deniz suyundan alınan örneklerden 25 izolat biyokimyasal analizlerden sonra ileri karakterizasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. DNA hibridizasyon yöntemleri uygulanmış ve çalışmalar sonucunda izolatların *Caulobacter* genusu üyeleri olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada, kültürel, morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda *Caulobacter* genusuna dahil, *C.leidyi*, *C. variabilis*, *C. intermedius* türleri izole edilmiştir. Ancak tür tanısının kesin olarak konulmasında ileri moleküler biyolojik testlere gerek duyulmaktadır. Hibridizasyon çalışmalarında, özellikle yüzey tabaka proteini ve flajel oluşum genleri tercih edilmektedir. Ayrıca total protein profilleri, plazmit konjugasyon yöntemleri de kullanılmaktadır (Laub ve ark., 2000). Çalışma sonunda elde ettiğimiz *Caulobacter* türlerinin stok kültürleri, ileri çalışmalarda kullanılmak üzere Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü , Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür kolleksiyonunda mevcuttur.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi, Araştırma Fonu tarafından 2001 FEN 036 sayılı proje ile desteklenmiştir

Kaynakça

Anast, J., J. Smit. 1988. Isolation and Characterization of Marine *Caulobacter* and Assesment of Their Potential for Genetic Experimentation. Appl. Environ. Microb., 54:809-817.

Awram, P., J. Smit. 2001. Identification of Lipopolisaccaride O Antigen Synthesis Genes Required for Attachment of the S-Layer of *Caulobacter crescentus*. Microbiology., 147:1451-1460.

Bradhshow, L. J. 1963. Laboratory Microbiology. WB Saunders Company. p. 289. Philadelphia and London.

Ely, B. 1979. Transfer of Drug Resistance Factors to the Dimorphic Bacterium *Caulobacter crescentus*. Genetics., 91: 371-380.

Jacob, L. S. 1992. Farmacology, (in Turkish), (çev. S. Koşay), Saray Tıp Kitabevi. 366 s. İstanbul.

Lafferty, R. M., B. Korsatko, and W. Korsatko. 1988. Production of Poly-β-hydroxybutryic acid. Biotechnol., Vol: 6b, 135-176.

Laub, M. T., H. H. McAdams, T. Feldbium, C. M. Fraser and L. Shapira. 2000. Global Analysis of the Genetic Network Controlling the *Caulobacter* Cell Cycle. Science., 290: 2144-2148.

MacRae, J. D., J. Smit. 1991. Characterization of *Caulobacters* Isolated from Waste Water Treatment Systems. Appl. Environ. Microb., 57: 751-758.

Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker. 2003. Brock Biology of Microorganisims (10th Edition). p. 1019. New Jersey.

Njaka-Umelo, E., J. F. Nomellini, W. H. Bingle, L. G. M. Glasier, R. T. Irvin and J. Smit. 2001. Expression and Testing of *Pseudomonas aeroginosa* Vaccine Candidate Proteins Prepared with the *Caulobacter crescentus* S-Layer Protein Expression System. Vaccine., 19: 1406-1415.

Nomellini, J. F., S. Kupcu, U. B. Sleytr and J. Smit. 1997. Factors Controlling *in vitro* Recrystallization of the *Caulobacter crescentus* Paracrystalline S-Layer. J. Bacteriol., 179: 6349-6354.

Poindexter, J. S. 1964. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. Bacteriol. Rev., Vol: 28, 231-395.

Poindexter, J. S. 1981. The *Caulobacters*: Ubiquitous Unusual Bacteria. Microbiol. Rev., 45: 123-179.

Poindexter, J. S. 1986. Bacteria that Divide by Binary Transverse Fission. In: Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology (eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfenning, J. G. Holt) pp: 1924-1939. Vol 3, Williams&Wilkins, Baltimore.

Poindexter, J. S. 1991. Dimorphic Prosthecate Bacteria. In: The Prokaryotes (eds. A. Ballows, H. G. Truper, M. Dwarkin, W. Harder, K. H. Schleifer) pp: 2176- 2196. Vol: 2, New York.

Reichelt, M., B. U. Von Specht and H. P. Hahn. 2001. The *Caulobacter crescentus* Outer Membrane Proteine Omp58 (RsaA) is not Required for Paracrystalline S-Layer Secretion. FEMS Microbiol. Lett., 201: 277-283.

Stahl, D. A., R. Key, B. Flesher and J. Smit. 1992. The Phylogeny of Marine and Fresh Water *Caulobacters* Reflects Their Habitat. J. Bacteriol., 2193-2198.

Wingrove, J. A., J. W. Gober. 1995. *Caulobacter crescentus* Overview and Cell Cycle. Dev. Biol., 6: 325-333.