

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTI-FOULİNG BOYALARIN DENİZDEKİ  
BAKTERİYAL BİYOFİLM GELİŞİMİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Aslı KAÇAR**

**Eylül, 2009**  
**İZMİR**

# **ANTI-FOULING BOYALARIN DENİZDEKİ BAKTERİYAL BİYOFİLM GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Doktora Tezi**

**Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Canlı Deniz Kaynakları Anabilim Dalı**

**Aslı KAÇAR**

**Eylül, 2009**

**İZMİR**

## DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ASLI KAÇAR, tarafından PROF. DR. BÜLENT CİHANGİR yönetiminde hazırlanan “ANTI-FOULİNG BOYALARIN DENİZDEKİ BAKTERİYAL BİYOFİLM GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent CİHANGİR

Yönetici

Prof. Dr. Hüseyin Avni BENLİ

Tez İzleme Komitesi Üyesi

Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Tez İzleme Komitesi Üyesi

Prof. Dr. Filiz KÜÇÜKSEZGİN

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Gülşen ALTUĞ

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Cahit HELVACI  
Müdür  
Fen Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Bülent CİHANGİR ve tez izleme komitesi üyeleri Sayın Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR ve Sayın Prof. Dr. Hüseyin Avni BENLİ'ye, kimyasal analizlerdeki yardımları dolayısıyla Prof. Dr. Filiz KÜÇÜKSEZGİN ve kimya laboratuvarı ekibine, çalışmada kullandığımız deniz boya larını tedarik eden DYO Boya Fabrikaları Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ye, Levent Marina ve Çeşme Setur Marina Yönetimlerine, kafes sistemlerinin hazırlanmasında emeği geçen Yüksek Makine Mühendisi Bilal NURİLER'e, örnekleme sürecinde ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Öğr. Gör. Dr. Sibel AVUNDUK, Araş. Gör. Dr. Ali KOÇYİĞİT, Araş. Gör. Dr. Barış AKÇALI, Araş. Gör. Enis DARILMAZ, Araş. Gör. Remzi KAVCIOĞLU ve Yüksek Su Ürünleri Mühendisi İdil AKÇALI'ya, tüm çalışma arkadaşlarıma ve özellikle her zaman sevgi ve destekleriyle yanımda oldukları için aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma 2005.KB.FEN.044 nolu proje ile Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğüne desteklenmiştir. Bu nedenle, ayrıca Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Aslı KAÇAR

# ANTI-FOULING BOYALARIN DENİZDEKİ BAKTERİYAL BİYOFİLM GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

## ÖZ

Biyofilm bakterileri sualtı yapılarda ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, sabit plakalar yüzeyinde hücre dışı polimerik maddeler (EPS) üreten biyofilm bakterilerinin tanımlanmaları ve çeşitli antifouling ajanların biyofilm bakterilerinin gelişimini engelleyen minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MICs) tespitidir. Boyalardaki antifouling ajanlar olarak, çinko oksit, bakır oksit, tribütülin, florin, triazine diamin gibi katkıları kullanılmış boyalar ve bir de sadece antipas boya uygulanmıştır. Örneklem sürecince, İzmir civarında yer alan iki yat limanında bulunan test plakalarının tümünde bakteriyal büyüme gözlenmiştir. Çalışma süresince plakaların yüzeyinden yüz yirmi ırk kültüre edilmiş, bunlardan yirmi tanesi ileri biyokimyasal ve moleküler analizlerle karakterizasyon için seçilmiştir. Ribozomal DNA dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda, yirmi ırkın  $\gamma$ -Proteobacteria ve Firmicutes (*Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Klebsiella*, *Vibrio* ve *Exiguobacterium*) alt sınıflarına dahil oldukları belirlenmiştir. Sekiz ırk, EPS üretme yetenekleri açısından ve EPS'lerindeki şeker ile protein içeriklerinin belirlenmesi açısından ileri testler için seçilmiştir. Çalışmada, hücre büyümesi ile EPS verimliliği açısından negatif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. EPS'lerdeki şeker içerikleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirlenmiştir. EPS yapısında şekerler olarak glukoz, galaktoz, fruktoz ve ramnoz tespit edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu analizlerinde triazine diamin ve bakır oksit içeren boyanın bireysel ırklara karşı en güçlü antibakteriyal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bireysel biyofilm bakterileri, antifouling boyalara karşı oldukça duyarlı iken biyofilmin gelişmesini takiben direnç kazanmaktadırlar. Ayrıca, çalışma süreci boyunca, toplam canlı bakteri yoğunluğu ile deniz suyunun fiziko-kimyasal değişkenleri arasında ilişki görülürken, toplam canlı bakteri yoğunluğu ile besin elementleri arasında güçlü bir korelasyon bulunamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm bakterileri, Hücre dışı polimerik maddeler, Yat limanı, Anti-fouling boyalar

# EFFECTS OF ANTI-FOULING PAINTS ON MARINE BACTERIAL BIOFILM DEVELOPMENT

## ABSTRACT

Biofilm bacteria can cause several problems in marine infrastructures. The goal of the research was to isolate and identify biofilm bacteria that produce extracellular polymeric substance (EPS) on static panels and to determine minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antifouling agents preventing the growth of biofilm bacteria. Zinc oxide, copper oxide, tributyltin, fluorine, triazine diamine based additives and one type rustproof paint were used as the antifouling agents in the paints. Bacterial growth was detected on all test panels coated by each of the antifouling paints during the sampling period in the two marinas located at the Izmir region. One hundred twenty strains isolated from the test panels were cultured, and a total of twenty unique strains were selected for further characterization using biochemical and molecular methods. Phylogenetic analysis using rDNA sequences indicated that the twenty strains belonged to the  $\gamma$ -Proteobacteria subclass and Firmicutes subclass (*Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Klebsiella*, *Vibrio*, and *Exiguobacterium*). Eight isolates were selected for further study based on their EPS-producing ability and sugar and protein contents of the EPS. Cell growth and EPS productivity were found to be negatively correlated. Sugar composition of EPS were determined by thin layer chromatography (TLC). It was observed that of these polysaccharides contained glucose, galactose, fructose and rhamnose. The paint, which contains triazine diamine and copper oxide, showed strong antibacterial activity against each individual strains in the MIC test. It was observed that while biofilm bacteria were very sensitive to antifouling paints, they were able to gain resistance following the development of biofilm. Additionally, physico-chemical parameters of seawater and viable bacteria counts displayed relations during the study period. However, it was not found any strong correlation between viable bacteria density and nutrient concentrations.

**Keywords:** Biofilm bacteria, Extracellular polymeric substances, Marina, Anti-fouling paints

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa</b>
DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ.....	iv
ABSTRACT.....	v
<b>BÖLÜM BİR-GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mikrobiyal Biyofilmler.....	1
1.1.1 Biyofilm Yapısı.....	3
1.1.2 Biyofilm Oluşumu.....	7
1.1.2.1 Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi ve Bakteriyal Sinyaller.....	8
1.1.2.1.1 Biyofilmdeki Bakteriyal Sinyaller.....	11
1.1.3 Biyofilm Direnci.....	12
1.1.4. Biyofilmden Yararlanılan Alanlar.....	13
1.1.5. Biyofilmin Neden Olduğu Zararlı Etkiler.....	14
1.2 Biyofouling.....	15
1.2.1 Biyofouling Süreci.....	15
1.2.2 Biyofoulinge Neden Olan Organizmalar.....	20
1.2.3 Foulingin Etkileri.....	26
1.3 Biyofilm Yapısında Tanıladığımız Bakteriyal İzolatların Genel Özellikleri...	27
1.3.1 Cins; <i>Alteromonas</i> ve <i>Pseudoalteromonas</i> .....	27
1.3.1.1 Ekolojik Önemleri ve Biyoteknolojik Önemleri.....	28
1.3.1.1.1 Sekonder Metabolitler.....	31
1.3.2 Cins; <i>Vibrio</i> .....	34
1.3.3 Cins; <i>Klebsiella</i> .....	35
1.3.4 Cins; <i>Exiguobacterium</i> .....	36
1.4 Antifouling (AF) Boyalar.....	36
1.4.1 Antifouling Sistemlerin Tarihsel Gelişimi.....	36
1.4.1.1 19. Yüzyılın Ortalarından Önce Kullanılan İlk Teknolojiler.....	36

1.4.1.2 20. Yüzyılın İkinci Yarısında Uygulanan Temel Ürünler.....	38
1.4.1.2.1 Toksik Pigmentler.....	38
1.4.1.2.2 Çözünür Matrisli Boyalar.....	40
1.4.1.2.3 Çözünmeyen Matrisli Boyalar.....	41
1.4.1.2.4 TBT Self-polishing (Kendi yüzeyini cilalayan) Boyalar.....	41
1.4.1.3 Daha Çevreci Boyalar.....	44
1.4.1.3.1 Kalay İçermeyen Kontrollü Azalan Boyalar.....	44
1.4.1.3.2 Kalay İçermeyen Biyosit Temelli Self-polishing Boyalar.....	44
1.4.1.3.3 Hibrid Boyalar.....	45
1.4.1.3.4 Biyosit İçermeyen Boyalar.....	45
1.4.1.4 Son Gelişmeler.....	45
1.4.1.4.1 Biyomimetik (Biyo-taklitçi) Yaklaşım.....	45
1.4.1.4.2 Diğer Yöntemler.....	47
1.4.2 Antifouling Boyalar ve Biyofilm Arasındaki Etkileşim Mekanizmalarının Potansiyel Kaynakları.....	48
1.4.3 Denizel Çevrenin Antifouling Boyalara Etkisi.....	49
<b>BÖLÜM İKİ-MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>50</b>
2.1 Materyal.....	50
2.1.1 Örnekleme Bölgeleri.....	50
2.1.2 Kafes Sistemlerinin Hazırlanması.....	51
2.1.3 Mikrobiyolojik Analizler.....	53
2.1.3.1 Kullanılan Besiyerleri.....	53
2.1.3.2 Kullanılan Bazı Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler.....	56
2.1.3.3 Kullanılan Test Kitleri.....	58
2.2 Metod.....	63
2.2.1 Çevresel Değişkenlerin Ölçülmesi (Fiziko-kimyasal Analizler).....	63
2.2.2 Besin Elementleri Analizleri.....	63
2.2.3 Biyofilm Bakterilerinin İzolasyonu.....	63
2.2.4 Bakteriyal İzolatların Tanılanması.....	64



2.2.4.1 Kültürel Özellikler.....	64
2.2.4.2 Mikroskopik Testler.....	64
2.2.4.3 Biyokimyasal Testler.....	64
2.2.4.3.1 KOH Testi.....	65
2.2.4.3.2 Oksidaz Testi.....	65
2.2.4.3.3 Katalaz testi.....	65
2.2.4.3.4 Hareketliliğin Saptanması.....	65
2.2.4.3.5 Oksidasyon/Fermentasyon/ Testi.....	65
2.2.4.3.6 Oksijen İsteğinin Belirlenmesi.....	66
2.2.4.3.7 MacConkey Agarda Üreme.....	66
2.2.4.3.8 API 20E Tanılama Testi.....	67
2.2.4.3.9 API 20NE Tanılama Testi.....	67
2.2.4.4 Moleküler Tanılama.....	68
2.2.4.4.1 DNA İzolasyonu.....	69
2.2.4.4.2 DNA'ların Saflık Kontrolü.....	69
2.2.4.4.3 PCR.....	70
2.2.4.4.4 PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	71
2.2.4.4.5 PCR Ürünlerinin Nükleotid Dizilerinin Belirlenmesi.....	72
2.2.4.4.6 Nükleotid Dizisi ile Tür Tayininin Yapılması.....	73
2.2.5 EPS Analizleri.....	73
2.2.5.1 İzolatların Hücre Kuru Ağırlıklarının Tayini.....	73
2.2.5.2 EPS Ekstraksiyonu.....	73
2.2.5.3 EPS Kuru Ağırlığının Belirlenmesi.....	74
2.2.5.4 EPS Verimi Katsayısının Hesaplanması.....	74
2.2.5.5 EPS'lerin Toplam Şeker Analizleri.....	74
2.2.5.6 EPS'lerin Toplam Protein Analizleri.....	75
2.2.5.7 EPS'lerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Şeker İçeriklerinin Belirlenmesi.....	75
2.2.6 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Testi.....	75
2.2.7 İstatistiksel Analizler.....	76

<b>BÖLÜM ÜÇ-BULGULAR.....</b>	<b>77</b>
3.1 Çevresel Değişkenlerin Ölçülmesi (Fiziko-kimyasal Analizler).....	77
3.2 Besin Elementleri Analizleri.....	79
3.3 Mikrobiyolojik Analizler.....	83
3.3.1 Toplam Canlı Bakteri Yoğunluğu.....	83
3.3.2 Biyokimyasal ve Moleküler Analizler.....	88
3.3.3 EPS Üretim Analizleri.....	96
3.3.3.1 İzolatların Hücre Kuru Ağırlıklarının ve EPS Verimlerinin Saptanması.....	96
3.3.3.2 EPS'lerin Toplam Şeker Analizleri için 490nm'de ve Toplam Protein Analizleri için 595nm'de Çıkarılan Standart Grafikler ve Analiz Sonuçları.....	96
3.3.3.3 EPS'lerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Şeker İçeriklerinin Belirlenmesi.....	99
3.3.4 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MICs).....	100
<b>BÖLÜM DÖRT-TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>103</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>118</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>135</b>

# BÖLÜM BİR

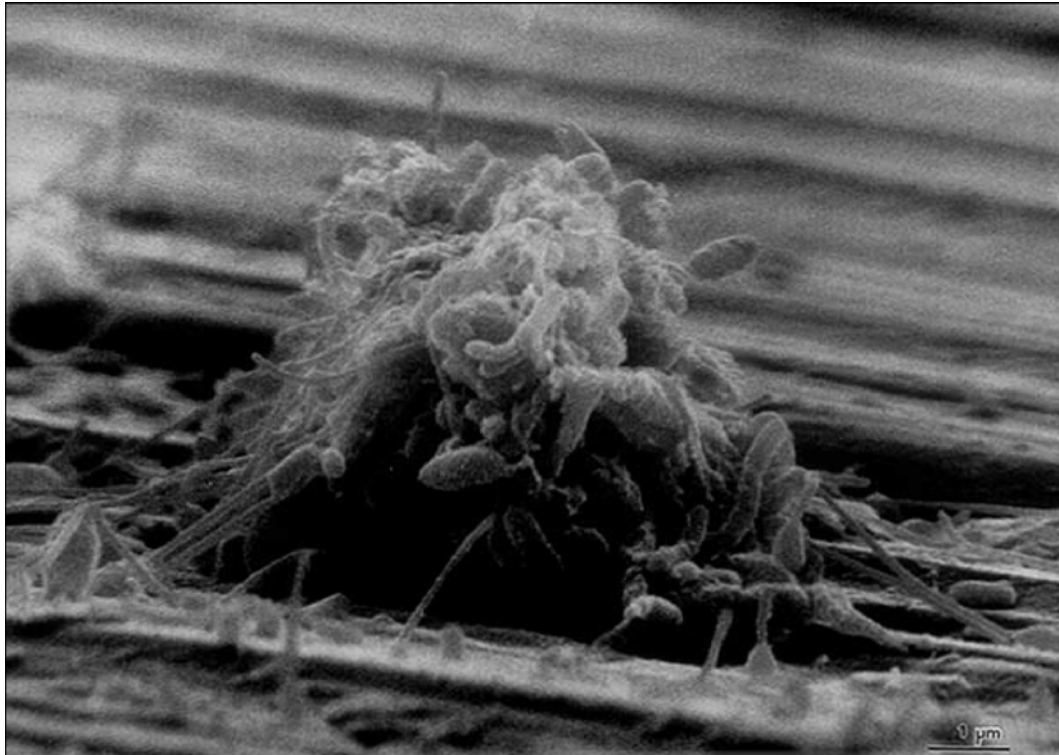
## GİRİŞ

### 1.1 Mikrobiyal Biyofilmler

Doğal çevrelerdeki bakterilerin çoğu, sıvı-katı ve sıvı-hava yüzeyleri içeren ortamlarda, biyofilm oluşturacak şekilde gelişim gösterirler. Mikroorganizmaların, çeşitli yüzeyler üzerinde tutunarak salgıladıkları, ekstraselüler (hücre dışı) polimerik cıvık matris içinde oluşturdukları yığına, biyofilm denmektedir (Tang ve Cooney, 1998). Özellikle, ıslak yüzeylerde oluşan biyofilm bakterilerinin, fenotipik olarak planktonik hallerinden farklı oldukları bildirilmiştir. Bu farklılıktan yola çıkarak, cıvık yapıdaki topluluklara, İngilizce “canlı tabakalar” anlamına gelen biyofilm isimlendirmesi uygun görülmüştür (Ceyhan, 2008; Madigan, Martinko ve Parker, 2003). Çeşitli yüzeyler mikroorganizmalar için önemli yerleşim alanlarıdır, çünkü yüzeyler besin maddelerini tutarak biriktirirler. Besin maddeleri, sıvıdaki hacimlerinden daha fazla miktarlarda, bu yüzeylerde bulunabilir. Sonuç olarak, mikrobiyal sayı ve aktivite, yüzeylerde sudakinden çok daha fazladır (Madigan ve ark., 2003). Mikrobiyal biyofilmlerin temel yapısal bileşeni EPS (hücre dışı polimerik maddeler)’dir. Biyofilmin, ana iskelet olarak mikrobiyal hücreler ile EPS’den oluştuğu ve EPS’nin toplam organik karbonun %50-90’ını barındıran bir matris oluşturduğu kabul edilmiştir (Donlan, 2002; Lazarova ve Manem, 1995; Sutherland, 2001a). EPS, terminolojide hücre dışı polimerik maddeler, ekzopolisakkaritler ya da ekzopolimerler terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır. Biyofilm tabakasında, bakterilerin hücre dışına salgıladıkları maddelerdir ve bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünülmektedir (Şekil 1.1) (Zhang, Bishop ve Kinkle, 1999).

Biyofilm yapısı, hem bulunduğu yüzeyin özellikleriyle, hem de çevresel faktörler ile yakından ilişkilidir. Bu yapı, besin miktarlarındaki değişimlerin etkileri ile çevresel strese korunmayı sağlayan ve biyositlere karşı direnci arttıran bir düzendedir (Chambers, Stokes, Walsh ve Wood, 2006). Bir çok ırk, ırka özgü tek bir EPS’den ziyade, yaşamları boyunca oluşumlarında değişimlere uğrayabilen farklı

EPS'ler de üretebilmektedir. EPS'ler, farklı biyofilm topluluklarında yapı ve fonksiyon bakımından değişik rollere sahiptir. Biyofilmlerin yeryüzündeki en eski yaşam formlarından birini temsil etmeleri ve sınırlı çevrelerde dahi bulunabilmelerinin, mikrobiyal hücreler açısından önemli avantajlar sağladığının işaretleri olduğu düşünülmektedir (Allison, 2003; Ceyhan, 2008; Donlan ve Costerton, 2002; Fang, Xu ve Chan, 2002; Jefferson, 2004; Madigan ve ark., 2003; Sutherland, 2001b).



Şekil 1.1 Endüstriyel su sisteminde, metal yüzey üzerinde oluşan biyofilmin scanning elektron mikroskobundaki görüntüsü (Donlan ve Costerton, 2002).

EPS, hücre için gerekli besin maddelerini, organik molekülleri, iyonları bağlayabilir. Besin kıtlığı durumunda ise, bakterilerin kendilerinin ya da diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkıma uğratarak, beslenme amacıyla tükettikleride bilinmektedir (Christensen ve Characklis, 1989). Ayrıca, polisakkarit varlığından dolayı kuraklığa, parçalanmaya, pH dalgalanmalarına, antibiyotikler, biyositler, ağır metaller gibi toksik bileşiklere karşı, hücreleri fiziksel olarak da korumaktadır. Örneğin, U.V. radyasyon ve diğer DNA'yı tahrip edici bazı ajanların, bir EPS olan aljinat ile sabitlenmesiyle *Vibrio fischeri*'nin, bu hasardan korunduğu tespit edilmiştir.

Yine EPS üretimini, *Klebsiella aerogenes*'i bakır ve kadmiyum iyonlarının toksik etkisinden koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca, EPS oluşumuyla genetik materyalin, hücreler arası transferi de kolaylaşmaktadır. Yeni gözlenen bazı plazmitlerin (kromozomdan bağımsız, dairesel DNA dizisi), denizel çevrelerdeki biyofilmlerden izole edildiği bildirilmiştir. Bir *Pseudomonas putida* ırkının, civa direncini, biyofilm ortamından temin ettiği plazmitlerden sağladığı belirlenmiştir (Ceyhan, 2008; Dahlberg, Lindberg, Torsvik ve Hermansson, 1997; Davey ve Ootole, 2000).

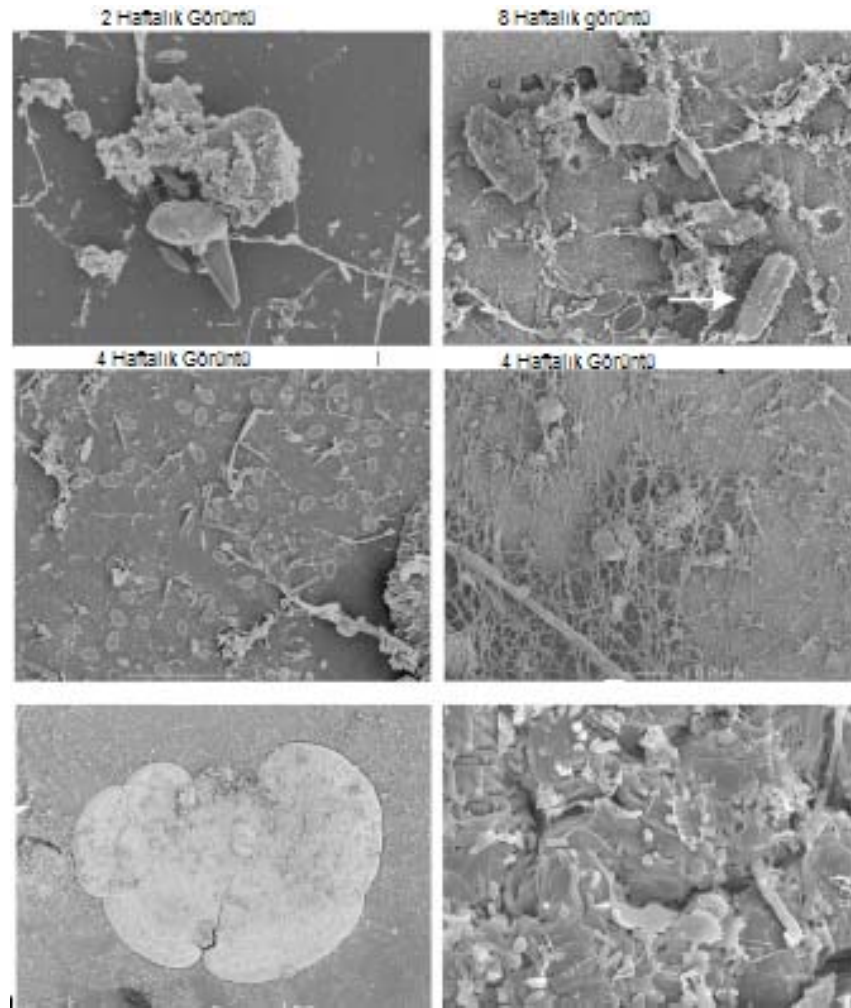
Patojenik bazı durumlarda ise, konak canlıının makrofajlarının bağlanmasına ve antikorların nüfuz etmesine karşı hücreleri korumaktadır. Bir çok potansiyel patojenin (*Legionella pneumophila*, *Cryptosporidium spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Helicobacter pylori*, *Rotavirus*, *Giardia*, enteroviruslar, mikoplazmalar, amip gibi protozoonlar, *Candida spp.* vb.) biyofilmlerle ilişkili olduğu saptanmıştır (Ceyhan, 2008; Donlan, 2002; Douglas, 2003; Watnick ve Kolter, 2000).

### **1.1.1 Biyofilm Yapısı**

Sucul ortamda gelişen biyofilm topluluğu; bakterileri, mantarları, algleri, protozoonları, hatta nematodları, rotiferleri ve çeşitli larvaları içerebilir (Şekil 1.2) (Donlan, 2002; Webster ve ark., 2004). Biyofilm yapısı, kararlı ancak çevresel değişimlere cevap veren, son derece dinamik bir sistemdir. Biyofilm yapısı içinde üretilen EPS üzerinde, büyüme ortamının direkt bir etkisi vardır. Örneğin; katı yüzeyde büyütülen bakterilerin, sıvı besiyerinde yetiştirilenlerle karşılaştırıldıklarında çok daha büyük miktarda EPS ürettikleri saptanmıştır. Bununla beraber, büyüme oranı ve besin azlığı gibi diğer çevresel faktörler de bu yanıtın oluşmasına katkıda bulunur; ayrıca katı yüzeyde büyüyen hücreler, düşük büyüme oranında bile planktonik olanlardan çok daha fazla miktarda EPS üretirler (Ceyhan, 2008; Shankar, Ye, Schlichtman ve Chakrabarty, 1995;).

Bakteriyal EPS'lerin çoğunluğu, düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazı bakteriyal EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır. Heteropolisakkaritler, hücre

içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için, bir çok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Genelde % 10-95'i polisakkarit, %1-60 protein, %1-10 nükleik asitler, %1-40 yağlar ve üronik asitler gibi çeşitli bileşenlerden oluşan yapı, besin elementleri ile oksijenin alımına ve metabolik yan ürünlerin uzaklaştırılmasına izin verecek düzendedir (Lee, Kwon, Cho, Kim, Park ve Lee, 2003; Sutherland, 1990).



Şekil 1.2 Diyatomların ve larvaların oluşturduğu biyofilmin, scanning elektron mikroskopundaki görüntüsü. (Webster ve ark., 2004).

Bakteriler, çeşitli yüzeylere bir çok farklı yolla tutunma ve yapışma yeteneğindedirler. Bir çok bakteri, çeşitli maddelere karşı çekicilik gösterir, örneğin sentetik polimerler gibi (Pashmore ve ark., 2001). Tutunmada görev alan tekniklerden biri, membran bağlı proteinlerdir. Bunlar, belli yüzeylerle yüksek çekim

eğilimi gösterir. Örneğin, *Thiobacillus ferrooxidans* pirit için aporustisiyanin proteinini, *Staphylococcus aureus* ise ökaryotik hücrelere tutunmak için kollajen bağlı proteinleri ve fibronektini kullanmaktadır (Blake ve Ohmura, 1998; Foster ve Hook, 1998). Diğer bir yöntem, bazı türlerin yüzeye tutunmak için EPS'leri üretmesidir. Proteinlerden daha az spesifik olmalarına rağmen şekerler, itici elektrostatik yüzey güçlerinin üstesinden gelmede daha başarılıdırlar. Ayrıca, salgılanan bu polimerler, bir çok kimyasal fonksiyonel gruba sahiptir. Kovalent bağlar, hidrojen bağları vb. tutunmaya yardımcı etkenlerdir (Chen ve Stewart, 2002; Pashmore ve Costerton, 2003).

Hareketli bakteriler, ek tutunma teknikleri geliştirmişlerdir. Flajelli bakteriler (Ör; *Pseudomonas*), saplı bakteriler (Ör; *Caulobacter*) gibi. En etkili strateji ise, tip IV pilinin kullanımınıdır. Bakteriler, hücre duvarından yüzeye doğru pilusu fırlatırlar. Pilus, hücre içinden fırlatıldıktan sonra, hücreyi yüzeye doğru çeker (O'Toole ve Kolter, 1998).

Çözünmüş moleküller, çeşitli yüzeylere doğal yollarla hızlıca tutunurlar. Yapay bir yüzey, suya daldırıldıktan sonra 30dk. içinde, yüzey hızla moleküler kaplanmayla karşı karşıya kalır (Characklis ve Marshall, 1990; Pashmore ve ark., 2001). Bu moleküler tabaka, bakteri hücrelerinin çekimi ve tutunması için kimyasal grupları sağlar ve yüzeydeki itici kuvvetlerin etkisini azaltır. Aynı zamanda, bu tabakadaki organik moleküller, yüzey ilişkili bakteriler için besin kaynağını da oluşturur (Pashmore ve Costerton, 2003).

Biyofilm oluşturan bakteriler, yüzeye tutunma sürecine hızlı yanıt verme yeteneğindedirler. Örneğin, tutunmadan 45dk. sonra, bakteriler hücre dışı polimerik maddeleri üretmeye başlarlar. Bunun yanında, biyofilm oluşumu hemen gerçekleşmez. Yüzeyi tanıma, kabullenme hızlı gerçekleşirken, olgun biyofilm oluşumu 12 saat ile haftalar arasında yapılır (Characklis ve Marshall, 1990). Biyofilm gelişimi, basamak basamak olmaktadır. Yüzeyde hareketli bakterilerin bir çoğu, kümeler halinde hareket ederek yüzmeye ve seğirme, sıçrama (twitching) hareketlerine devam ederler. Bu kapıp çekme, sıçrama, kayma hareketleri,

bakterilerin yüzey ve mikrokolonilerden oluşan yığınların içinden hareket etmelerine ve biyofilm oluşum aşamasında, boş yüzey alanlarında da hızla çoğalmalarına izin vermektedir. Bunun yanında, biyofilm yapısı yüzeyde oluşmaya başladıktan ve bakteriler yüzeye bağlandıktan sonra, hareket neredeyse durma noktasına gelmektedir (O'Toole ve Kolter, 1998). Üretilen EPS oldukça esnek, uzun moleküllü polimerik maddelerdir. Bu moleküller, yüzeyle ilgili yapışma mekanizmasını ve hücreler arası tutunma kararlılığını sağlamaktadır (Mayer ve ark., 1999). Yüzeyi kaplama süreci, iki farklı yol ile olmaktadır. İlki, bireysel hücrelerden, seğirme, sıçrama hareketleri ile hücresel yığınların oluşmasıyla, yapının gelişmesi (Tolker-Nielsen ve ark., 2000). İkinci yol ise, hücrelerin bölünerek çoğalmaya devam etmesi suretiyle, biyofilmin yüzeyden dışa doğru genişlemeye devam etmesidir (Characklis ve Marshall, 1990). Biyofilmin genişlemesi ve büyümesi, bakteri sayısındaki artışla birlikte, aynı derecede ihtiyaç duyulan besin elementlerinin miktarında da artışa yol açar. Bir çok sistem de, bunun anlamı, katı yüzeye en yakın hücrelerce besin elementlerinin hızlı bir şekilde kapılmasıdır. Biyofilmdeki hücreler, besin elementlerinin tüketilmesi ile, besin elementlerinin çoğunu almak için en yakın hücrelerce çevrenin sarılmasını sağlayan sistemi de çalıştırmaktadır. Biyofilm bakterileri bunun için 3 yol kullanır. İlki, biyofilm kolonilerinin (besin elementlerinden en uzaktakiler) en altında ya da merkezindeki hücrelerin, durağan fazdaki gibi davranarak yaşam için gerekli besin elementlerinin oranını azaltmasıdır. İkincisi, biyofilmlerin yapılarında akış kanallarını (flow channels) sürdürerek ve hem biyofilm yüzey alanını, hem de besin alımını arttırmalarıdır. Biyofilm modellerindeki ölçümler göstermiştir ki, kanal yapısı, biyofilm boyunca besin elementi seviyesinde önemli artışları sağlamaktadır. Üçüncüsü ise, biyofilm bakterilerinin, küçük biyofilm yığınlarını kopararak çözünen besin elementlerini hızlıca kullanmasıdır (Pasmore ve Costerton, 2003).

Bakterilerin planktonik hücre halinden, biyofilm üyesi oldukları duruma geçişlerinde protein ifadelerinde de değişiklikler gözlenir. Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton ve Davies'in (2002) raporuna göre, *P. aeruginosa*'nın planktonik hali ve biyofilm formu karşılaştırıldığında, yapısında %70'lik bir farklılık görülmüştür. Bu farklılık, türler arasında büyük çeşitlilik gösterir. Örnek genuslar *P. aeruginosa*, *P.*



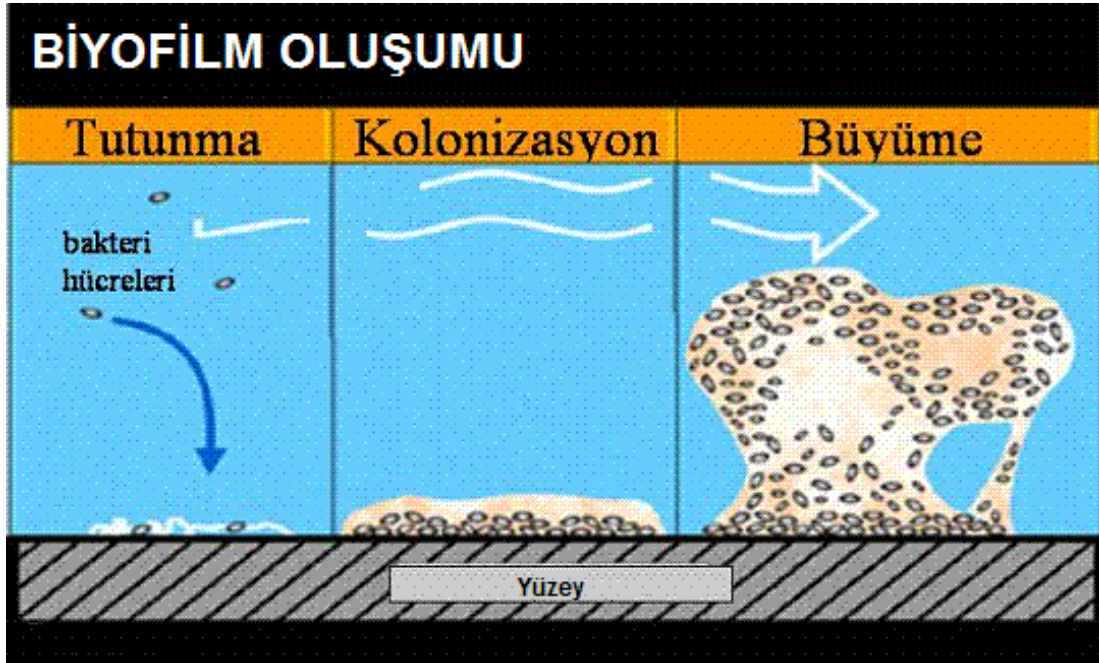
*putida* 'dır. Diğer araştırmalar da, RNA düzeyindeki değişimler ile, en az 73 ek genin, biyofilm yapısında bulunduğunu göstermiştir. Bu bilgi, biyofilmin spesifik kontrol stratejilerinin geliştirilmesini de olası kılmaktadır (Pasmore ve Costerton, 2003; Whiteley ve ark., 2001).

### **1.1.2 Biyofilm Oluşumu**

Biyofilm oluşumu, birbirini izleyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Şekil 1.3).

Temel olarak biyofilmin gelişim aşamaları sırasıyla şunlardır:

- Yüzey üzerinde, sıvı ortamdan gelen organik/inorganik moleküllerin başlangıç filmi oluşturmaları.
- Sıvı ortamdan yüzeye, planktonik hücrelerin taşınımı ve hücrelerin kısa bir süre içersinde yüzeye geri-dönüşümlü tutunması.
- Sıvının akış hızı ve kesici kuvvetlerin etkisiyle, yüzeye geçici tutunan hücrelerin yüzeyden ayrılması.
- Kalan hücrelerin yüzeye geri-dönüşümsüz tutunması.
- Hücre büyümesi, bölünmesi ve EPS matris üretimi ile yeni hücrelerin, bağlanması ve birikimi.
- Çeşitli kuvvetlerin etkisiyle, biyofilm materyalinin yüzeyden kopup ayrılması (Ceyhan, 2008; Singh, Paul ve Jain, 2006).



Şekil 1.3 Biyofilm yapısı <http://www.msu.edu> (Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont.)

#### 1.1.2.1 Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi ve Bakteriye Sinyaller

EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi, kromozomal veya plazmit DNA temelli olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça kompleks ve bir çok düzenleyici genin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Shankar ve ark., 1995).

Bakterilerin bir çoğu, bireysel canlılar olarak değil topluluklarda yaşam birlikleri oluşturarak bulunmaktadır. Bu topluluklarda, çeşitli kimyasal sinyaller üreterek ve bu sinyallere yanıt vererek iletişim kurmaktadır. Bakteriler arası, sinyal molekülleri yoluyla yapılan iletişime "Quorum Sensing" (QS) adı verilmektedir. Hücre yoğunluğuna bağlı bir toplu davranış sistemi olarak tanımlanabilir. Bu süreç ile bakteriler kendi çevresini izlemekte, populasyon yoğunluğu hakkında bilgi almakta ve bu bilgileri yeri gelince gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanmaktadır. Sonuçta, populasyonun fizyolojisi ve davranışlarında bir çok değişiklik yapılabilmektedir. Bu durum, geçtiğimiz 10-15 yıllık periyotta sansasyon yaratmıştır. Quorum sensing aslında global bir genetik düzenleme mekanizması olup, bilinen ilk örneği biyoluminesens (bakterilerde ışık oluşumu) olayıdır (Karaboz ve Sukatar, 2004).

Nealson ve Hastings (1979), derin deniz canlılarındaki biyolojik ışımaya neden olan sistemi çalışırken keşfetmişlerdir. Işıldak balığının (flashlight fish), organelleri üzerinde çalışırken, ışık üretiminin *Vibrio fischeri* bakterisinin, bu organellerde kolonize olması sonucu oluştuğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalar, bakterinin “otoindükleyici”(kendi kendini tetikleyen) adı verilen bir kimyasal ürettiğini ve bunun bakterinin genetik ifadesinde değişime neden olduğunu açığa çıkarmıştır. Ancak, yeterli miktarda otoindükleyici mevcut olduğunda *V. fischeri* lusiferaz (*lux*) genlerini açmakta ve ışık üretimi kontrol edilmektedir. Yani lüminöz bakteriler, miktarları belli bir düzeye ulaştığında, lüsiferaz enziminin oluşumunu teşvik eden otoindükleyici denilen özel bir madde üretmektedir (Nealson ve Hastings, 1979; Pasmore ve Costerton, 2003). Bakterilerdeki iletişim mekanizmaları, sinyalleşme moleküllerinin tür içi ve türler arasındaki farklılıklarına göre ikiye ayrılmaktadır.

Türe özgü (tür içi) iletişim sistemleri;

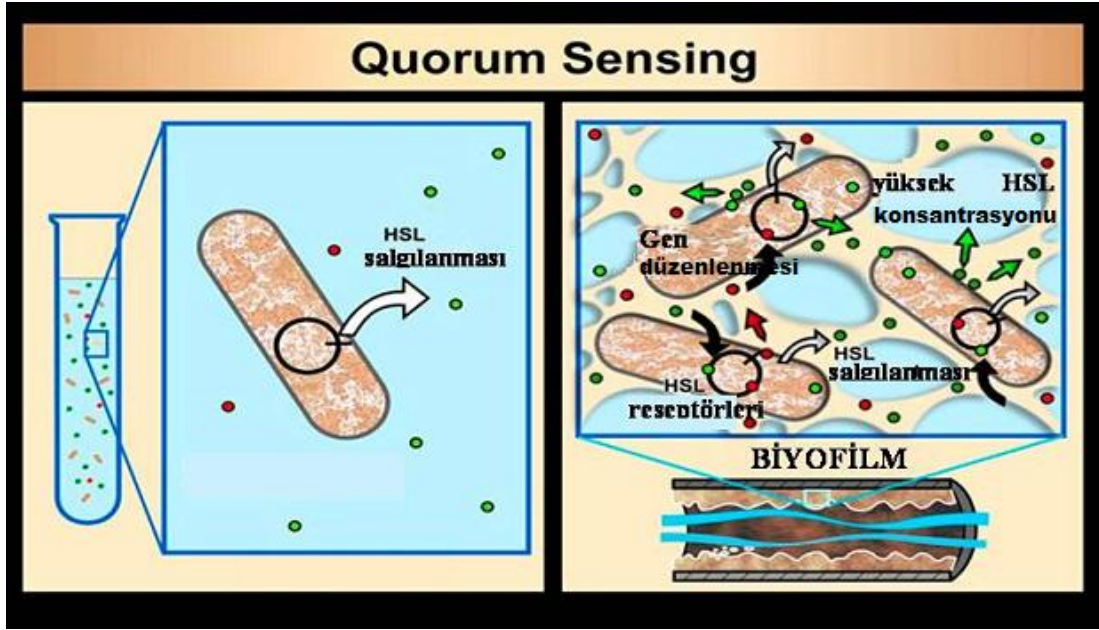
-Gram negatif bakterilerdeki: LuxI/LuxR tipindeki QS sistemi,

-Gram pozitif bakterilerdeki: Oligopeptit/İki bileşenli tipteki QS sistemi.

Türler arası iletişim sistemleri;

-LuxS/AI-2 tipi QS sistemi.

Gram negatiflerde, Lux-I benzeri proteinler, spesifik Açıl-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) gibi otoindükleyicilerinin üretiminden sorumlu enzimlerdir. Her bir gram negatif bakteri, tek tip AHL üretmektedir (Şekil 1.4). Hidroksil palmitik asit metil ester, furanozil borat, metil dodesenoik asit diğer başlıca enzimlerdir. Sonuç olarak, sadece aynı türlerin üyeleri bunu tanımakta ve cevap vermektedir (Karaboz ve Sukatar, 2004). Örneğin, 2-genli düzenleyici sistemde, *lux* genleri teşviklendiğinde ifade edilmektedir. *luxI* geni, çevreye yayılan sinyal molekülü, açıl-homoserin laktonu üretmektedir (Eberhard ve ark., 1981). Ancak sistemin çalışması için sinyal molekülü sentezinin belli bir seviyeye ulaşması gerekmektedir. Normal koşullar altında, *Vibrio* homoserin laktonların düşük seviyesini üretmektedir. Tetiklemede gerekli konsantrasyona ulaşmak için, yeterli hücresel yoğunluk elde edilmelidir. LuxR proteini, bir kere tetiklendiği, *lux* genlerinin ifadesinin aktivasyonunu sağlar ve *Vibrio*'da, lusiferaz genlerinin ifadesi ile de ışık üretimi gerçekleştirilir (Pasmore ve Costerton, 2003).



Şekil 1.4 Quorum sensing mekanizması <http://www.msu.edu> (Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont. )

Gram pozitif bakteriler, AHL aracılı quorum sensingi kullanmamaktadır. Bunun yerine, oligopeptid yapıdaki tetikleyicileri oluşturmakta ve çevrelerine iletmektedirler. Biyokimyasal ve genetik çalışmalar, AI-1'in tür içi iletişimde, AI-2'nin ise türler arası iletişimde arabuluculuk yaptığını göstermektedir.

AI-2 (otoindükleyici-2) olarak adlandırılan sinyal, türler arası etkileşimi kolaylaştırmaktadır ve evrensel bir sinyal olarak ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyona neden olma, biyofilm oluşumu ve hareketlilikle ilgili bir çok süreç AI-2 tarafından kontrol edilmektedir. AI-2 bu açıdan önemlidir, çünkü bakteriyal alemde yaygın kullanılan bir sinyaldir. Quorum sensing, sinyal moleküllerinin konsantrasyonlarını ölçerek, bakterilerde hücre popülasyon miktarını belirleyen bir süreçtir. Bakteri popülasyonu yoğunluğu arttıkça, bireysel hücreler otoindükleyicilerini üretmekte ve hücre dışı çevreye salgılamaktadır. Böylece, hücre yoğunluğu ile otoindükleyici konsantrasyonu arasında bir ilişki kurulmaktadır. Biyoteknolojik olarak, yeni antimikrobiyalleri geliştirmek amacıyla bakterilerdeki iletişimi zorlaştıracak stratejiler araştırılmaktadır. Hücreler arası evrensel sinyal moleküllerine ilave olarak tür spesifik sinyal moleküllerinin de keşfi, bakterilerin karmaşık iletişim mekanizmalarını kullanarak bir diğerini etkilediğini gözler önüne sermektedir.

Biyofilmdeki hücrelerin birbirine yakınlığı ile besin sentezi, gen değişimi ve QS için ideal ortamı oluşturmaktadır. Biyofilmin, plazmitler, konjugasyon (genetik bilginin, konjugasyon körüleri (seks pilusu) yoluyla bir bakteriden diğerine aktarımı), transformasyon (hücre dışından küçük bir DNA parçasının bakteri hücresi tarafından alınımı), transdüksiyon (genetik bilginin, bakteri virüsleri (bakteriyofaj) yoluyla birinden diğerine aktarımı), gibi ekstrakromozomal DNA değişimi için ideal yapı olduğu ortaya konulmuştur ve konjugasyonun biyofilm hücrelerinde, planktonik yapıdakinden daha fazla görüldüğü belirtilmiştir. Quorum sensing, gen düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve bir çok patojenin enfeksiyon geliştirmesinde de önemli bir unsur olarak ortaya çıkmaktadır. Mekanizmadaki doğal stratejilerin tanımlanması, bakteriyel hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından imkan sağlayacağı gibi biyofouling gibi ekonomik zararı olan süreçlerinde önüne geçilmesini sağlayacaktır (Ersoy, 2005; Pasmore ve Costerton, 2003;).

*1.1.2.1.1 Biyofilmdeki Bakteriyal Sinyaller.* Doğal biyofilmde, mevcut olan sinyalin alınmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önce *lux* sisteminde anlatıldığı gibi, bakteriye bağlı olarak üretilen, yayılabilen ve hücre dışına taşınabilen sinyal ya da otoindükleyici denilen küçük molekülleri üretirler (Kjelleberg ve Molin, 2002).

Bir çok ortamda, moleküller hücreden salındıktan sonra çevrede birikmez, azalarak yarı ömürlerini bitirirler. Ancak, bakteriyal konsantrasyon yüksek seviyeye ulaştığında, bu sinyal molekülleri de eşik değere ulaşır ve reseptör (alıcı) proteine etkili bir şekilde bağlanmaya başlar. İnducer yani teşvikleyici aktif forma dönüştüğünde, promotor (RNA polimerazın sigma alt biriminin tanıdığı özgül DNA dizisi), genlerin ifadesine izin verir. Bu olay, biyofilmde yüksek hücre yoğunluğu ve düşük yayılma oranı koşullarında gerçekleşir. *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm çalışmalarında, *las* ve *rhl* sistemleri çalışılmıştır. *las* sisteminin baskın olduğu, kısmi olarak *rhl* sisteminin düzenleyici olduğu görülmüştür. Bir çok araştırma göstermiştir ki, sinyal-eksik, hatalı mutantlar, ebeveyn ırklardan farklı biyofilm yapısına sahiptir (Davies ve ark., 1998). Çeşitli hipotezlerde, biyofilm yapısının başlaması için, sinyallere ihtiyaç olduğu ve sinyalleri düzenleyici genlerin teşviklenmesi gerektiği belirtilmektedir. Bakteriyal sinyaller ve diğer genler

arasındaki ilişki çok komplekstir. *las* sistemin elastaz (*las B*), toksin A (*tox A*) ve *rhl* genlerini (ve diğer bazı *las A*, *las R*, *las I*, *xcp P*, *wxp R* ve *apr*) kontrol ettiği bilinirken, *rhl* sistem ise ramnolipitlerin ifadesini (*rhl I*, *rhl A B*, *rpo S*) kontrol etmektedir. Bu genlerin çoğu, virulens faktördür ve enfeksiyonlarda sinyal rolü oynarlar. Genlerin büyük çoğunluğunu, bu sinyal genleri düzenlerken, sinyal genlerinin düzenlenmesinde ise Mn, Fe, karbon (glukoz ve diğer şekerler) ve oksijen konsantrasyonu etkendir (Pasmore ve Costerton, 2003).

### **1.1.3 Biyofilm Direnci**

Biyofilmlerin en önemli özelliği yapısındaki bakterilere, antibiyotikler, antimikrobialer ve dezenfektanlar gibi bir çok işleme karşı direnç kazandırmasıdır. Biyofilm yapısındaki bakterilerin, planktonik eş benzerlerine nazaran 1,000 kat daha fazla minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerinde canlı kaldığı belirlenmiştir. Biyofilm direnci, planktonik hücrelerden 3 temel farklılık gösterir; yayılma sınırlamaları, lokal çevre ve fenotip (Pashmore ve Costerton, 2003).

Biyofilm bakterileri, küçük partiküllerin hızlı yayılımına izin veren ve %99'u su olan matris materyaline gömülmüşlerdir. Bunun yanında, biyofilm jel benzeri doğası nedeniyle, büyük partiküllerin geçişini engeller ya da sınırlar. Matris, hücrelerin yüzeye ve diğer hücrelere bağlanması gibi hem yapısal özelliklerini hem de tutunma/yapışma gibi özelliklerini belirler. Hücre dışı polimerik maddelerin yapışkan yapısı, matrisde tutunma farklılıklarına neden olmakta; dahası yayılımı yavaşlatmaktadır. Yayılım oranları, reaktif kimyasalların varlığıyla sınırlandırılmaktadır. Buna en iyi örnek, organik moleküllerle hızla reaksiyona giren hipoklorit gibi oksidize edicilerdir. Bu reaksiyonlar, yayılım oranlarını büyük ölçüde azaltmaktadır ve diğer reaktif dezenfektanlar, planktonik hücrelerde olduğu şekilde biyofilmlerde etkili olamamaktadır (Grobe, Zahller ve Stewart, 2002).

Biyofilmler; pH ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunun, değişkenlik gösterdiği bölgesel alanlarda, yaşamsal anlamda değişiklikler gösterebilirler. Bu değişiklikler, bazı uygulamaların etkinliğini azaltabilir (Lee ve DeBeer, 1995). Örneğin, bazı ağız

içi biyofilmlerde pH 4,9'dan küçüktür (Hojo, Komatsu, Okuda, Takahashi ve Yamada, 1994). Bir çok antibiyotik sadece sınırlı pH aralığında etkilidir ve düşük pH'lardaki gelişen biyofilmlerin çoğuna antibiyotikler etkisiz kalabilir (Perea, 2001). İkinci örnek, dismutaz ve katalaz enzimlerinin kullanımıyla, reaktif oksijen gruplarının neden olduğu hasarın azaltılmasıdır. Biyofilm bakterileri, hidrojen peroksit reaksiyonu gösterme yeteneğindeki katalitik enzimleri üretmektedirler (Elkins, Hassett, Stewart, Schweizer ve McDermott, 1999). Süperoksيداتif yanma planktonik hücrede meydana gelirse, reaktif oksijen molekülleri hızlıca hücrenin yapısını bozabilir. Buna karşın, biyofilm bakterileri, katalaz üretmelerinin yanında, planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında, 14 kat fazla dirence sahiptirler. Bu olayda, oksijen grupları hem biyokütle hem de katalazın etkisiyle yıkıma uğratılmaktadır (Pashmore ve Costerton, 2003).

Sonuç olarak, fenotipik değişim gerçekleşir ve bakteriler, durgunluk fazında gösterdikleri davranışlara benzer davranışlar sergilerler. Dezenfektanlara da direnç gösterirler. Bunun yanında, biyofilm hücrelerinde protein ifadelerinde değişiklikler oluşur ve bakteriyal hayatta tamamen farklı moda geçerler (Pasmore ve Costerton, 2003).

#### **1.1.4 Biyofilmden Yararlanılan Alanlar**

Mikrobiyal EPS'ler; ilaç kaplama materyali olarak, biyoteknolojik aşılarda (*Streptococcus pneumoniae*), gıda katkılarında, kozmetiklerde veya temizlik ürünlerinde kimyasal katkı maddeleri olarak kullanılabilirler.

Çamur, endüstriyel atıklar, kirletilmiş yeraltı suları gibi çevresel atıkların atıksu arıtım işlemlerinin kontrolünde etkili olarak varlık gösterirler. Çevresel biyofilmlerin tutunduğu filtreler ile kirletilmiş suların, doğaya salınmış zararlı kimyasalların (Örn: poliklorlu hidrokarbonlar vb.) biyo-yenilenmesinde de kullanılabilirler (Ceyhan, 2008; DeBeer ve Stoodley, 1994).

### 1.1.5 Biyofilmin Neden Olduğu Zararlı Etkiler

EPS üreten mikroorganizmaların zararlarına bakıldığında, kronik enfeksiyonlardan, protezlerdeki hasara, endüstriyel ürünlerin bozulmasına, su arıtımı ve dağıtımındaki su ilişkili sorunlara, sucül ortamlardaki yapıların hasarına (biyofouling), artan enerji ihtiyacı nedeniyle milyonlarca liranın kaybına yol açan çok geniş bir alanı kapsamaktadır (Characklis, 1990; Costerton, Steward ve Greenberg, 1999). Biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlar ve etken mikroorganizmalar Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1 Biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlar (Costerton ve ark., 1999)

Enfeksiyon ya da Hastalık	Yaygın Biyofilm Türleri
Dişlerdeki plaklar	Asidik gram pozitif koklar (Ör; <i>Streptococcus</i> )
Periodontitis	Gram negatif anaerobik ağız bakterileri
Otitis media	Tipik olmayan <i>Haemophilus influenza</i>
Kas ve İskelet sistemi enfeksiyonları	Gram pozitif koklar (Ör; <i>Staphylokoklar</i> )
Nektorizan fasiit	Grup A <i>Streptokoklar</i>
Safra yolu iltihabı	Enterik bakteriler (Ör; <i>Escherichia coli</i> )
Osteomyelitis	Çeşitli bakteri ve mantar türleri
Bakteriyal prostat	<i>E. coli</i> ve diğer gram negatif bakteriler
Doğal kapakçık endokarditi	Bazı viridans <i>Streptokoklar</i>
Kistik fibrozis zatürresi	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomalleri</i>
ICU zatürresi	Gram negatif rodlar
Dikiş sırası oluşan enfeksiyonlar	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ve <i>S. aureus</i>
Kontakt lenslerde	<i>P. aeruginosa</i> ve gram pozitif koklar
Üriner katater enfeksiyonları	<i>E. coli</i> ve diğer gram negatif rodlar
Endotrakeal tüplerde	Çeşitli bakteriler ve mantarlar
Mekanik kalp valflerinde	<i>S. aureus</i> ve <i>S. epidermidis</i>
Ortopedik cihazlarda	<i>S. aureus</i> ve <i>S. epidermitis</i>



## 1.2 Biyofouling

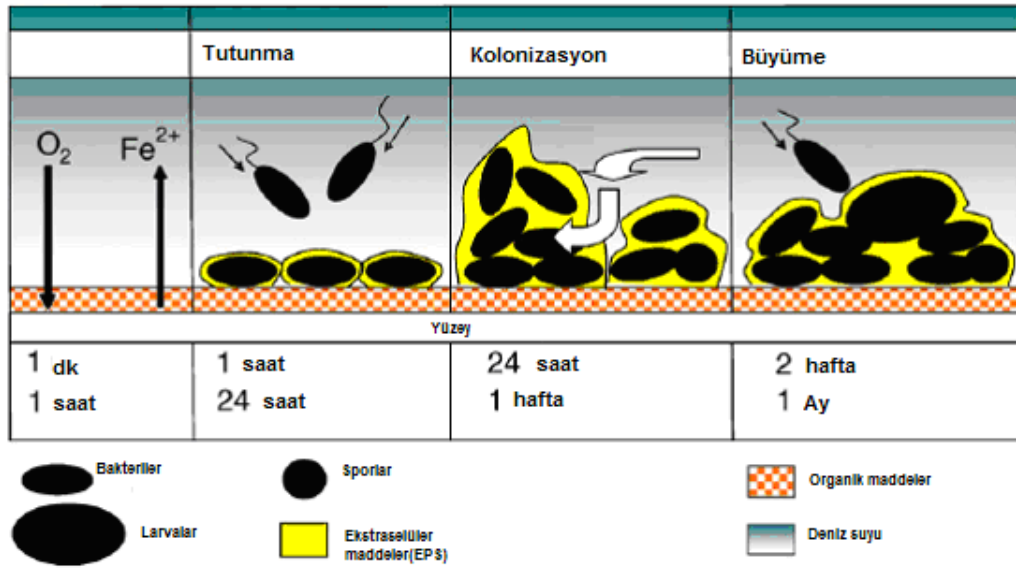
### 1.2.1 Biyofouling Süreci

Sucul ortamlardaki, su kolonunda ve zeminde bulunan yüzeyler üçe ayrılır. 1. grup canlı olmayan doğal yüzeylerdir; kayalar, taşlar vb. gibi sert zeminler. Fiziksel ve kimyasal açıdan daha aktif 2. grup; makroalgler, hayvanlar gibi yüzeyleri diğer canlılarca kaplananlar. 3. grup; metal, ahşap tekneleri ve gemileri, kabloları, ipleri içermektedir (Railkin, 2004).

Denizlerdeki canlıların, doğal yapıların ve insan yapımı araç ve gereçlerin (gemi karinaları, su boruları, atık su deşarj boruları, şamandıralar, elektrik kabloları, balıkçılıkta kullanılan ağlar, petrol boru hatları vb.) yüzeylerinde tutunarak gelişen organizmaların oluşturduğu topluluğa fouling organizmalar ve bu organizma gelişim sürecinde genel olarak fouling olayı denir (Geldiay ve Kocataş, 2002).

Sucul ortamlardaki yüzeylerde, kolonizasyon (çoğalıp yayılma), fouling ve biyofouling benzer anlamlarda kullanılabilir (Wahl, 1989). Biyofouling, biyolojik fouling süreci anlamındadır ve hem köken açısından hem de farklı tortuların birikimi yönünden yüzeyler üzerinde değişkenlik gösteren korozyon, kristalizasyon, kimyasal reaksiyonlar gibi diğer fouling formlarından ayrılmaktadır. Sonuç olarak, biyolojik fouling; sucul ortamda canlı organizmalarca yüzeylerin kaplanmasını kapsayan özel bir durumdur (Railkin, 2004).

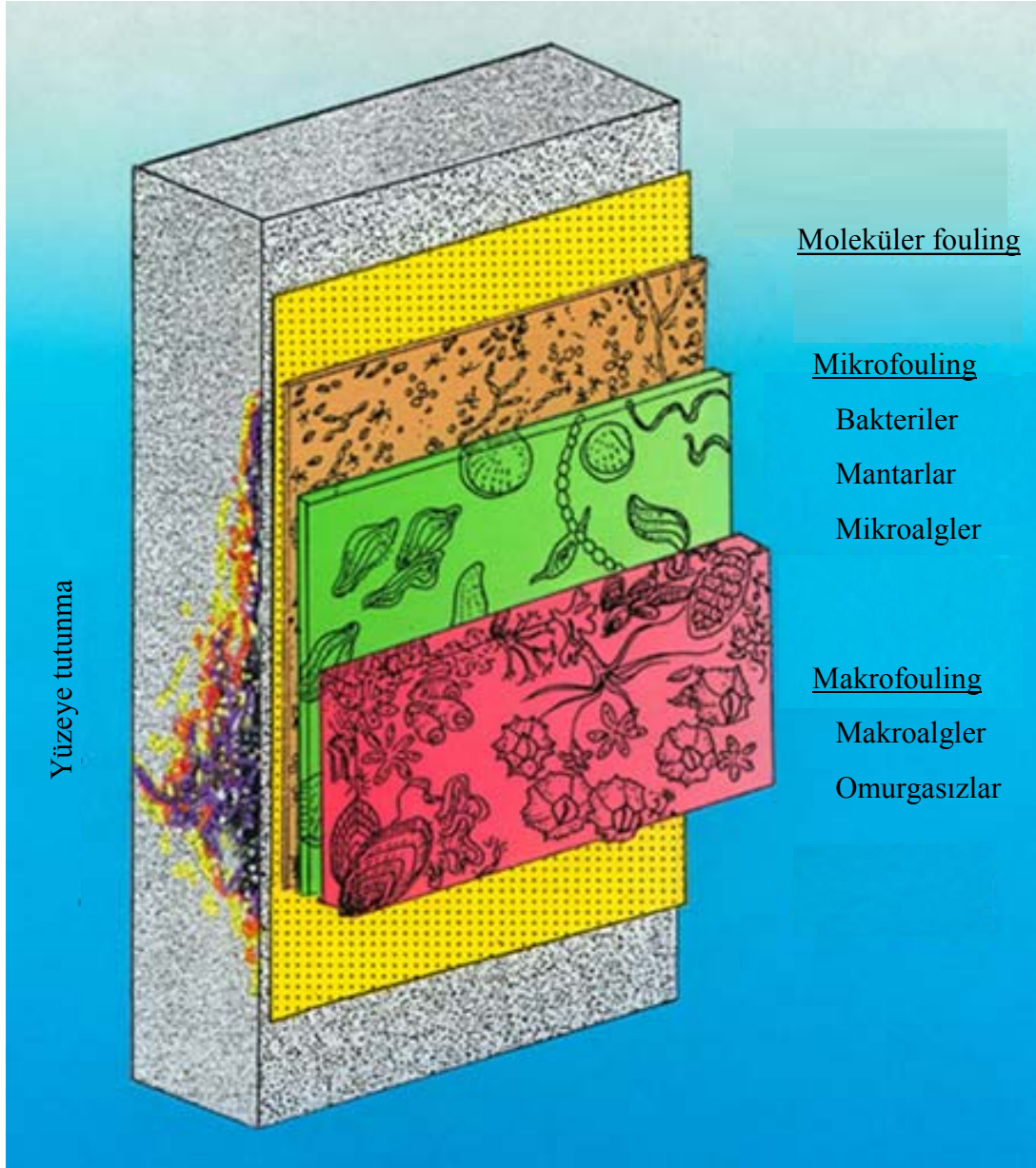
Biyofouling sürecinin önemli bir sebebi, artan organik karbon miktarıdır. Özümlebilir organik karbon, mikrobiyal üremeyi teşvik eden en önemli bir maddedir. Biyolojik fouling sürecinde, öncelikle organik maddenin yüzeyde birikimi görülmektedir, ardından öncü bakteriler bu yüzeye tutunur ve biyofilm matrisini oluşturur, sonraki süreç ise mikro ve makro fouling organizmaların tutunmasıdır (Şekil 1.5 ve 1.6). Olgun fouling alanında, ölümler ve türlerin göçüde bulunmaktadır (Chambers ve ark., 2006).



Şekil 1.5 Biyofoulingin gelişim aşamaları (Chambers ve ark., 2006).

Bakteriyal tutunma bir çok faktörden etkilenmektedir. Örneğin, yüzeyin elektriksel yükü, suya karşı davranışı ve topografisi (yer betimlemesi) gibi. Yüzeyin özellikleri, film tabakasının oluşumunda değişikliklere neden olabilmektedir. Deniz suyundaki; negatif ve pozitif yüklü iyonların, proteinlerin yanı sıra, humik asitler, şekerler ve yağlarda önem taşımaktadır. Ayrıca, hücre yüzey özellikleri de, (uzun zincirli polimerler, hücre uzantıları, yüzey-aktif maddeler vb.) tutunmanın gücü hakkında rol oynayan anahtar koşullardır (Yebra, Kill, Weinebell ve Dam-Johansen, 2006b). Yapılan çalışmalarda, 4000'den fazla türün foulinge sebep olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen türler ise hali hazırda bilinmeyen türlerin yanında çok az bir miktarını oluşturmaktadır. Geleneksel olarak, fouling olayı 4 basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamağında, polisakkaritler, proteinler ve proteoglikanlar ve inorganik bileşikler yüzey üzerinde birikirler (ilk dakikalarda). Bu süreç, brownian hareketi, elektrostatik ilişkiler, van der waals güçlerince oluşur; ikinci aşama için yüzeyin yaklaşık 24 saat su altında kalma koşulu gerekmektedir ki, bakteriler ve tek hücreli algler yüzeye tutunabilsinler.

# Biyofouling



Şekil 1.6 Biyofouling süreci (<http://www.msu.edu>)

Bu yapı, mikroorganizmaları toksinlerden (10-1000 kat yüksek konsantrasyonda) ve çevresel değişikliklerden koruduğu gibi, gerekli besin elementlerinin tutulmasını da kolaylaştırmaktadır ve oluşan film yapısı içinde enerji, karbon ve enerji kaynaklarından yapıdaki diğer mikroorganizmalarda faydalanabilmektedir (Tablo1.2) (Callow ve Fletcher, 1994).

Tablo 1.2 Deniz suyundaki yüzeylere tutunan organizmaların tutunma aşamaları (Callow ve Fletcher, 1994)

Süreçler	Tutunan Organizmalar	Biyofilm Yapısının Durumu	Yaklaşık Başlangıç Zamanı
1. Aşama; Elektrostatik etkileşimler, brownian hareketleri ve van der Waals güçleri gibi gerekli fiziksel güçler	Proteinler, polisakkaritler, glikoproteinler ve diğer organik moleküller, yüzeylere tutunmaya başlar	Düzenleyici	İlk dakikalarda
2. Aşama; Geri dönüşümlü olabilen tutunma, fiziksel güçler ve türler arasındaki etkileşimler	Bakteriler; <i>Pseudomonas putrefaciens</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , diatomlar; <i>Achnantes brevipes</i> , <i>Amphora coffeaeformis</i> , <i>Nitzschia pusilla</i>	Mikrobiyal biyofilm	1-24 saat
3. Aşama, Yerleşen mikroorganizmalar predatörlerden, toksik maddelerden ve çevresel değişimlerden korunur ve yeni mikroorganizmalara yetecek besini sağlar	Mikroalg sporları; <i>Ulothrix zonata</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> ve protozoonlar; <i>Vaginicola sp.</i> , <i>Zoolhanium sp.</i> , <i>Vorticella sp.</i>	Biyofilm	1 hafta
4. Aşama; Partiküllerde ve makroorganizma larvalarında artış ve dönüşümsüz film oluşumu ve düzensiz mikrobiyal kolonilerle pürüzlülük oluşumu	Makroorganizma larvaları; <i>Balanus amphitrite</i> (Crustacea), <i>Laomedea flexuosa</i> (Coelenterata), <i>Electra crustulenta</i> (Bryozoa), <i>Spirorbis borealis</i> (Polychaeta), <i>Mytilus edulis</i> (Mollusca) ve <i>Styela coriacea</i> (Tunicata)	Deniz omurgasızlarının ve makroalglerin tutunması ve gelişimi	2-3 hafta

Yapıda, şekerler, proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi yapışkan maddelerin varlığı ve düzensiz mikrobiyal kolonilerin bulunuşu, daha fazla organizma ve partikülün yakalanmasına yardımcı olmaktadır. Bunlar, alg sporlarını, cirripedia larvalarını, deniz mantarlarını ve protozoonları cezbetmekte; sensör (algılayıcı) görevi görmektedir. Mikrobiyal film tabakası, foulingin üçüncü aşamasında çok hücreli birincil üreticileri, tüketicileri, ayrıştırıcıları içeren çok daha kompleks bir topluluğa dönüşmektedir. Son basamakta ise makroalglerle birlikte, büyük denizel omurgasızların yerleşimi ve hızlı büyümeleri gözlenmektedir (Almeida, Diamantino ve DeSousa, 2007). Makrofauling organizmaların tipik özellikleri ise, hızlı değişim ve büyüme oranı, sınırlı besin maddesi tercihi ve farklı çevrelere kolay uyum

sağlayabilmedir. Organizmalar arası etkileşim ile, üstteki genç organizmaların besin ihtiyacı karşılanabilmekte, çevredeki olumsuz koşullardan ve toksik maddelerden korunma sağlanabilmekte ve tutunma sürecinin devamı için yüzey serbest enerjisinde değişiklikler görülebilmektedir (Yebra, Kill ve Dam-Johansen, 2004).

Bölgesel olarak çeşitlilik gösteren biyofouling olayı, bir çok çevresel değişkenle de yakından ilişkilidir. Coğrafik bölge, su koşulları (tuzluluk, sıcaklık, pH, çözülmüş besin elementleri ve oksijen konsantrasyonu) ve geminin izlediği rota en önemli çevresel değişkenlerdir. Sonuç olarak bu değişkenler, fouling organizmalarının büyümelerinin kontrolü için değişikliğe uğratılamaz. Şüphesiz sıcaklık en önemli değişkenlerden biridir. Yaygın olarak bilinen görüş, su sıcaklığının nispeten yüksek olduğu bölgelerde, foulingin daha yoğun olduğudur. Bu, daha ziyade deniz hayvanlarının çoğalması ve büyümesi ile ilişkilidir. Mevsimsel değişiklik gösteren bölgelerde, özellikle düşük sıcaklığın görüldüğü dönemde, bir çok türün büyümesi baskılanırken, ılık dönemde üreme yeniden başlar. Diğer yandan, küçük sıcaklık değişimlerinin olduğu tropik iklimli bölgeler, hem tür açısından daha zengindir, hem de fouling olayı yıl boyunca kesintiye uğramaksızın devam eder. Bunun yanında, bazı türler değişken çevresel koşullara kolay uyum sağlayabilmekte ve gezegenin bir çok bölgesinde bulunabilmektedir (Almeida ve ark., 2007; Yebra ve ark., 2004).

Diğer yandan, fouling formlarının çoğu, büyümelerinde sorunlara neden olan düşük tuzluluk değerlerine direnç gösteremezler. Güneşten gelen radyasyon miktarı da, denizlerin yüzey kısmında ve dolayısıyla gemilerin yüzeyindeki fouling olayında rol oynamaktadır. Sıcaklık ve tuzluluğun etkisinden farklı olarak bu durum, bitkilerin fotosentezini ve dolayısıyla hayvanların besinlerinin kontrolünü direkt etkilemektedir.

Kirletilmiş sular, hem direk toksik etki gösterebilmeleri, hem de fotosentez için güneş ışığının geçişini azaltmaları ve oksijenin tüketilmesine neden olmaları sebebiyle zararlıdır. Diğer yandan, bazı kirlilik kaynakları besin açısından ortamı zenginleştirebilir ve bu da foulingi arttırabilir.

Fouling sorunu, derin sulardan ziyade kıyısız alanlarda daha büyük problemidir. Okyanuslarla karşılaştırıldığında, foulinge sebep olan organizmalar, kıyılarda daha bol bulunmaktadır. Biyofilmdeki konukçu ilişkili bakteriler, konukçu dokularında yıkıma neden olacak maddelerin üretimine ve onların ölümüne sebep olabilir. Bakteriler ve diğer yüksek türler, besinler için yarış halindedir, ışık geçişini önleyebilirler ya da diğer türlerin yerleşimini engellemek için sekonder metabolitleri (ikinci dereceli metabolizma ürünleri) salgılayabilirler (Yebra ve ark., 2004).

### ***1.2.2 Biyofoulinge Neden Olan Organizmalar***

Bir bölgedeki fouling organizmalarının gelişiminin, bu bölgenin sıcaklığı ve su hareketlerinin etkisinde olduğu belirtilmiştir. En iyi gelişimin 20-40°C'ler arasında olduğu, yüksek ve düşük sıcaklıklarda olayın yavaşladığı ve 10°C'nin altında ve 60-70°C'nin üstünde durduğu gözlenmiştir. Fouling olayı, daha çok algler ve tutunucu hayvanlarca oluşturulur. Bunlar, kendilerini su hareketlerinden ileri gelebilecek etkilere karşı korurlar. Bunun sonucunda kütleler halinde birikirler. Bu organizma kütleleri arasına sonradan bazı serbest formlar yerleşir (Şekil 1.7 ve 1.8) (Geldiay ve Kocataş, 2002).

1960'larda, Ekonomik İşbirliği ve Gelişimi Organizasyonu (OECD), foulinge sebep olan belli başlı organizmaların Fransız'lar tarafından oluşturulmuş listesini vermiştir. Günümüze kadar bu listeye sürekli eklemeler yapılmaktadır.(Almeida ve ark., 2007).

1-Bacteria ve Diatomae; denizlerdeki yapay yüzeylere ilk olarak yerleşirler ve ilk fouling filmini oluştururlar (Geldiay ve Kocataş, 2002).

Fouling bakteriler; *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Caulobacter* ve diğerleri.

Diyatomlar; *Nitschia*, *Naviculaca*, *Cocconeis*, *Licmophora*, *Syredra*, *Amphora*, *Achnantes*, *Bacillaria*, *Biddulphia*, *Melosira*, *Fragilaria*, *Grammatophora*, *Rhabdonema*, *Berkeleya* ve diğeri.

Heterotrofik flajellatlar; *Bodo*, *Spumella*(=*Monas*), *Pteridomonas*, *Metromonas*, *Morosiga*, *Codonosiga*.

Polimer plakalarda mikro fouling gelişimi ile ilgili yapılan bir çalışmada, hücre sayısı  $\text{cm}^2$ 'de  $10^7$  olarak bulunmuştur. Bakteri/Diyatom/Heterotrofik flajellatların oranı ise, 640:4:1 olarak tespit edilmiştir. Yapıdaki diğer tek hücreli organizmalar ise (mayalar, sarkodinler, siliatlar vb.) toplam hücrelerin % 0.15'ini kapsayacak şekilde bulunmuştur (Railkin, 2004).

2-Chlorophyta (Yeşil algler); gelişmelerinde mutlaka ışığa gereksinme gösterdiklerinden genellikle yüzeyin üst tarafında yer alırlar. Ör: *Ulva spp.*, *Enteromorpha spp.*, *Cladophora spp.*

3-Porifera (Süngerler); bazı sünger türlerinde fouling olayına katıldıkları izlenmiştir. Ör: *Halicondria spp.*

4-Cnidaria (Knidliler); Hydrozoa ve Anthozoa'ya dahil türler, fouling olayına katılmaktadır. Hydrozoa üyeleri birinci derecede rol oynar. Örnek olarak, *Tubularia spp.*, *Obelia spp.* vb gösterilebilir. Anthozoa pek önemli olmamakla beraber bazı türlerin foulingde yer aldıkları saptanmıştır. Ör: *Sagara spp.*

5-Polychaeta (Halkalı deniz solucanları); Sedentaria takımının bazı türleri, büyük kütleler oluştururlar. Bunlara örnek olarak *Hydroides spp.*, *Spirorbis* gösterilebilir. Errantia takım türleri ise yapıya sonradan yerleşirler. Ör: *Nereis spp.*

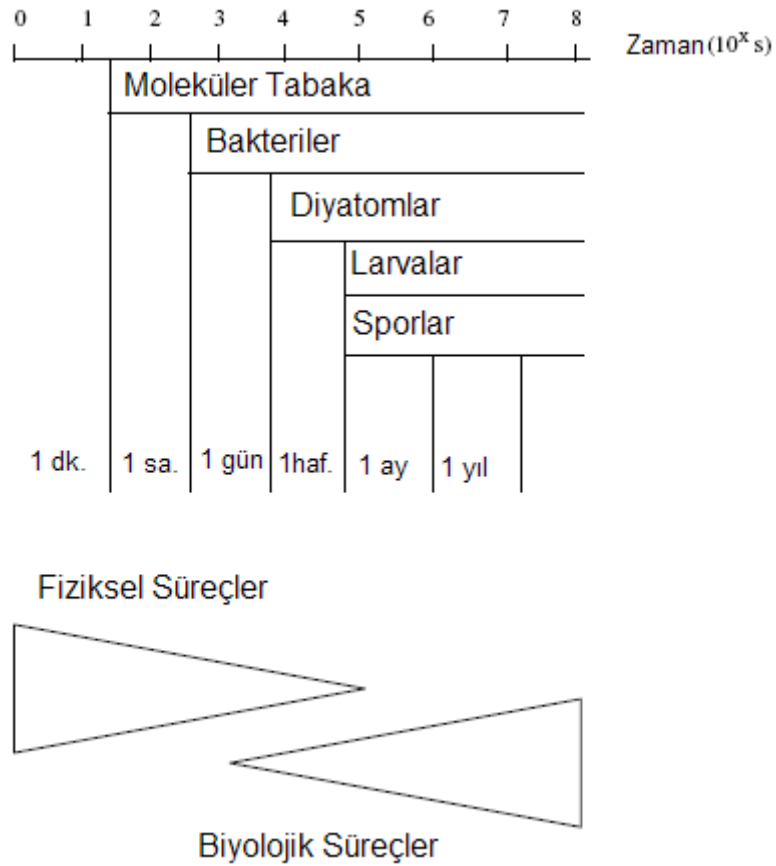
6-Mollusca (Yumuşakçalar); bu şubeden foulinge sebep olan en önemli tür Pelecypoda üyesi olan *Mytilus galloprovincialis*'dir. Bunlar 10-12 mil süratle giden gemilerin karinalarında dahi kolaylıkla gelişebilirler.

7-Crustacea (Eklembacaklılar); bu sınıfın özellikle Cirripedia grubu foulingde önemli rol oynar. Bunlara örnek olarak *Balanus spp.* gösterilebilir. Diğer temsilcileri (Amphipoda, Isopoda, Tanaidacea) ikincil fouling organizma grubuna girerler.

8-Bryozoa (Yosun hayvancıkları); bu şube türleride foulingde baş rolü oynarlar. Bunlara örnek olarak *Bugula spp.*, *Membranipora spp.*, *Cryposula spp.* *Electra spp.* gösterilebilir.

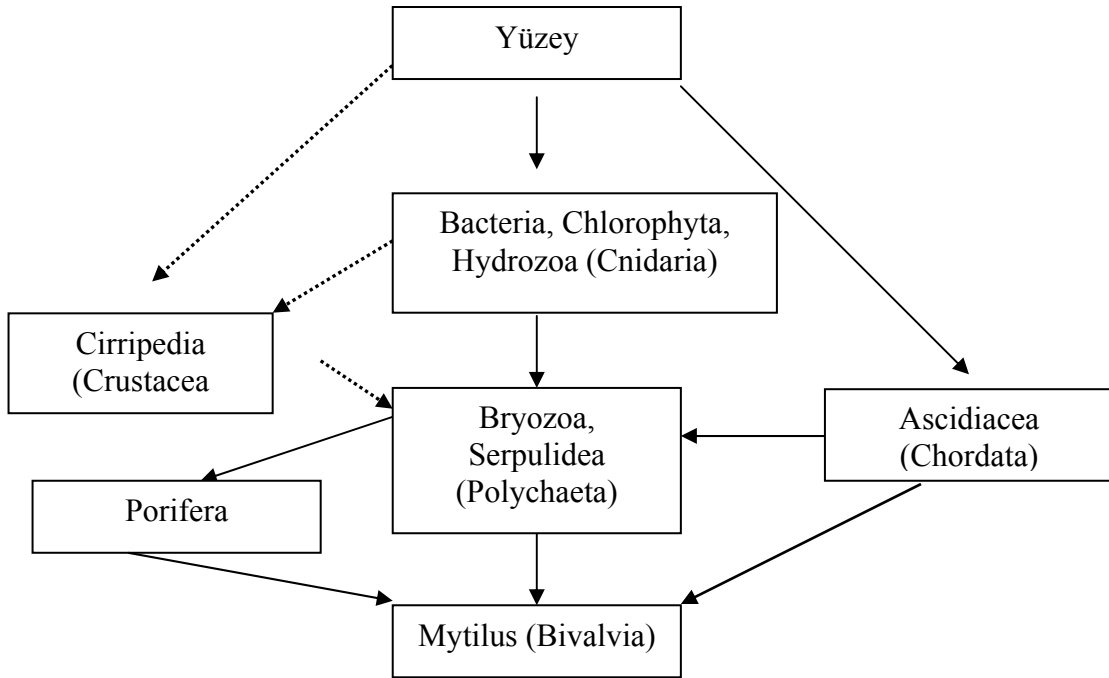
9-Tunicata (Tulumlular); bu gruba dahil sınıflardan özellikle Ascidiaceae ailesi türleri fouling olayında önemli role sahiptirler. Bunlara örnek olarak özellikle *Ciona intestinalis* gösterilebilir (Şekil 1.9).

Boring Organizmalar (delici formlar); su içindeki ağaç yapıları delen organizmalardır. Ör: *Limnoria*, *Chelura* (Almeida ve ark., 2007; Geldiay ve Kocataş, 2002; Yebra ve ark., 2004).



Şekil1.7 Biyofouling sürecinde, yüzey kolonizasyonunun kronolojisi (Railkin, 2004).





Şekil 1.8 . Biyofoulingi oluşturan süksesyonun klasik şeması (Railkin, 2004).

Biyofouling düzeni, yüzeye bağlı olarak oluşan makrofauling organizmalar nedeniyle tam tahmin edilememektedir. Makrofaulinglerin yerleşmesi için biyofilm yapısı öncü olmaktadır. Biyofouling süksesyonu üzerinde yapılan çalışmalarda, başlangıç film tabakası çıkarıldığında, ileri foulingin artık sınırlı olduğu görülmüştür. Biyofilmin bulunuşu, bazı algal sporların yerleşimine katkı sağlarken, buna karşın yaşlı biyofilm, Cirriped'lerin yerleşimini engellemektedir.

Fouling organizmalarca gerçekleştirilen tutunma süreçleri çeşitlidir. Örneğin, diyatomlar, kapsüllü, saplı bakterilerce üretilen polisakkarit müsilaja tutunurlar. *Vibrio* ve *Shewanella*'nın *Enteromorpha* zoosporlarının yerleşimini teşviklediği görülürken, karşık kültürde oluşan EPS'nin bazı barnakılların yerleşiminde etkin olduğu buna neden olanında Yine *Ciona intestinalis* larvalarının yerleşiminde bakteriyal EPS yapısından etkilendiği bildirilmiştir (Joint ve ark., 2002; Patel, Callow, Joint ve Callow, 2003;).  $\gamma$ -Proteobacteria, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides grubu ve bazı gram pozitif bakteri cinslerinin poliket *Hydroides elegans*

larvalarının yerleşiminde ve değişiminde etkin oldukları belirlenmiştir. *Alteromonas espejiana*, *Hydractinia echinata*'nın, *Vibrio alginolyticus*'un ise *Cassiopea andromeda* larvalarının değişiminde etkin olduğu görülmüştür (Chambers ve ark., 2006; Patel ve ark., 2003; Webster ve ark., 2004).

Türlerin yüzeye tutunması aşaması engellenebilirse, fouling olayı da kontrol altına alınabilir. Yüzeye tutunma ve sonrasında çoğalma, deniz canlıları için yaşam döngülerinde anahtar basamaklardır. Organizma, sıvı ortam ve yüzey arasındaki etkileşimler, modeller oluşturularak deneysel anlamda incelenmektedir. Ancak çok fazla kompleks modele ihtiyaç duyulmaktadır. Yüzeydeki elektrostatik etkileşimler, pürüzlü yüzeyler gibi kısmi alanlardaki kolonizasyon, yüksek besin ve oksijen konsantrasyonları için akış sistemleri gibi faktörler modelde etkin değişkenler olarak kullanılabilirdir (Chambers ve ark., 2006).

Gruplar	Algler	Omurgasızlar								
Alt Gruplar	Yeşil, kahverengi ve kırmızı algler	Sert kabuklu organizmalar				Ot benzeri organizmalar	Küçük çalı benzeri org.	Dikensiz organizmalar		
	<i>Enteromorpha, Ulva, Ectocarpus, Fucus, Ceraminum</i>	<i>Cirripedia</i>	<i>Scalpellidae</i>	<i>Mollusca</i>	<i>Bryozoa</i>	<i>Hydrozoa</i> ya da <i>Bryozoa</i>	<i>Hydrozoa</i> ya da <i>Bryozoa</i>	<i>Asciaceae</i>	<i>Porifera ve Cnidaria</i>	
Tipik Görünüş										
	<i>Chlorophyta</i>	<i>Cirripedia</i>	<i>Polychaeta</i>	<i>Mollusca</i>	<i>Bryozoa</i>	<i>Bryozoa</i>	<i>Asciaceae</i>			
Tipik Görünüş										

Şekil 1.9 Denizdeki ana makroorganizma türlerinin karakteristikleri (Almeida ve ark., 2007).

### 1.2.3 Foulingin Etkileri

Fouling olayı çeşitli sucul ortamlarda gözlenmektedir. Denizdeki sualtı yapılar, çeşitli kategorilerdedir ancak bunların %24'ünü gemi karinaları oluşturmaktadır (Railkin, 2004). Gemi gövdelerinin yapımında çelik, alüminyum, polimerle güçlendirilmiş cam gibi karma maddeler kullanılmaktadır. Gemiler çok farklı rotaları izlemektedir ve tür verimi yüksek yerlerde, ışıklı tabakada uzun süreli kalabilmektedir. Gövdeyi korumak için çeşitli kaplamalar kullanılmaktadır. Ancak, bu kaplamalar gövdeyi, fouling organizmalarca üretilen kalsiyum karbonat kalıntılardan, hücre dışı salgılardan ve inorganik tuzlardan korumada yetersiz kalmaktadır.

-Gemi gövdelerinde yerleşen türler, farklı bölgelerde çeşitli yoğunluklarda olabilmektedir. Örneğin, pervane foulingi manevra kabiliyetini etkilemektedir. Yine geminin ses izi (sound signature) etkilenebilir ve bu da pasif ve aktif sonar sisteminde sorunlara yol açabilir (Chambers ve ark., 2006).

-Pürüzlülüğünden kaynaklanan yüksek sürtünme direnci, hızda ve manevra kabiliyetinde azalmaya neden olmaktadır. Biyofilmin çok küçük bir miktarı bile, gemilerin sürtünme direnci (1 mm kalınlıktaki film için %80'e kadar artırılabilir) üzerinde etki gösterebilir (Yebra ve ark., 2006b). Bunu dengelemek için, zararlı bileşiklerin salınımında artışa neden olan fazla yakıt tüketimine gerek duyulmaktadır. Yakıt tüketimindeki % 40'luk artış seyahat masraflarını % 77'ye kadar arttırmaktadır (Schultz ve Swain, 2000).

-Havuz işlemlerinin sıklığında artışa neden olmaktadır. Hem zaman kaybına, hem de toksik atıkların üretilmesine yol açar.

-Korozyon nedeniyle kaplamadaki bozulma, materyalin elektrik iletkenliğindeki değişimi ve renkteki solmayı kolaylaştırmaktadır.

-Doğal olmayan türlerin bulunmasına neden olmaktadır (yayılmacı, istilacı ya da yerli olmayan türler gibi) (Yebra ve ark., 2004).

### 1.3 Biyofilm Yapısında Tanıladığımız Bakteriyal İzolatların Genel Özellikleri

#### 1.3.1 Cins; *Alteromonas* ve *Pseudoalteromonas*

$\gamma$ -Proteobacteria grubunun deniz çevrelerinde yaşayan üyeleridir. Kıyısularda, açık denizlerde, derin denizlerde ve sıcak su çıkışı olan bölgelerde, deniz sedimentlerinde, cansız yapıların üzerinde, deniz canlılarının yüzeyinde ve hayvanlarının sindirim sistemlerinde bulunabilirler. Heterotrofik, gram negatif, aerobik ya da fakültatif anaerobik, spor üretmeyen, bakteriler olup, genelde tek flajele sahiptirler. Cins *Alteromonas* ilk olarak 1972'de Baumann tarafından tanımlanmıştır. Kalan türler, *Pseudoalteromonas* cinsi altında yeniden sınıflandırılmıştır. Diğer yakın cinsler, *Glaciecola*, *Idiomarina* ve *Colwellia*'dır. 1995 yılından bu yana 22 *Pseudoalteromonas* türü tanımlanmıştır (P. Baumann ve L. Baumann, 1981; Mikhailov, Romanenko ve Ivanova, 2006).

*Alteromonas* ırkları 20-35C°'de, bazıları ise 37-40C°'de büyümede gösterebilirler. Bakteriler büyüme için deniz suyuna ihtiyaç duyarlar. *Pseudoalteromonas* türleri ise optimum olarak 20-25C°'de büyüme gösterirken, bir çoğu da 4C°'den 30C°'ye kadar da yaşama yeteneğindedir. Ancak 40C°'nin üzerinde büyüme göstermezler. Tüm türler, büyüme için deniz suyu ya da sodyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Gerekli olan NaCl miktarı %3-6'dır. Ancak bazı türler, %15 oranında NaCl'e bile direnç gösterebilirler. Na<sup>+</sup> iyonları, hücre duvarının bütünlüğünün sağlanmasında ve geçirgenlik sisteminde rol oynamaktadır (Egan, James, Holmström ve Kjelleberg, 2002). D-glukoz, D-fruktoz, alkoller, karboksilik asitler, amino asitler ve aromatik bileşikler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Mikhailov ve ark., 2006).

*Alteromonas* daha sarımsı beyazımsı koloniye sahipken, *Pseudoalteromonas* ise pigmentless ya da pigmentli kolonilere sahiptir. *P. citrea*, *P. luteviolacea* ve *P. nigrifaciens* türleri kompleks katı ortamda, kahverengi, siyah pigment üretirler. Pigmentli türler, gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki

gösteren, yüksek moleküler ağırlıkta toksik bileşikler sentezlerler (Holmström ve Kjelleberg, 1999). *P. luteoviolacea*; violacein, *P. denitrificans*, *P. rubra*, *P. bacteriolytica* ise prodigiosin üretmektedir. *P. rubra*; kompleks membran bağlı glikoprotein, *P. citrea* ise iki polyanyonik antibiyotik bileşiği üretmektedir. *Pseudoalteromonas*'ın antibiyotik üreten pigmentli türleri daha çok Akdeniz kıyılarından elde edilmektedir (Bowman, 2007; Mikhailov ve ark., 2006).

Pigmentasyon, doğal bileşikler üretme yetenekleri ile ilişkilidir. Pigmentsiz türler, filogenetik olarak daha az çeşitlilik gösterirken, pigmentli türler çok daha geniş bir nükleotid dizisi çeşitliliğine sahiptir. 2000'den fazla *Pseudoalteromonas* 16S rRNA gen dizisi, nükleotid veri bankasında (www.ncbi.nlm.nih.gov) bulunmaktadır, bu da grubun halen tanımlanmamış bir çok özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (Bowman, 2007).

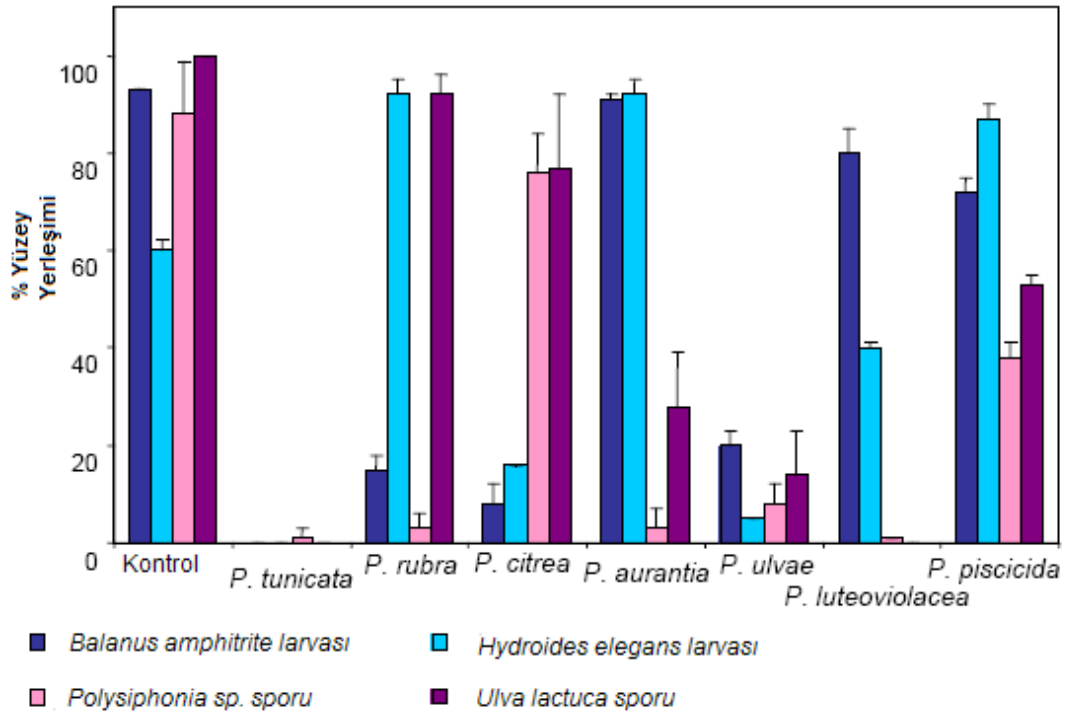
#### 1.3.1.1 Ekolojik Önemleri ve Biyoteknolojik Potansiyelleri

Bu organizmalar, proteinaz, amilaz, jelatinaz, glikozidaz, kitinaz, agaraz, fosfolipaz, lipofosfolipaz, fosfataz, beta-1,3-glukonaz, RNAz, alfa-galaktozidaz, nükleaz ve tirozinaz gibi çeşitli enzimleri üretmektedir. Soğuğa uyum sağlayan enzimler, deterjan ve gıda endüstrisi gibi ticari alanlarda kullanılabilirler. Ayrıca bu bakteriler, oksidoredüktazları da üretmektedir. Tirozinaz'ın iki önemli etkisi vardır. İlki, Tirozinin, L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin) yoluyla Melanine dönüşümünü sağlayan kresolaz ve katekolaz etkisi. L-DOPA Parkinson ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Tirozinaz, *Crassostrea virginica*'nın ıstiridye larvası ve diğer omurgasızların yüzeye tutunmasında ve değişiminde rol oynamaktadır (biyofouling etkisi) (Mikhailov ve ark., 2006).

Denizde oluşan biyofilmler, çeşitli deniz omurgasızlarının ve alglerin yerleşimini etkilemekte ve hücrel değişimi arttırabilmektedir (Bowman, 2007). Holmström, Egan, Franks, McCloy ve Kjelleberg (2002), farklı *Pseudoalteromonas* türlerinin faulinge yol açan omurgasız larvalarının ve algal sporların yerleşiminde etkili olduklarını belirlemişlerdir (Şekil 1.10). Örneğin, *P. espejiana*'nın Hydrozoan olan

*Hydractinia echinata*'nın yerleşimini ve değişimini teşviklediği gözlenmiştir (Seipp, Witting, Stiening, Bottger ve Leitz, 2006).

Buna karşın, bilinen bir çok *Pseudoalteromonas* türü, diğer tanılanmış ya da tanılanmamış bakteriyal türler gibi doğal antifouling bileşiklerin üretiminden dolayı, çeşitli deniz fauna ve florasının üretkenliğinde de etkili olabilmektedir (Dobretsov, Dahms ve Qian, 2006).

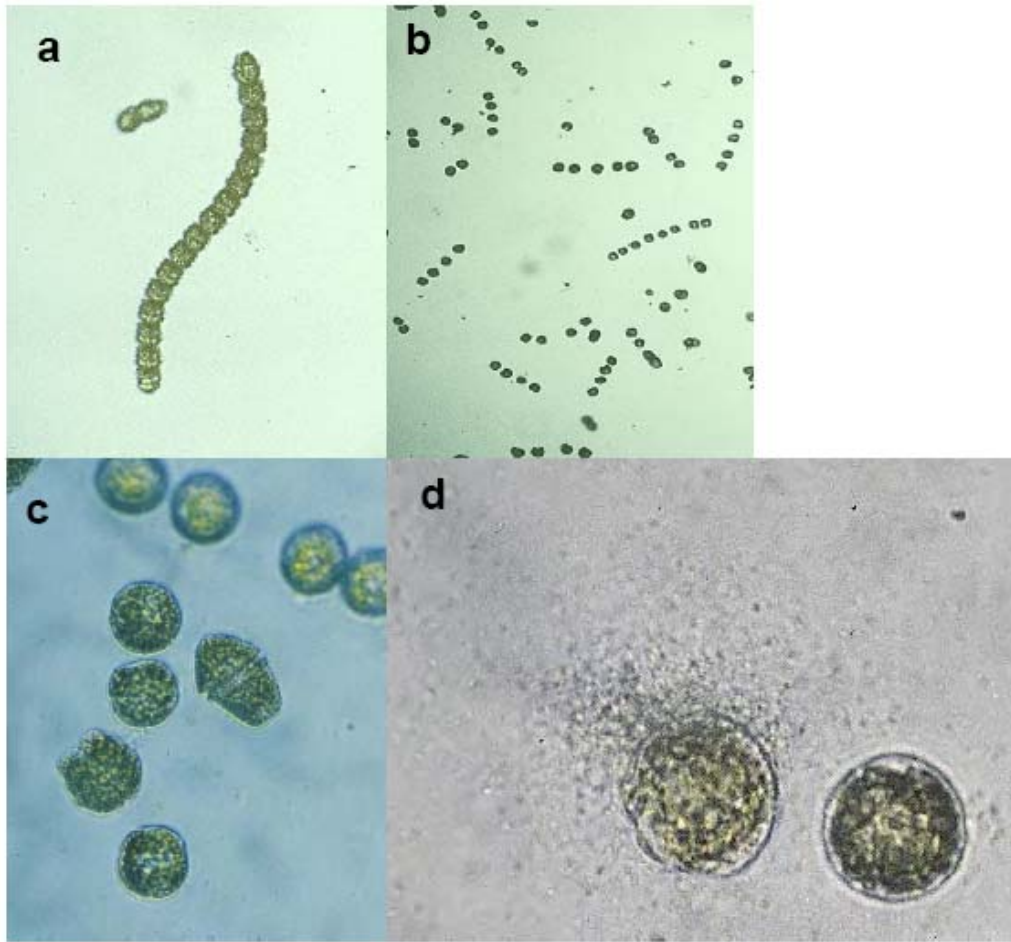


Şekil 1.10 *Pseudoalteromonas* türlerince, omurgasız larvalarının ve algal sporların yerleşiminin engellenmesi (Bowman, 2007; Holmström ve ark., 2002).

*Pseudoalteromonas*'ın tanımlanamamış ırklarının inhibitör etkileşimlerine örnek olarak çeşitli diyatom türlerinin büyümesini engelleyen antimikrobiyal maddeler üretmesi verilebilir. Bu bileşiklerden biri, antibakteriyal aktivitesi bulunan 2-heptil-4-kuinolinol olarak tanılanmıştır (Long, Qureshi, Faulkner ve Azam, 2003).

*P. piscicida* ile yakın ilişkili ırk *Pseudoalteromonas. sp Y* ile yapılan ileri analizlerde, tanılanmamış bromlu antimikrobiyal maddenin, düşük moleküler ağırlığa

sahip olduğu ve saatler içinde alg hücrelerini tamamen parçaladığı görülmüştür. Bu etki, *Gymnodinium*, *Chatonella* ve *Heterosigma* gibi algal patlama yapan ve toksin üreten dinoflajellat türleri üzerinde etkiliyken, test edilen diğer türler dirençli olarak görülmüştür. *Gymnodinium catenatum*'daki litik (parçalanma) etki Şekil 1.11'de verilmiştir (Bowman, 2007; Skerratt, Bowman, Hallegraeff, James ve Nichols, 2002).



Şekil 1.11 *Pseudoalteromonas* türünün, dinoflajellat *Gymnodinium catenatum* üzerindeki anti-algal aktivitesi. a) *G. catenatum*'un tipik zincir formu (0-10dk), b) Bireysel hücrelerin zincirden ayrılmaları (20dk), c) Hücreler genişlemeye başlar (45dk), d) Hücreler parçalanır ve bakteri hücreleri etrafa dağılmaya başlar (3saat) (Bowman, 2007; Skerratt ve ark., 2002).

Bu bilinmeyen algisidal (alg öldürücü) faktörün, AI-2-tip peptid gibi quorum sensing sisteminde tetiklenerek üretildiği ve algal patlamanın maksimum olduğu dönemde devreye girdiği tespit edilmiştir. Sistem, patlamanın çözülmesine katkıda



bulunmak amaçlı çalışmaktadır. *P. tunicata*'nın mor pigmentlerin, omurgasız larvalarının (*Balanus amphritite*, *Hydroides elegans*) ve alg sporlarının (*Ulva lactuca*, *Polysiphonia sp.*) yerleşimini engellediği bulunmuştur. *Ulva lactuca*'nın yüzeyinden izole edilen *P. ulvae* türlerinin de omurgasız larvasının (*Balanus amphritite*) yerleşimini engellediği belirlenmiştir. Antifouling türlerin neredeyse tamamına yakını bu iki türle (*P. tunicata*, *P. ulvae*) ilişkili bulunmuştur ancak bu türlerin gruptaki yoğunlukları %1'i geçmemektedir (Bowman, 2007; Egan, Thomas, Holmström ve Kjelleberg, 2000).

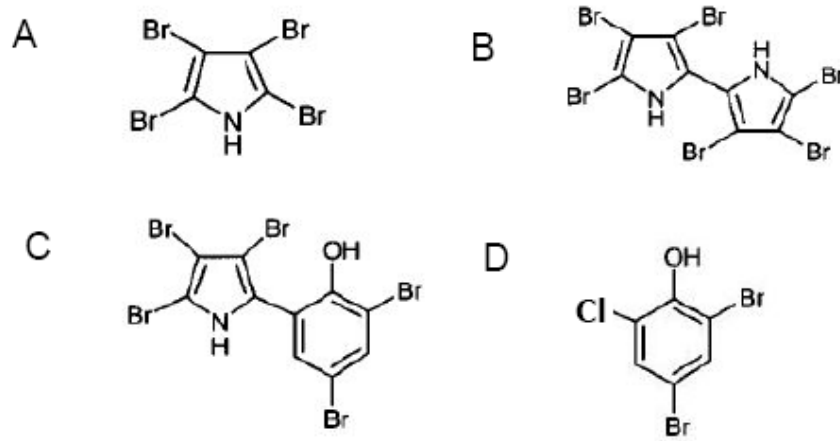
Pigmentsiz türler hakkındaki bilgiler halen kısıtlıdır ve nadir görülen çeşitli enzimatik aktivitelerinin (kitinaz, aljinaz, soğukta aktif enzimler), çevresel koşullara (sıcaklık, pH, su aktivitesi) geniş çaplı toleranslarının ve farklı besinsel isteklerinin olduğu bilinmektedir (Mikhailov ve ark., 2006).

Biyofilm topluluklarının, dinamik kompleks yapılar olduğu noktası asıl önemli noktadır. Laboratuvar ortamında yapay olarak oluşan biyofilmlerdeki antimikrobiyal bileşikler direk tespit etmek her zaman için mümkün değildir. Çünkü, üretim miktarları ve yapıları doğal ortama ve yapıdaki tür çeşitliliğine bağlı olarak değişmektedir. Bu örnekler göre, kimyasal madde üretimi, çeşitli *Pseudoalteromonas* türlerinin farklı koşullarla yarışmalarına yardımcı olabilir. Mikrobiyolojinin popüler konularından biri olan antibiyotiklerle ilgili, hücreden hücreye yakınlık, seyrelme oranı, antibiyotik direnci gibi konular önem taşımaktadır. Antibiyotiklerin üretiminde hala bir çok soru aydınlatılamamıştır. Son yıllarda, incelenen model türlerden biri de *P. tunicata*'dır. Bu organizmanın diğer bir çok mikroorganizmayı ve geniş çaplı ökaryotu yok etme yeteneği olduğu görülmüştür (Bowman, 2007).

*1.3.1.1.1 Sekonder Metabolitler.* Deniz çevrelerinde yaşayan bakterilerin çeşitli biyoaktif sekonder metabolitleri üretme yetenekleri vardır. 1800'lerin sonlarında deniz bakterilerinin antraks ve koleraya karşı antagonistik etkili ajanları ürettiklerini tespit etmiştir.

İlk rapor edilen bilgilerden biri, *P. piscicida*'nın mayaların büyümesini engelleyen bir antibiyotik ürettiğidir. Viyole pigmentli türlerin ürettiği bromlanmış bileşiklerin *Bacillus firmus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitiflere ve daha az etkili olarak *Shigella dysenteria* ve *Morganella morganii* gibi gram negatiflere karşı etkili olduğu görülmüştür (Mikhailov ve ark., 2006).

*P. luteoviolacea*'dan izole edilen 2,3,4,5-tetrabromopirol (Şekil 1.12A), 2,2',3,3',4,4'-hekzabromopirol (Şekil 1.12 B), 2,3,4-tribromo-5(2'-hidroksi-3',5'-dibromofenil) pirol (pentabromopseudilin olarak isimlendirilir) (Şekil 1.12C), 2,4-dibromo-6-klorofenol (Şekil 1.12D), 4-hidroksibenzaldehit ve *n*-propil-4-hidroksibenzoat gibi bileşiklerin bazılarının protistlere karşı etkili olduğu bilinmektedir (Bowman, 2007). Bu bileşiklerin bazılarının *P. tunicata*'nın sarı pigmenti, funguslara karşı aktiviteye sahiptir (Egan ve ark., 2002) ve tambjamine benzeri alkoloiddir (Franks ve ark., 2005). Tambjaminler önceleri deniz omurgasızlarından elde edildiği düşünülen 4-methoksipirol içeren biyoaktif moleküllerdir ve predatörlere karşı üretilen doğal savunma bileşiklerine benzer şekilde antimikrobiyal, antitumoral, immunosuppressive (immun sistem baskılayıcısı), anti-proliferation (üreme, çoğalma karşıtı olan) aktivitelere sahiptir. Bu bileşikleri, yüksek canlıların yüzeyine yerleşen bakterilerin ürettiğine dair artık bir çok kanıt mevcuttur (Bowman, 2007).



Şekil 1.12 *Pseudoalteromonas* türlerince üretilen bromlanmış bileşikler; A) 3,4,5-tetrabromopirol, B) 2,2',3,3',4,4'-hekzabromobipirol, C) 2,3,4-tribromo-5(2'-hidroksi-3',5'-dibromofenil) pirol (pentabromopseudilin olarak isimlendirilir), D) 2,4-dibromo-6-klorofenol (Bowman, 2007).

*Alteromonas*'ların ürettiği isatin olarak bilinen 2,3-indolindion fungusidaldır. Japon Denizi'nden izole edilen *Alteromonas*'ların ürettiği alteramid isimli madde makrosiklik laktamların yeni sınıfını oluşturmaktadır. Alteramid, lenf kanseri L1210, cild kanseri KB ve kan kanserine P-388'e karşı aktivite göstermiştir (Mikhailov ve ark., 2006).

Bazı *Pseudoalteromonas* türlerinin nadirde olsa balık ve kabukluları içeren deniz hayvanları için fırsatçı patojen olabilirler. Sarı pigmentli *P. piscicida* türlerinin, çeşitli balık ve yengeç türlerini öldürme yeteneğindeki toksin üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. O-spesifik polisakkaritler bir çok *Pseudoalteromonas* türünde mevcuttur ve asidik ve şekerli ya da şekersiz alt birimleri içermektedir ve bunların deniz çevrelerinde antibiyotik ve sitotoksik özellikleri tam olarak bilinmemektedir (Leone ve ark., 2007).

*Pseudoalteromonas* türlerince üretilen peptid benzeri pigment ve pigment olmayan maddelerin incelemeleri devam etmektedir ve bu bileşiklerin biyolojik etkileşimlerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Bowman, 2007).

### 1.3.2 Cins; *Vibrio*

*Vibrio* ilk olarak 1800'lerde tanılanmıştır. *Vibrio* ismi 1854 yılında Pacini tarafından kolera üzerine çalışmalar yaparken verilmiştir (Farmer ve Hickman-Brenner, 2006). *Vibrionaceae* ailesi üyeleri, planktondan balığa çeşitli organizmalarla ilişkili, deniz ve kıyı suları gibi çevrelerde yaşamakta olan bakterilerdir. Halen bu aile, denizel cinsler *Vibrio*, *Photobacterium* ve *Listonella*'yı içermektedir ve son 20 yılda bir çok yeniden sınıflandırma deneyimi yaşamaktadır. *Vibrio* türleri, tanılanma yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte gün geçtikçe artış göstermektedir. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"de 18'den fazla tür tanılanmıştır, ancak bu sayının 40'tan fazla olduğu bilinmektedir. Prokaryotların 2. basımında 9 yeni tür eklenmiş ve daha sonra 13 yeni tür tanımlanmıştır. Bazı türleri birlikte yaşamalı iken, diğer bazıları ise deniz canlılarında olduğu gibi insanlar içinde patojen olarak bilinmektedir (Macian ve ark., 2001). *Vibrio* türlerinin 12 tanesi, insanlarda miğde-bağırsak bölgesinde ya da diğer sistemlerde enfeksiyon yapmaktadır (Farmer ve Hickman-Brenner, 2006). Yaygın olarak bilinen gram negatif, kültüre edilebilir, heterotrofik bakterilerdir (Macian ve ark., 2001). Endospor ve mikrokist oluşturmamaktadırlar. Koloni morfolojisi genelde konveks ve düz, koloni rengi ise krem, beyaz veya renklidir. Tek ya da çok sayıdaki flajeller vasıtasıyla hareket edebilmektedirler. Bir kaç ırk, organik büyüme faktörlerine gerek duymaktadır. Na<sup>+</sup> iyonları, tüm türlerin büyümesini teşvik etmektedir ve bir çoğu için zorunludur. D-glukoz, D-fruktoz, maltoz ve gliserolü kullanmaktadırlar. Çoğu tür, oksidaz pozitifdir. Büyüme sıcaklıkları genelde 20-30C°'dir. Deniz suyunda ve deniz hayvanlarının yüzeyinde ve bağırsak içeriklerinde oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadırlar. Özellikle, midye ve istiridye gibi deniz kabukluları ile ilişkilidirler (Macian ve ark., 2001; Ersoy, 2005). Bazı türler, tatlı su alanlarında da bulunabilmektedir. Bir çok tür, deniz omurgalı ve omurgasızları için patojenik özellik göstermektedir. DNA'larının %G+C mol oranı 38-51'dir. *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. orientalis* ve *V. splendidus* tip I biyolojik ışımaya özellikteki lüminöz *Vibrio* türleridir. Işıma yapan bu türlerde lusiferaz enzimi bulunmaktadır (Ersoy, 2005). *Vibrio splendidus*; halofilik türdür ve ilk olarak 1900 yılında *Photobacter splendidum* adıyla tanılanmıştır. DNA-DNA hibridizasyon ve fenotipik

özelliklerine bağlı olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. *V. splendidus* biogrup 1 ırkları biyoluminesans özelliği ve arginin dihidrolaz pozitif iken biyogrup 2 her iki test içinde negatiftir. *V. splendidus* ırkları daha çok, Kuzey Amerika'nın doğu kıyılarındaki ve Danimarka'daki deniz suyundan ve balıklardan izole edilmişlerdir (P. Baumann ve L. Baumann, 1981). DNA'daki GC oranı ise % 45–46 moldür.

Bir kaç tür, aşırı derecede beta-hidroksibütirat içeren ve azot sınırlaması olan ortamda büyütüldüğü zaman, hücre içinde depolama ürünü olan poli-beta-hidroksibütirat granüllerini biriktirmektedir. Yine hücre dışına salınan enzimleri üretme yeteneğindedir. Bu enzimler; kitinaz, aljinaz, amilaz, jelatinaz ve lipazdır (Farmer ve Hickman-Brenner, 2006).

### 1.3.3 Cins; *Klebsiella*

*Klebsiella* genusu, *Enterobacteriaceae* ailesinden olup, alman mikrobiyolog Edwin Klebs (1834-1913)'in adı verilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* önemli türüdür. *Klebsiella pneumoniae* kolonileri gram negatif, laktoz pozitif, kubbe şeklinde, 30-37C°'de bir gecelik inkübasyondan sonra cıvık görünüşlü koloniler oluşturmaktadır. *Klebsiella spp.*, toprak, su gibi çeşitli çevresel kaynaklarda bulunabilmektedir. Sucul çevrelerden, endüstriyel atık sularından, bitkisel ürünlerden, gıda üretim tesislerinden ve daha bir çok alandan izole edilebilmektedir. *Klebsiella*, insanlarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Antibiyotik dirençli ırkları (bilhassa geniş spektrumlu beta laktamaz) hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Özellikle, solunum yolları patojenidirler (Brise, Grimont ve Grimont, 2006).

Özellikle tip 3 fimbria, yüzeylere tutunmada ve biyofilm oluşumunda etkindir (DiMartino, Cafferini, Joly ve Darfeuille-Michaud, 2003). Sahip olduğu genler, sefalosporinlere ve aerobaktine dirençli, büyük konjugatif bir plazmit tarafından kodlanmaktadır. Kapsüler polisakkarit, özellikle *K. pneumoniae*'nin virulens faktörü olarak etkindir ve hücreleri makrofaj fagositlerine karşı korumaktadır. Lipopolisakkarit molekülü, lipid A, core-polisakkariti ve o-antijeninden oluşmaktadır. Ayrıca, *Klebsiella* tarafından üretilen 1,3-propandiol, halı ve tekstil

üretiminde kullanılan yeni polyesterlerin öncü maddeleri olarak kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan temel maddelerdendir (Huang, Gong ve Tsao, 2002). Ayrıca bazı ırkları, çeşitli metabolik özelliklere sahiptir ve pestisitlerin biyoremediasyonunda kullanılabilir (Brisse ve ark., 2006).

#### **1.3.4 Cins; *Exiguobacterium***

Gram değişken yapıda, aerobik koşullar altında iyi büyüme gösteren cinsdir. Koloniler rod-görünümlü ya da kok şeklinde (logaritmik ya da durgunluk fazında), daireseldir. Hareketlilik testi, katalaz ve oksidaz pozitifdir. Büyüme, 10-47C° aralığında gerçekleşmektedir, ancak optimum büyüme 30-37C° de gözlenmektedir. Büyüme için optimum pH ise 6,5-8,5'dur. Ancak, pH 5-10,5 aralığında da büyüme gösterebilirler. Genelde, D-sorbitol, D-ksiloz, L-arabinoz, D-melesitoz, L-ramnoz'dan asit üretmezler. İlk tanımlanan türü ise *Exiguobacterium aurantiacum*'dur. 16S rRNA gen dizisi analizleri, *Exiguobacterium*'un filogenetik olarak *Bacillus* ve ilişkili gruplara benzer olduğunu göstermiştir (Frühling, Schumann, Hippe, Straubler ve Stackebrandt, 2002; Kim ve ark., 2005).

### **1.4 Antifouling (AF) Boyalar**

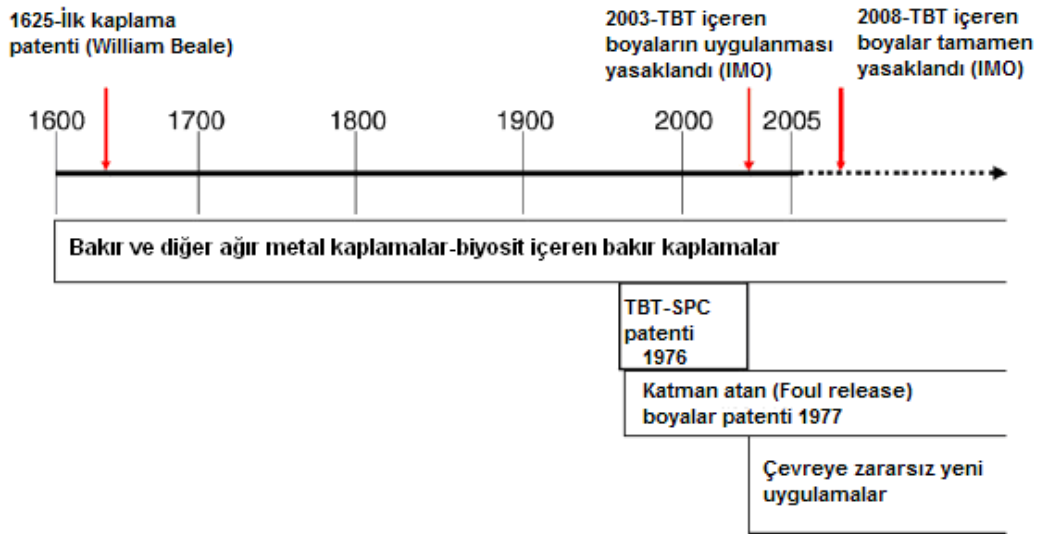
#### **1.4.1 Antifouling Sistemlerin Tarihsel Gelişimi**

##### *1.4.1.1 19. Yüzyıl Ortalarından Önce Kullanılan İlk Teknolojiler*

Fouling olayının verdiği zararlar 2000 yıl önceden görülmüş ve sürecin engellenmesi için mücadele başlamıştır (Yebra ve ark., 2004). Eski dönemlerde zararı engellemek için balmumu, parafin, zift, katran ve asfalt gibi doğal ürünler kullanılmıştır (Almeida ve ark., 2007). İsa'dan önce 5 yy.'da gemi kurtlarıyla mücadele için arsenik ve sülfür karışımı yağ, 13.yy.'dan 15. yy.'la kadar ise zift kullanılmıştır. Bunlara bazen yağ, reçine ve donyağı da katılmıştır (Yebra ve ark., 2004).

Çeşitli kaynaklara göre, antifouling özelliğine bakılarak bakır, ilk olarak Fenikeliler ve Kartacalılar tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik, kurşun kaplama üzerinde çalışan Romalılar ve Yunanlılarca da benzer şekilde uygulamaya geçilmiştir. Bakırın, İngiltere’de ilk fouling önleyici olarak kullanımı ile ilgili bilgi 1625 yılında, William Beale’ın aldığı patent olmuştur. Beale, demir ve bakırdan oluşan alaşımlardan yararlanmıştır. 18.yy. içinde bir çok ülke bakır kaplamaları yaygın olarak kullanmaya başlamış, kauçuk, mantar vb. gibi metalik olmayan kaplamalar ise yüksek maliyetlerinden ve zor uygulamalarından dolayı sonunda terk edilmiştir (Almeida ve ark., 2007).

İlk kez 19 yy. ortalarında; keten tohumu yağı, reçine, petrol yağı içinde dağılan bakır, arsenik ya da civa oksit gibi zehirli maddeleri içeren antifouling boyalar piyasaya sürülmüştür. 19 yy. sonlarına doğru, çeşitli bakır ve civa bileşiklerini içeren sıcak uygulanan plastik (hot-plastic) boyalar yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu boyalar, gemi gövdesiyle direkt temas ettiğinde, çelik gövdede korozyona neden olan pigmentlerin varlığı nedeniyle, gövde-boya arayüzeyinde astar uygulaması yapılmıştır (Yebra ve ark., 2004; Almeida ve ark., 2007). Sıcak uygulanan plastik boyalardaki uygulama zorlukları nedeniyle, soğuk uygulanan plastik boyalar geliştirilmiştir. İkinci dünya savaşından sonra, boya endüstrisinde değişimler görülmeye başlanmıştır. Yeni sentetik petrol temelli reçineler ortaya çıkmış, havasız spreyleme yöntemleri uygulanmaya başlanmıştır. İlk organometalik boyalar (kalay, arsenik, civa ve diğerleri) 1950’ler civarında görülmeye başlanmış, hızlı ve başarılı bir şekilde gelişme göstermiştir (Şekil 1.13) (Almeida ve ark., 2007).

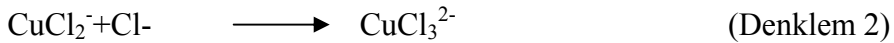


Şekil 13. Antifouling teknolojideki zaman ölçüsü (Chambers ve ark., 2006)

#### 1.4.1.2 20.Yüzyılın İkinci Yarısında Uygulanan Temel Ürünler

Bu ürünler, farklı tipteki polimerik bağlayıcılardan zehirli kimyasalların dağılması temeline dayalıdır, son yıllardaki farklılıkları deniz suyunda zehirli kimyasalların salınımlarıyla ilgilidir.

*1.4.1.2.1 Toksik Pigmentler.* Bakırın deniz canlıları üzerindeki toksik etkisini uzun zamandır bilmektedir. Tüm geleneksel antifouling boyalar, pigment olarak bakırı kullanmaktadır ve bakır bileşiklerinin salınım yolu iyi bilinmektedir



Denklem 1'deki reaksiyon geriye dönüşümsüzdür, denklem 2'deki reaksiyon ise ani ve geri dönüşlüdür. Deniz suyunun oksijenlenmiş ortamında, bakır kompleksleri hızlıca  $\text{Cu}^{2+}$  ye okside olur, ki bu da ana biyosidal formdur (Almeida ve ark., 2007).

Bunun yanında, bakır fouling organizmaların tümüne karşı eşit şekilde etki göstermemektedir. Bakır iyonlarına duyarlılık, mikroorganizmalardan, omurgasızlara, alglere, kabuklulara doğru gidildikçe azalmaktadır. Dahası, sucul



çevreler bakır iyonlarına bağlanarak, toksik konsantrasyonlarını azaltan çözüner organik kimyasalların (Ör; mikroorganizmalarca sentezlenen ve salgılanan malaşit yeşil ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$ ) bulunuşu da biyosit olarak kullanım etkilerini azaltmaktadır (Voulvoulis, Scrimshaw ve Lester, 1999;). Biyosit olarak kullanılan inorganik ürünler arasındaki, çinko ve demir oksitin biyosidal karakteristikleri ise tam olarak aydınlatılmamıştır (Yebra ve ark., 2004).

Biyosit olarak kullanılan, organometalik bileşikler arasında, RMeX tip bileşikler de R organik radikal, Me metali, X ise halide (halojenleri) ya da asit kalıntısını göstermektedir. Buradan yola çıkarak (RHgX) organikciva, (RAsX) organikarsenik, (RPbX) organik kurşundur. Tribütülin (TBT) (organik kalay), daha sonra üretilmiş ve ıstırdıye, yumuşakça ve kabuklular için oldukça toksik olduğu görülmüştür. İlk üretiminden sonra, ekonomik avantajının olması nedeniyle kısa sürede, %70'ler gibi geniş çaplı bir pazar payına ulaşmıştır. Bakır ve TBT türevlerinin, tek başlarına foulinge karşı geniş çaplı koruma sağlamalarının yanı sıra, birleştirilerek de kullanılabilmişlerdir. Çünkü, bazı mikroalgler bakıra karşı direnç gösterirken, kahverengi ve yeşil algler ve bazı diyatomlar ise TBT'ye tolerans göstermektedir. TBT bazlı boyaların kullanımlarının artışıyla, yoğun limanlarda ve gemi havuzlarında, çevreye verdikleri yıkıcı etkiler görülmeye başlanmıştır (Burgess ve ark., 2003). Kalayın düşük konsantrasyonları bile, ıstırdıye *Crassostrea gigas*'da (20ng/l) kusurlu büyümeye, deniz salyangozu *Nucella sp.*'de (1ng/l) dişi üreme organlarında erkek üreme organlarının gelişimine, ördek, fok ve balıklarda biyolojik birikime neden olmuş, ayrıca balıkların bağışıklık sistemlerinde zayıflama, kabuklularda ise bozulma gözlenmiştir (Chambers ve ark., 2006; Tang ve Cooney, 1999; Yebra ve ark., 2004). Sonuç olarak, 2001 yılında IMO (Uluslararası Denizcilik Örgütü)'nun aldığı kararla, 1 Ocak 2003 tarihinden itibaren TBT içeren boyaların üretimi, 1 Ocak 2008 tarihinden itibaren ise bu boyaların gemi yüzeylerinde bulunması tamamen yasaklanmıştır (Almeida ve ark., 2007). Büyük boya şirketleri (International Marine Coatings, Hempel' Marine Paints, Jotun, Ameron, Chugoku Marine Paints) 1 Ocak 2003 tarihinden itibaren, ürünlerinden TBT-temelli boyaları kaldırma kararı almışlardır. Diğer yandan gemi şirketleri de, yasal değişikliklerden dolayı kalaysız boyaların uygulanmasına başlamıştır (Yebra ve ark., 2004).

Antifouling bileşiklerin kontrollü salınımı zordur ve bakır toksisitesinin etkileri incelenmektedir. Bakır, denizel çevrede doğal olarak da bulunmaktadır. İnsanlar için nispeten zararsız görülmesine karşın, Çevre Koruma Ajansı (EPA) içme suyu limiti olarak  $1000\mu\text{gL}^{-1}$ 'i şart koşturmaktadır. Ancak,  $5-25\mu\text{gL}^{-1}$  gibi nispeten düşük değerler deniz omurgasızları için öldürücü olabilmektedir. Diğer yandan bakır, zayıf biyolojik birikim eğilimi göstermektedir, bu da halen boyaların yapısında bulunma nedenini açıklamaktadır (Almeida ve ark., 2007; Chambers ve ark., 2006). TBT'nin toksik etkisinden dolayı yasaklanması nedeniyle, diğer biyositler gelişmekte ve bu boşluğu doldurmaktadır. Biyositler, mikroorganizmaları öldüren kimyasallara verilen genel bir isimdir. İndirgeyici ve yükseltgeyici olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Ayrıca biyodispersan (dağıtıcı, seyreltici) adı verilen kimyasallar da, biyositin film tabakasına penetrasyonunu arttırmak için kullanılmaktadır. Genel olarak biyositler, klor ya da brom türevli kimyasallardır. Bunlar su ile birleşerek asit oluştururlar. Bu asit, mikrobiyal popülasyonun hücre materyaline, enzim sistemine ya da proteinlerine zarar vererek onu öldürmektedir. Eğer biyodispersan kullanılmaz ise uygulanan kimyasallar biyofilm tabakasına etki edemeyecek ve mikrobiyal popülasyonlar biyosit kullanılmasına karşın aktivitelerine devam edeceklerdir (Morton, Greenway, Gaylarde ve Surman, 1998). Biyositler arasında halen kullanılmakta olanlar şunlardır: Irgarol 1051 (2-metiltio-4-*tert*-bütülamın-6-siklopropilamin-s-triazin), Diuron (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilüre), bakır piriton, çinko piriton, Sea-nine<sup>TM</sup> 211 (3(2*H*)-izotiazolon) ve Zineb (Konstantinou ve Albanis, 2004). Bu maddelerin etkileri tam olarak çalışılmamışsa da, Voulvoulis ve ark.'larına (1999) göre, çinko piriton ve Zineb çevre için en zararsızları iken, Irgarol ve Diuron daha zararlı gibi görünmektedir.

*1.4.1.2.2 Çözünür Matrisli Boyalar.* Bu boyalar, AF etkinliğini kaybetmemek için, bağlayıcı yapının deniz suyunda çözünür formda olması prensibine dayanmaktadır. Bu boyalar, bağlayıcı olarak reçine ve türevlerini (çam ve köknar ağaçlarının özü), toksik pigmentler olarak önceleri civa, arsenik daha sonra ise bakır, demir ya da çinko oksit gibi toksik pigmentleri içermektedir. Bu doğal reçinede, çift bağların ve karboksil grupların bulunduğu resinik asit % 85-90 oranında bulunmaktadır. Bu çift bağ, reçinenin kararlılığını sağlamaktadır. Deniz suyu ile temas edince karboksil

grupları, deniz suyundaki sodyum ve potasyum iyonları ile reaksiyona girmekte ve yüksek çözünürlükteki reçine asidi tuzları ve esterlerini oluşturmaktadırlar. Bunun sonucunda da, bakır oksit pigmentlerinin boyadan salınımı sürekli olmaktadır (Yebra ve ark., 2004). 1950'lerde geliştirilmeye başlanan bu boyalar, biyoçözünür materyallerin düşük konsantrasyonlarının ihtivasına izin veren, deniz suyunda çözünür, mevcut mekanik dayanıklılığı zayıf, nispeten ince film tabakası uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak bu boyalar, bağlayıcılarının yapılarından dolayı yağ kirliliğine ve oksidasyon süreçlerine duyarlıdır ve 12-15 aydan fazla bir korumayı garanti edememektedir (Şekil 1.14) (Almeida ve ark., 2007).

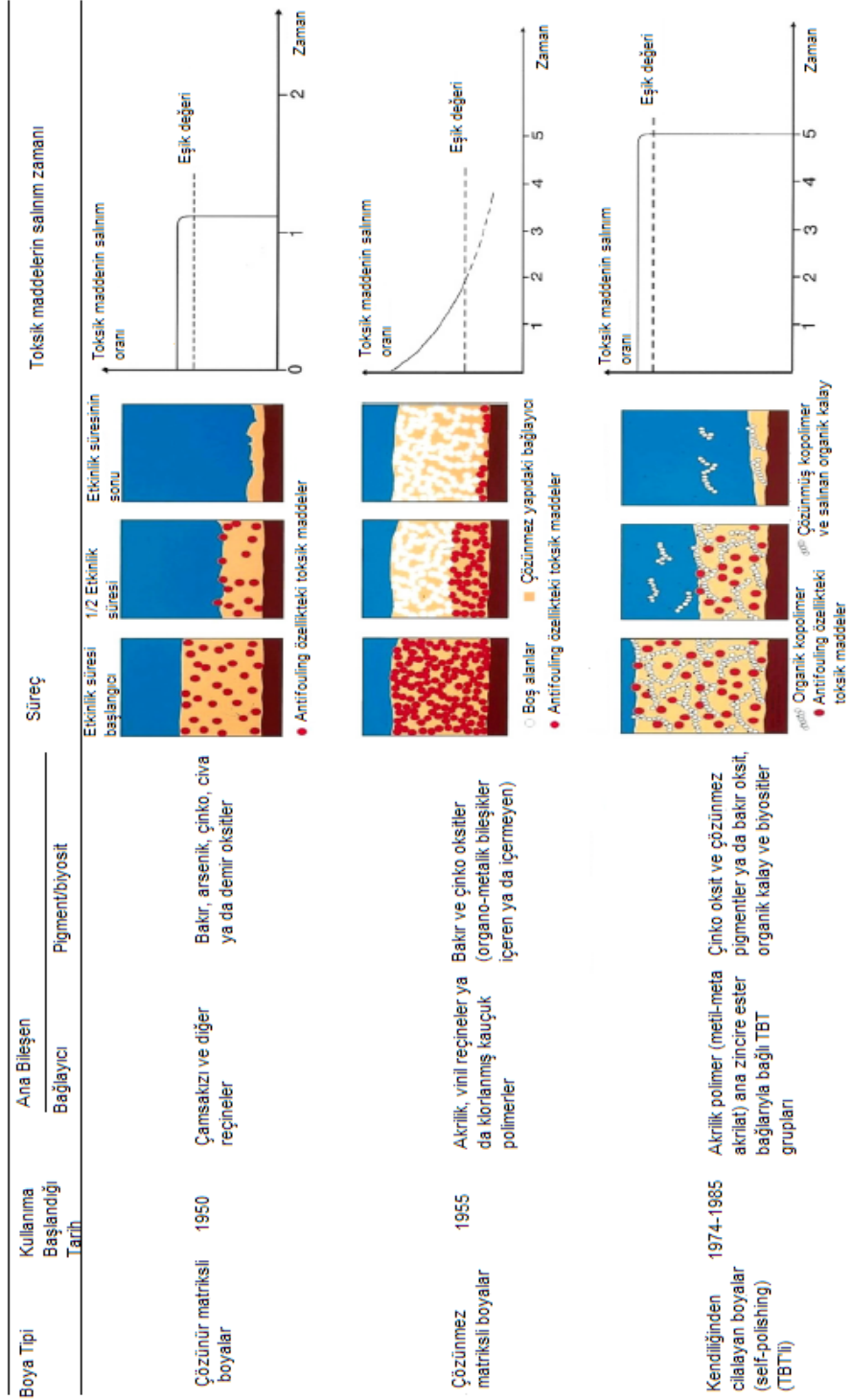
*1.4.1.2.3 Çözünmeyen Matrisli Boyalar.* Boyanın matrisi aşınmaz ya da çözünmez formdadır. Ancak, çözünür pigmentlerin salınımı söz konusudur (Yebra ve ark., 2004). Antifauling boyaların bu tipi akrilik, vinil ya da klorlu kauçuk gibi yüksek moleküler ağırlığa sahip deniz suyunda çözünmeyen polimer bağlayıcıları kullanılmaktadır. Bu boyaların güçlü özellikleri, yüksek toksik miktarlarda birleşimleri içermeleri ve ağır ağır salınım göstermeleridir. Bağlayıcı, deniz suyunda çözünür değildir, ancak serbest kalabilen toksik ajanlar boş alanları içermektedir ve deniz suyu, gözeneklerden içeri yayılarak toksik partikülü çözmek için ilerleyebilmektedir. Ancak, sıra boya filmde derinlerde yer alan toksik partiküllere geldikçe, toksik maddenin salınım oranı zaman içinde azar azar düşmektedir ve koruma etkinliği de hızlı şekilde azalmaktadır. Bu gözenekli yapının kaybıyla, yüzey pürüzlülüğü oluşmakta ve toksik maddelerin salınımı engellenmektedir. Bu boyaların ömrü de, gemi tipine ve uygulamaya bağlı olarak yaklaşık 12-24 ay kadar olmaktadır (Şekil 1.14) (Almeida ve ark., 2007).

*1.4.1.2.4 TBT Self-polishing (Kendi yüzeyini cilalayan) Boyalar.* Self-polishing boyalar ilk olarak TBT-(meth) akrilat boyalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu boyalar, başlangıçta hidrofobik ve mekanik olarak güçlü, ortam koşullarından çok etkilenmeyen kontrollü polishing (cilalama) yapan boyalar olmuşlardır (Kill, Weinell, Pedersen ve Dam-Johansen, 2001).

Bu boyalar, çelik ve aliminyum gövdelerle uyumludur, deniz suyunda çözünür polimere sahiptir ve TBT grubu ester bağlarıyla ana polimer zincirine tutunmuştur (Yebra, Kill, Weinebell ve Dam-Johansen, 2006a). Çözünme, moleküler seviyede kontrol edildiğinden, bu boyaların iyi bilinen self polishing etkisi elde edilmektedir. Kopolimerin içinde reaksiyona giren zehirli maddelerin yanında, bu boyalar bakır oksit gibi toksik pigmentleri de içermektedir, sonuç olarak denizde oldukça etkili antifouling özellikler göstermektedir (Kill ve ark., 2001).

Daldırma işleminden sonra, çözünür pigment partikülleri deniz suyuyla temas sonrası çözünmeye başlar. Sonuç olarak, ancak çözünür pigment partiküllerinin çözünmesi sonucu, deniz suyu gözeneklerin boşluklarını doldurmaya başlar (Almeida ve ark., 2007).

Bu tip boyalar normalde, senede yaklaşık 5-20µm oranında cilalama olacak şekilde formüle edilmiştir. Avantajı, çözünür ya da çözünmez matrisi boyaların aksine, yeniden kaplama işlemi süresince, önceden gelen kalıntıların çıkarılmasına gerek duyulmadan uygulamanın yapılabilmesidir. Makrofauling organizmalara karşı, geminin tipine, hızına bağlı olarak, düşük polishing özellikteki daha etkili boyalar gerekirken, yavaş gemilerde ya da limanlarda uzun süre kalanlarda hızlı cilalama özelliği olanların kullanımı gerekmektedir. Bu boyaların önemine bakıldığında, 1999 yılında ticari gemilerin yaklaşık %70'inde kullanıldığı, yakıt ve diğer harcamalarda yıllık 2400 milyon Amerikan Doları zarardan koruduğu tahmin edilmektedir (Şekil 1.14) (Yebra ve ark., 2006b).



Şekil 1.14 20.yy.'ın ikinci yarısında gemi gövdelerinde uygulanan ana antifouling boya tipleri (Almeida ve ark., 2007)

### 1.4.1.3 Daha Çevreci Boyalar

TBT'li self polishing boyaların toksik etkileri nedeniyle yasaklanması ile boya üreticileri çevre dostu yeni boyaların üretimine geçmişlerdir. Bu amaçla biyosit içeren 3 grup boya hayata geçirilmiştir. Bunlar; kalay içermeyen kontrollü azalan boyalar (controlled depletion) (CDPs), kalay içermeyen self polishing boyalar (TF-SPCS) ve hibrid sistemli boyalardır. Bu boyalar bakır oksit ve bunlarla reaksiyon veren biyositleri içermektedir. TBT'nin yerini alan biyosit temelli boyaların aktiviteleri henüz tam olarak sınıflandırılmamıştır. Biyosit içermeyen boyaların geliştirilmesi yolunda çalışmalar hala sürmektedir (Almeida ve ark., 2007).

*1.4.1.3.1 Kalay İçermeyen Kontrollü Azalan Boyalar.* Kalay içermeyen ilk jenerasyon boyalardır. Geleneksel çözünür matrisli boyalardan daha gelişmiş değillerdir, sentezlenmiş organik dirençli reçineler, bağlayıcı olarak kullanır, ancak çalışma prensibi basit reçine temelli boyalarla benzerdir. Yapı, fiziksel süreçlerle aşınabilir. Deniz suyuna temas edince, biyositler çözünürken, bağlayıcı da çözündürülür. Suyu dalışdan kısa bir süre sonra erozyon süreci de başlamış olur. Bu kalay içermeyen ürünler, TBT-temelli self-polishing boyaların yerini almada etkin değildir. Kısa sürede boyanın matrisinin boşalması nedeniyle yeniden boyanmadan önce bu boş matris çıkarılmalıdır. Boyaların bu mekanizmasından dolayı, yüksek bakır ve biyosit içeriğine ihtiyacı vardır, bu durum ise çevre açısından dezavantajlar içermektedir. Genel özellikleri arasında, toksik maddelerini ekonomik salması, TBT temelli self polishing boyalardan biraz daha pahalı olmasıdır. Küçük gemiler ve botlar için uygulanması daha yaygındır.

*1.4.1.3.2 Kalay İçermeyen Biyosit Temelli Self-polishing Boyalar.* Boyaların bu tipi, ana zincire çeşitli grupların eklenmiş olduğu akrilik matrisle birleştirilmiş kalaysız yapı şeklindedir. Kalay içeren self-polishing boyalarda olduğu gibi deniz suyuyla temas edince, ana yapıya bağlanan grupların salındığı düşünülmektedir. 1996 yılına kadar bir çok patent başvurusu olmuş olsada, TBT kadar etkili bulunamamıştır (Yebra ve ark., 2004).

Genelde, biyositler ile birlikte bakır akrilatlar karıştırılarak oluşturulmuşlardır, ancak çinko akrilat ve diğerleri de kullanılmaktadır. Polimerler deniz suyu ile ilişki halindedir ve self polishing etkileri biyositlerin salınımıyla kontrol edilmektedir. Kullanılan potansiyel biyositler; Seanine, bakır piriton, çinko piritondur (Almeida ve ark., 2007). Bu boyaların AF korumasının yanında, çevre tarafından kabul edilebilir biyosit salınımı oranına sahip olup olmadığının da göz önünde tutulmalıdır (Yebr ve ark., 2006a).

*1.4.1.3.3 Hibrid Boyalar.* İlk iki boya sisteminin karıştırılması ile oluşturulan bu boyaların işleyiş mekanizmaları çok daha kompleksdir ve marketlerde yer almaya başlamıştır. Kullanımdaki potansiyel biyositler; isothiazolone, zineb, bakır piritondur.

*1.4.1.3.4 Biyosit İçermeyen Boyalar.* Kabul edilebilir fiyatlarda biyosit içermeyen antifouling boyaların geliştirilmesi oldukça zor olmasına karşın çevreye verilen zarar açısından bakıldığında geliştirilmeleri önemlidir. Geleneksel boyalardan farklı olan bu boyalar, engelleyici tabaka olarak rol oynayarak ve sürtünmeyi azaltıp oldukça düz bir yüzey sağlayıp, deniz canlılarının tutunmasını engellemektedir. Halen kullanılmakta olan tüm polimerler arasında florlupolimerler ve silikonlar özellikle sirriped'lerin tutunmasını engelleyici yapıdadır (Brady, 2001).

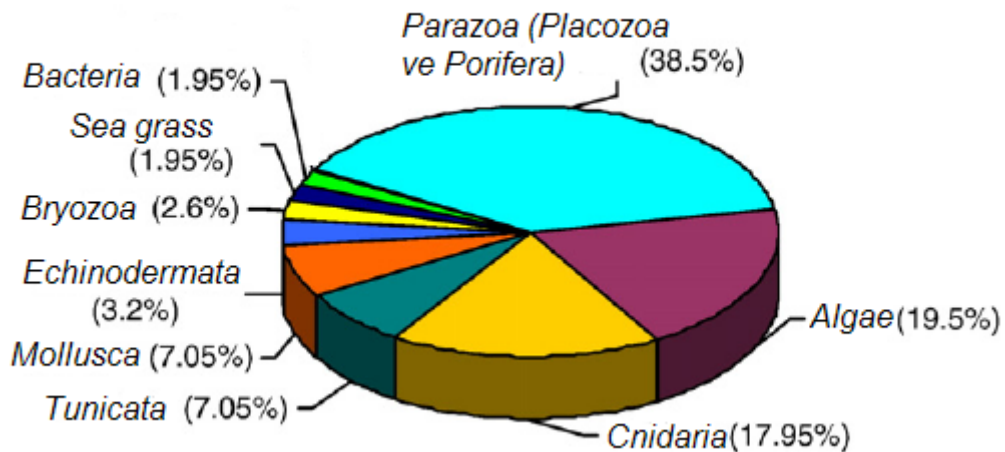
#### *1.4.1.4 Son Gelişmeler*

*1.4.1.4.1 Biyomimetik (Biyo-taklitçi) Yaklaşım.* Evrim süreci, denizel ekosistemde belli bazı antifouling özelliklerin gelişimine izin vermektedir. Doğal kimyasal savunma metodları, özellikle son 20 yılda ilaçlar için kimyasal umut olması anlamında da araştırılmakta ve çeşitli keşifler yapılmaktadır (Naik ve ark., 2003).

Denizdeki organizmaların kendi yüzeylerini foulingden koruma yöntemleri açısından bakıldığında, kilit moleküler mekanizma; sekonder metabolitlerin (doğal antimikrobiyaller, antitumoraller mikotoksinler vb.) üretimidir. Bu doğal ürünler, sentezlerindeki metabolik yol izlerine bağlı olarak sınıflandırılır (Chambers ve ark.,

2006). Bazı deniz canlılarının ürettiği sekonder metabolitler, yüzeye tutunan organizmaların çözünmesini sağlayan enzimatik reaksiyonlarda rol oynamaktadır. Deniz organizmalarının metabolitleri, foulinglerin tutunmalarını, büyümelerini ve değişimlerini engellemektedir, bu metabolitler doğal biyositler olarak da rol oynamaktadır (Almeida ve ark., 2007).

Aktif antifouling ajanlar, bakterilerden, alglerden, mercanlardan, süngerlerden, deniz yosunlarından ve diğer deniz canlılarından elde edilmektedir (Şekil 1.15). Çeşitli yayınlarda, 160'ya yakın potansiyel ürün belirlenmiştir; bunların %76'sı süngerlerden, alglerden elde edilmiştir. Geçmiş 20 yıldır, doğal antifouling ürünlerle ilgili çalışmalar sürmesine karşın, biyofoulinge karşı kullanılmaları yönündeki araştırmalar henüz çok yenidir. Çalışmalar bu maddelerin, boyaların polimerik matrisleri ile birleştirilerek uygulanabilmesi şeklinde devam etmektedir.



Şekil 1.15 Potansiyel doğal antifouling madde üreten yaklaşık 160 deniz canlısının dahil olduğu gruplar (Chambers ve ark., 2006).



Sekonder metabolitler arasında, organik asitler, steroidler, terpenoidler, aminoasitler, alkaloidler, polifenoller, asetogeninler, furanonlar ve laktonlar bulunmaktadır (Bowman, 2007; Chambers ve ark., 2006). Kırmızı deniz yosunu *Delisea pulchra*'dan elde edilen halojenlenmiş furanonların en başarılı antifouling madde olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (topluluğun %50'sini öldürmek için etkili konsantrasyon 0.02µg/ml'nin altındadır).

Konu ile ilgili yayınların üzerinde durduğu nokta, bu maddelerin organizmanın yüzeyinde doğal antifouling etki göstermeden önce ekolojik olarak aktif konsantrasyona, ulaşım ulaşmadığıdır. Doğal ürünlerin salınımının kontrolü yöntemi olarak, mikroenkapsülasyon (maddelerin çevresini bir kapsülle çevirme) teknolojisi kullanılmaktadır (Chambers ve ark., 2006).

Antifouling boyaların geliştirilmesi ile ilgili diğer çalışmalar arasında, yunuslar, balinalar, gibi deniz hayvanlarının derilerindeki yapışma engelleyici özelliklerinin araştırılması da bulunmaktadır. Bu doğal koruma, derilerinin yüzeyinde düşük yüzey enerjili glikoproteinlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Tüm gözlemler, mikro yapıdaki silikonların, deniz canlılarının tutunmasını engellediği şeklindedir. Ancak bu durum göreceli olarak soğuk sularda görülmektedir, sıcak bölgelerde yetersiz olabilmektedir (Chambers ve ark., 2006; Almeida ve ark., 2007).

*1.4.1.4.2 Diğer Yöntemler.* Geleneksel boyalar, çeşitli materyallerden oluşmuşlardır; vernik, astar, cila, yapıştırıcı, macun vb. antifouling maddeler bu kompleks koruyucu kaplama sistemde en üst katmandaki bileşenlerden biridir. Bir çok antifouling kaplama organikdir ve genelde gözenekli yapıdaki antikoroziv üst kaplama ile astar bileşimini içermektedir. Ne yazık ki günümüzde, patentli biyokontrol teknolojileri ve şirketlerin politikaları yeni ürünlerin etkinliği ile ilgili bilgi akışını engellemektedir (Chambers ve ark., 2006).

21. yy'a doğru, boyalar methakrilat, akrilat, sililat gibi birçok bağlayıcının geliştirilmesini sağlayan sentetik mikrofiberler (50-100µm uzunluğunda, 2-10µm ortalama kalınlığında) içermeye başlamıştır (Almeida ve ark., 2007). Antifouling

mekanizmalarda testleri süren işlemlerden biri de, elektrostatik yüklü liflerin kaplamalara dikey tutunması işlemidir. Lifler, polyester, poliamid, naylon ya da poliakrilat olabilir. Toksik olmayan kaplamalarda uygulanan diğer bir sistem, iki katmanlı sistemdir, temel kaplamada polibütandien ve üst kaplama da ise silikon ya da hidrokarbon kullanılmaktadır. Yapılan 6-12 aylık deneme sonucunda, iki katmanlı sistemin biyofilmlerce ve alglerce bozulduğu görülmüştür (Chambers ve ark., 2006).

Teflon ve silikon kaplamaların kullanımından ise gemi gövdelerine tutunma eksikliği probleminin çözülememesi nedeniyle vazgeçilmiştir. Yıllar içinde kimyasal, elektriksel, radyasyon içeren yüzey uygulamaları gibi çeşitli yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Almeida ve ark., 2007). 1950'lerde ultrasonik titreşimleri içeren testler yapılmış, ancak gemilerde uygulamasının çok pahalı olması nedeniyle yetersiz bulunmuştur (DelaCourt ve Vries, 1973). Co60, TI204, Y91 gibi radyoizotopların kullanımı yoluna gidilmiştir. Etki gücü 20rad/s olduğunda foulingleri etkilemede güçlü ancak çevre için tehlikeli olduğu, düşük etki gücündeki uygulamalarda ise yetersiz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yine elektrik akımını kullanarak organizmaların tutunmasını önleme çalışmaları yapılmış, ozonu, platin bileşiklerini, amonyağı, bromlu bileşikleri içeren yöntemler denenmiştir. Diğer önemli bir nokta, gemi yüzeylerini uzaktan kumandalı otomatik temizleme araçlarının kullanılması olmuştur. Yine bu sebeple, yüzeyleri temizleyen robotların kullanılması amaçlanmaktadır (Almeida ve ark., 2007; Chambers ve ark., 2006).

#### ***1.4.2 Antifouling Boyalar ve Biyofilm Arasında Etkileşim Mekanizmalarının Potansiyel Kaynakları***

Çeşitli bileşenlerin (metaller, biyositler vb.) salınım oranları ve boya etkinliği, boyanın ön yüzeyindeki reaksiyonlardan etkilenmektedir. Bu anlayışa göre, biyofilmdeki tipik EPS yapısı, boyanın salınım zonu boyunca, salınım oranlarını değiştirecektir (Yebra, Kill, Weinebell ve Dam-Johansen, 2005). Mikrobiyal fouling (bakteriyal, algal ya da karışık kültür), çeşitli kimyasal değişkenler (Ör; sıcaklık, pH vb.) boya etkinliğini bozabilmektedir (Yebra ve ark., 2006a; Yebra ve ark., 2006b).

Boya ve biyofilm arasındaki diğerk bir potansiyel etkileşim ise, film tabakasının metalleri (ör.  $\text{Cu}^{+2}$ ) bağlama yeteneğidir. Çeşitli araştırmalar, TBT gruplarının, EPS matrisce yakalandığını bildirmektedir. EPS matrisi içinde üronik asitler, sülfatlar, amino asitler ve amino şekerler gibi negatif yüklü bileşenlerin bulunuşu, bağlama yeteneğini sağlamaktadır. Biyosit temelli boyalarda, biyolojik yıkıma uğratılabilir ve film tabakası içinde kimyasal dönüşümlere uğratılabilirler (Kill ve ark., 2001; Yebra ve ark., 2006b).

### ***1.4.3 Denizel Çevrenin Antifouling Boyalara Etkisi***

Deniz suyu boyanın içine girmekte, biyositleri çözmekte ve diffüze (dışarıya yayılma) olmaktadır. Tuzluluk değerleri, tipik biyosidal pigment partiküllerinin çözülmesinde etkilidir. Sıcaklığın etkisi, çözünme oranları, taşınım süreçleri gibi tüm kimyasal olaylarda etkilidir.  $\text{Cu}_2\text{O}$  pigment partiküllerinin çözünüm oranlarında etkileri görülmüştür. Reçine temelli boyalarda pH'ın etkisi önemlidir, pH değerindeki artışla birlikte, reçinenin çözünürlüğünde de bir artış görülmektedir.

Çevreye salınan toksik maddeler, bu değişkenlerden etkilenmektedir. Bu gerçeklere karşın, yeni antifouling boyalar ve kaplamaların deniz suyu içindeki davranışları ile ilgili detaylı çalışmalar eksiktir (Yebra ve ark., 2004).

Antifouling boyaların dizayn prosedüründe; öncelikle modelde dikkat edilmesi gerekenler, boyanın kararlı ve dinamik koşullardaki davranışdır. Çalışmalarda, deniz suyunun ve gemi işletim parametrelerinin etkilerinin incelenmesidir. Seçilen deneylere bağlı olarak, standart laboratuvar testlerinden (abiyotik koşullar) sonra, doğal deniz suyunda boyanın davranışı araştırılmalı, antifouling boyanın uygulandığı yüzeyde, mikrobiyal tabakanın oluşumunun etkisi de çalışılmalıdır (Yebra ve ark., 2006b).

## **BÖLÜM İKİ**

### **MATERYAL VE METOD**

#### **2.1 Materyal**

##### ***2.1.1 Örnekleme Bölgeleri***

Limanlar ve yat limanları kompleks kıyusal alanlardır ve ekonomik aktiviteler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antifouling boyaların, denizde bakteriyal biyofilm oluşumu üzerine etkilerini incelemek amacıyla İzmir ilindeki iki farklı yat limanı örnekleme noktaları olarak tespit edilmiştir. Yat limanlarından bir tanesi, İzmir İç Körfezi'nde bulunan Levent Marina, diğeri ise Çeşme'de bulunan Çeşme Setur Marina'dır (Şekil 2.1 ve 2.2). İzmir Körfezi, Akdeniz basenindeki en büyük doğal körfezlerden biridir. Bölgedeki temel endüstri kolları; gıda, içecek, kağıt, boya, tekstil, yağ, deterjan metal işleme gibi alanlar olup, tankerlerin ve gemilerin yoğun şekilde faaliyet gösterdiği bir alandır (Küçüksezgin, Kontas, Altay, Uluturhan ve Darılmaz, 2006). Çeşme, oligotrofik deniz suyu özelliklerine sahip olup üç tarafından Ege Denizi ile çevrilidir. İzmir merkezden yaklaşık 80 km uzaklıktadır. Örnekleme, Aralık 2006 tarihinde başlanmıştır. İlk hafta örnekler günlük alınmış, daha sonra inceleme periyodu onbeşinci gün, birinci ay ve bundan sonra da aylık olarak devam etmiştir. Örnekleme 6 ay süresince devam etmiştir. Son örnekleme Haziran 2007 tarihinde yapılmıştır.



Şekil 2.1 Çeşme Setur Marina



Şekil 2.2 Levent Marina

### ***2.1.2 Kafes Sisteminin Hazırlanması***

Biyofilm gelişiminin izlenmesinde, yapay yüzey olarak sac plakalar (30x30x1cm ölçülerinde kare sac plakalar) içeren özel kafes sistemleri hazırlanmış ve her iki yat

limanına yerleştirilmiştir. Sistemler; Bernetsson ve Jonsson (2003), Valkirs, Seligman, Haslbeck ve Caso'nun (2003) ve Turetgen (2004)'in kullandığı yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışmada, DYO Boya Fabrikaları Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasına ait dört farklı deniz boyası ve bir de sadece antipas (antikoroziv) uygulanmış plakalar kullanılmıştır (Şekil 2.3 ve 2.4). Boyalar, toplam kalınlık 1,5mm olacak şekilde fırça ile uygulanmıştır. Plakalar yerleştirilmeden önce steril saf su ile yıkanmıştır.

Deniz Boyaları;

Formülasyon Kodu 269.2710: (temel bileşen; TBT ve bakır oksit)

Formülasyon Kodu 279.2710: (temel bileşen; triazin diamin ve bakır oksit %47, toplam katı madde %76-77, çözügen; ksilen %23-24).

Formülasyon Kodu 088.1154: (temel bileşen; çinko oksit ve bakır oksit %35, toplam katı madde %70-71, çözügen; toluen %29-30).

Formülasyon Kodu 088.1155: (temel bileşen; florlu reçine içeren silikon %30, toplam katı madde %67-70, çözügen; etil asetat %30-33).

Antipas: sentetik reçine temelli alkid ve antikoroziv pigmentleri içerir.



Şekil 2.3 Yapay yüzey olarak kullanılan plakaların görünüşü



Şekil 2.4 Plakaların yerleştirildiği kafesler

### 2.1.3 Mikrobiyolojik Analizler

#### 2.1.3.1 Kullanılan Besiyerleri

##### *Besiyeri 1 ZooBell Agar 2216e*

Pepton	5g
Yeast Ekstrakt	1g
FePO <sub>4</sub>	0,01g
Agar	15g
Distile Su	250ml
Deniz Suyu	750ml
pH:	7,2

Besiyeri içerikleri distile su ve deniz suyunda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basıç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri, toplam canlı bakteri sayımı ve izolasyonda kullanılmıştır (Kwon, Lee, Jung, Yim ve Lee, 2002; Lee ve ark., 2003)

*Besiyeri 2 R2A Agar*

Proteoz pepton	0,5g
Yeast ekstrakt	0,5g
Kazamino asit	0,5g
Glukoz	0,5g
Çözünür nişasta	0,5g
Sodyum pürivat	0,3g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05g
Agar	15g
Distile Su	500ml
Deniz Suyu	500ml
pH:	7,2

Besiyeri içerikleri distile su ve deniz suyunda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basıç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri, toplam canlı bakteri sayımı ve izolasyonda kullanılmıştır (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003).

*Besiyer 3 YMG Agar*

Glukoz	10g
Yeast ekstrakt	3g
Malt ekstrakt	3g
Pepton	5g
Agar	15g
Distile Su	500ml
Deniz Suyu	500ml
pH:	7,0

Besiyeri içerikleri distile su ve deniz suyunda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basıç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri, EPS üretiminde kullanılmıştır (Kwon ve ark., 2002).

*Besiyeri 4 ESP Ortamı*

Glukoz	1,7g
--------	------



NH <sub>4</sub> Cl	0,08g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,02g
NaCl	0,02g
MgSO <sub>4</sub>	0,012g
CaCl <sub>2</sub>	0,008g
FeSO <sub>4</sub>	0,004g
Pepton	2g
Agar	3g
Distile Su	100ml
Deniz suyu	100ml
pH:	6,8

Besiyeri içerikleri distile su ve deniz suyunda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C’de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri, EPS üretiminde kullanılmıştır (Ceyhan, 2008).

#### *Besiyeri 5 Farklı Şekerler İlaveli YMG Agar*

YMG agara (glukoz, sakkaroz laktoz ve maltoz) ilave edilerek distile su ve deniz suyunda çözüldükten sonra erlenlere dağıtılarak otoklavda 0,8 atmosfer basınç altında 115°C’de 10dk. Süre ile steril edilmiştir. Fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

#### *Besiyeri 6 Yarı Katı Zoobell Agar*

Zoobell Broth hazırlanıp %0,3 agar ilave edilerek distile suda çözüldükten sonra agarı çözmek için kaynatılmış ve test tüplerine dağıtılarak otoklavda 1,5atm. Basınç altında 121°C’de 15dk. süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra dik halde dondurulmuştur Bu besiyeri izolatların hareketliliklerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır.

#### *Besiyeri 7 Oksidasyon/Fermentasyon Medium*

Tripton	2g
Sodyum klorür	5g
Dipotasyum fosfat	0,3g
Brom timol mavisi	0,03 g
Agar	3g

Distile su	250ml
Deniz suyu	750ml
pH:	6,8

İçerik suda eritilip tüplere 5'er ml konularak 1,5atm basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiştir. Besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

#### *Besiyer 8 MacConkey Agar (Difco)*

MacConkey Agar'dan 50g/L alınıp deniz suyu ve distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atm basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutulularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılmasında kullanılmıştır.

#### *2.1.3.2 Kullanılan Bazı Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler*

Çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir (Tamer, Uçar, Ünver, Karaboz, Bursalıoğlu ve Oğultekin, 1989; Arda, 1997; Ceyhan, 2008).

*Çözelti 1:* Gram'ın kristal viyolete boyası. 20ml etanolde 2g kristal viyolete ve 80ml distile suda 0,8g amonyum oksalat çözülmüş ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyolete ilave edilmiştir. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır.

*Çözelti 2:* Gram iyodür çözeltisi. 1g iyot ve 2g potasyum iyodür havanda iyice ezilip karıştırılarak toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş 300ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Çözelti, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır.

*Çözelti 3:* Gram'ın safranin boyası. 0,25g safranin %95'lik etanolde (10ml) çözümlenip, 1000ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve sonra filtre kağıdından süzümüştür. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır.

*Çözelti 4:* %3'lük KOH çözeltisi, izolatların gram reaksiyonlarının tespitinde kullanılmıştır.

*Çözelti 5:* Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün %1'lik solüsyonu, izolatların oksidaz aktivitelerinin tespitinde kullanılmıştır.

*Çözelti 6:* %3'lük  $H_2O_2$  çözeltisi, izolatların katalaz aktivitesinin tayininde kullanılmıştır.

*Çözelti 7:* 1Molar HCl çözeltisi. %37'lik HCl'den 8,4ml alınarak distile suyla 100 ml hacime tamamlanarak hazırlanır. pH'nın ayarlanmasında kullanılmıştır

*Çözelti 8:* 1Normal NaOH çözeltisi. 4g NaOH, 100ml distile suda çözülerek hazırlanır. pH'nın ayarlanmasında kullanılmıştır

*Çözelti 9:* %95-97'lik Sülfirik asit. Ticari olarak satılan %95-97'lik saf sülfirik asit hazır olarak kullanılmıştır.

*Çözelti 10:* Tris-borik asit-EDTA Tamponu (TBE) (pH:8,0) Stok solüsyonu (5x/L): 54,0g Tris-base, 27,5g Borik asit, 2,92g EDTA; Çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu, DNA'ların saflık kontrolü ve PCR ürünlerinin elektroforezinde kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmıştır.

*Çözelti 11:* 10x yükleme boya solüsyonu: 7,5g Fikol 400, 0,125g Bromfenol mavisi, distile su ile 50ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon, elektroforezde jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır.

*Çözelti 12:* Etidyum bromür stok solüsyonu: 10mg etidyum bromür, 1ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Solüsyon, elektroforez için agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

*Çözelti 13:* Marker DNA'lar (Fermentas, O'GeneRuler 1 ve 1kb Plus). Ticari olarak sağlanan marker DNA'lar, genomik DNA'lar ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

*Çözelti 14:* Propan-2-ol (Smyras). EPS'lerin çöktelmelerinde kullanılmıştır.

*Çözelti 15:* 10-400 $\mu$ g/ml arasındaki Referans Şeker Solüsyonları, EPS'lerin şeker içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

*Çözelti 16:* Bradford Reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250 Reaktifi), standart olarak sığır serum albümini (BSA-Sigma), Bradford yöntemine göre EPS'lerin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılmışlardır.

*Çözelti 17:* %5'lik (w/v) Fenol çözeltisi, 0-200 $\mu$ g/ml'lik glukoz standart çözeltileri ve derişik  $H_2SO_4$  (Carlo Erba), toplam şeker tayininde kullanılmıştır.

*Çözelti 18:* Baryum hidroksit çözeltisi. 0,5g Ba(OH)<sub>2</sub> distile suda çözülmüştür. EPS içeriğindeki şekerlerin tespiti sırasında nötralizasyonda kullanılmıştır.

*Çözelti 19:* Diklormetan-metanol-distile su (61:32:7). Bu solüsyon, EPS'lerin hidroliz testlerinde indirgenmiş şekerlerin ölçümünde kullanılmıştır.

*Çözelti 20:* Bütanol-asetik asit-distile su (4:1:5). Bu solüsyon, EPS'lerin hidroliz testlerinde indirgenmiş şekerlerin ölçümünde kullanılmıştır.

*Çözelti 21:* Mangan sülfat çözeltisi 480g MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek 1l'ye tamamlanır. Oksijen tayininde kullanılmıştır

*Çözelti 22:* Alkali İyodür 500g NaOH ve 135g NaI distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanır. Oksijen tayininde kullanılmıştır

*Çözelti 23:* Sodyum tiosülfat 24,82g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5 H<sub>2</sub>O kaynatılmış ve soğutulmuş distile suda çözülerek 1L'ye tamamlanır. Bu çözeltinin litresine 5ml kloroform veya 1g sodyum hidroksit ilave edilerek korunur. Bu hazırlanan 0,1N stok çözülden 250ml alınarak 1L'ye tamamlanır ve titrasyon için 0,025N çözelti elde edilmiş olunur. Bu çözeltinin 1ml'si 0,2mg çözülmüş oksijene eş değerdir. Oksijen tayininde kullanılmıştır.

### 2.1.3.3 Kullanılan Test Kitleri

İzolatların ileri tanılamalarında, gram negatif bakteriler için spesifik API 20E ve API 20NE biyokimyasal ticari test kitleri (Biomérieux, France) kullanılmıştır.

#### **API 20E Test Kiti**

Kit İçeriği;

- API 20E stripi
- İnkübasyon kutusu
- Sonuç tablosu
- Ampul içerisinde NaCl %0,85 süspansiyon ortamı (5ml)
- Mineral yağdan oluşmaktadır.

Tablo 2.1 API 20E test kiti ayıraçlar, ortamlar ve içerikleri

<b>Ayıraçlar, Ortamlar</b>	<b>İçerikleri</b>	
%0.85'lik NaCl (5ml)	Sodyum klorür	8,5g
	Distile su	1000ml
TDA ayıracağı (5ml)	Demir klorür	3,4g
	Distile su	100ml
JAMES Ayıracağı (5ml)	Bileşik J2183 (patentli)	0,5g
	HCl	100ml
VP1 ayıracağı (5ml)	Potasyum hidroksit	6g
	Distile su	100ml
VP 2 ayıracağı (5ml)	$\alpha$ -naftol	6g
	Etanol	100ml
NIT 1 ayıracağı (5ml)	Sülfanilik asit	0,4g
	Asetik asit	30g
	Distile su	70 ml
NIT 2 ayıracağı (5ml)	N,N-dimetil-1-naftilamin	0,6g
	Asetik asit	30g
	Distile su	70ml
Zn ayıracağı	Çinko tozu	10gr

Tüm API içerikleri 2-8C°'de buzdolabında ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir. API 20E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 API 20E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları

TEST	SUBSTRAT	REAKSİYON/ ENZİMLER	SONUÇ	
			NEGATİF	POZİTİF
ONPG	Orto-nitro-fenil- $\beta$ -D-gal-actopiranosit	$\beta$ -galaktosidaz	Renksiz	Sarı
<u>ADH</u>	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı/Turuncu
<u>LDC</u>	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/Turuncu
<u>ODC</u>	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/Turuncu
<u> CIT </u>	Sodyum sitrat	Sitrat kullanımı	Soluk yeşil/Sarı	Mavi-yeşil/Mavi
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Sodyum tiyosülfat	H <sub>2</sub> S üretimi	Renksiz/ Grimsi	Siyah tortu şeklinde ince hat
<u>URE</u>	Üre	Üreaz	Sarı	Kırmızı/Turuncu
TDA	Triptofan	Triptofan deaminaz	Sarı	Kırmızımsı kahverengi
IND	Triptofan	İndol üretimi	JAMES	
			Renksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u> VP </u>	Kreatin Sodyum piruvat	Asetoin üretimi	VP1+VP2/10dk.	
			Renksiz	Pembe/Kırmızı
<u> GEL </u>	Kohn'un jelatini	Jelatinaz	Tamamen siyah rengin oluşmaması (Kısmi siyahlaşma)	Yaygın siyah pigment oluşumu

GLU	Glukoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/Grimsi sarı
MAN	Mannitol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
INO	İnositol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SOR	Sorbitol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
RHA	Ramnoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SAC	Sükroz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
MEL	Mellibiyoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
AMY	Amigdalın	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
ARA	Arabinoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
OX	Filtre kağıdı üzerinde	Sitokrom-oksidadaz	OX/1-2dk.	
			Renksiz	Menekşe moru
NO <sub>3</sub> - NO <sub>2</sub>	GLU kuyucuğu	NO <sub>2</sub> üretimi	NIT1+NIT2/2-3dk.	
			Sarı	Kırmızı
		N <sub>2</sub> 'ye indirgeme	Zn/5dk.	
			Kırmızı	Sarı

Tablo 2.2 devamı

**API 20 NE Test Kiti**

Kit İçeriği;

- API 20NE stripi
- İnkübasyon kutusu
- Ampul içerisinde AUX Medium
- Sonuç tablosu
- Mineral yağdan oluşmaktadır.

*AUX Medium*

Amonyum sülfat	2g
Mineral baz	82,8g
Amino asitler	250mg
Vitaminler ve besinsel substratlar	35,9mg
Agar	1,5g
Fosfat tamponu (pH:7,1)	1000ml

Tüm API içerikleri 2-8°C’de buzdolabında ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.3 API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları

TEST	SUBSTRAT	REAKSİYON/ ENZİMLER	SONUÇ	
			NEGATİF	POZİTİF
NO <sub>3</sub> -	Potasyum nitrat	Nitratların nitritlere indirgenmesi	NIT1+NIT2/2-3dk.	
			Renksiz	Pembe-Kırmızı
		Nitratların N <sub>2</sub> 'ye indirgenmesi	Zn/5 dk.	
			Pembe	Renksiz
TRP	Triptofan	İndol üretimi	JAMES	
			SarıRenksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u>GLU</u>	Glukoz	Asidifikasyon	Maviden yeşile	Sarı
<u>ADH</u>	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Turuncu/Pembe/Kırmızı
<u>URE</u>	Üre	Üreaz	Sarı	Turuncu/Pembe/Kırmızı
ESC	Eskulin	Hidroliz (β-glukosidaz)	Sarı	Gri/Kahverengi/Siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (proteaz)	Yaygın olmayan siyah pigment	Yaygın siyah pigment
PNPG	p-nitro-fenil-β-D-galactopiranosit	β-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
<u>GLU</u> <sub>1</sub>	Glukoz	Asimilasyon	JAMES	
			Renksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u>ARA</u> <sub>1</sub>	Arabinoz	Asimilasyon	VP1+VP2/10dk.	
			Renksiz	Pembe/Kırmızı
<u>MNE</u> <sub>1</sub>	Mannoz	Asimilasyon	Tamamen siyah rengin oluşmaması (Kısmi siyahlaşma)	Yaygın siyah pigment oluşumu
<u>MAN</u> <sub>1</sub>	Mannitol	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/Grimsi sarı
<u>NAG</u> <sub>1</sub>	N-asetil-glukozamin	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>MAL</u> <sub>1</sub>	Maltoz	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>IGNT</u>	Glukonat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>ICAP</u> <sub>1</sub>	Kapatrat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>ADI</u> <sub>1</sub>	Adipat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>MLT</u> <sub>1</sub>	Malat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>ICIT</u> <sub>1</sub>	Sitrat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>IPAC</u> <sub>1</sub>	Penil-asetat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
OX	Tetrametil-p-fenilen daimin üzerinde	Sitokrom-oksidad	OX/1-2dk.	
			Renksiz	Menekşe moru

### **ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti (Zymo Research)**

Kit İçeriği;

- Fungal/Bakteriyal DNA Bağlayıcı Solüsyonu
- DNA Ön-yıkama Solüsyonu
- Fungal/Bakteriyal DNA Yıkama Solüsyonu
- DNA Elusyon Solüsyonu
- ZR BashingBead Liziz Tüpleri
- Zymo-Spin IV Spin Filtreleri
- Zymo-Spin IIC Kolonları
- Toplama tüpleri

Tüm kit içerikleri 20-25°C’de oda sıcaklığında ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

### **FastStart Taq DNA Polymeraz, dNTPack Kiti (Roche, Germany)**

Kit İçeriği;

- FastStart Taq DNA polimeraz (5U/μl)
- PCR reaksiyon tamponu, 10x, (20mM MgCl<sub>2</sub>’lü)
- GC-RICH solüsyonu, 5x
- PCR Grade nükleotid karışımı( dNTP karışımı)

Tüm kit içerikleri -20°C’de ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

### **Kullanılan Başlıca Cihazlar**

- Santrifüj (Sigma 2-15)
- Mikrosantrifüj (Sigma Sartorius 15.000g)
- Spektrofotometre (Varian 300)
- Orbital Çalkalayıcı İnkübatör (G24 New Brunswick)
- Güç Kaynağı (1500 V) (Consort EV 265)
- PCR Cihazı (GeneAmp PCR system 9700)
- U. V. Translüminatör (254nm)
- Liyofilizasyon Cihazı (Edwards)
- Mikroskop (Olympus)
- Otoklav (Hirayama)
- Florometre (Sequoia-Turner)



## 2.2 Metod

### 2.2.1 Çevresel Değişkenlerin Ölçülmesi (Fiziko-Kimyasal Analizler)

Çalışma noktalarında, öncelikle WTW pH/Cond 304i/Set. isimli alet yardımıyla, deniz suyunun sıcaklık, tuzluluk ve pH gibi fiziko-kimyasal özellikleri tespit edilmiş, aynı zamanda çözünmüş oksijen değerleri Winkler metoduyla saptanmıştır (Aydın ve Küçüksezgin, 2006).

### 2.2.2 Besin Elementleri Analizleri

Örnekleme süresince ortamdaki besin elementleri (TNO<sub>x</sub>-N (NO<sub>3</sub>-N+N<sub>02</sub>-N), NH<sub>4</sub>-N, T-PO<sub>4</sub>-P, o.PO<sub>4</sub>-P) değerleri ve klorofil a miktarının saptanması için 5L'lik plastik şişelere alınan su örnekleri, laboratuvarında 47mm'lik GF/F filtreden (Sartorius) süzülmüş, süzülen su örnekleri 100ml'lik şişelere alınarak analiz edilinceye kadar saklanmak amacıyla dondurulmuştur. Besin elementleri analizlerinde Grasshoff, Ehrhardt ve Kremling (1983)'in kullandığı kolorimetrikyöntemler kullanılmıştır. Klorofil a florometrede, besin elementleri ise spektrofotometre ve otoanalizörde ölçülmüştür (Kucuksezgin, Kontas, Altay ve Uluturhan, 2005).

### 2.2.3 Biyofilm Bakterilerinin İzolasyonu

Her iki yat limanında, Aralık 2006 tarihinde başlayan örneklemelemlerde, ilk hafta günlük örnekleme yapılmıştır. Kafes sistemine yerleştirilen plakalardan her gün 1cm<sup>2</sup>'lik alan steril swap ile taranmış ve daha sonraki aşamalarda spatül ile kazıma yapılmış ve 20ml steril deniz suyu bulunan 50ml'lik plastik falkon tüplerine aktarılmıştır. Örnekler buz kutusunda 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Bakterilerin izolasyonu ve sayım işlemleri için öncelikle falkon tüpleri 5dk süre ile vorteks ile karıştırılmış ve örneklerin 10<sup>-7</sup>'ye kadar seyreltme serileri hazırlanmıştır (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003; Tang ve Cooney, 1998). İzolasyon işlemi ve toplam canlı bakteri (aerobik, heterotrofik, mezofilik) sayımı için "Yayma Plak"

(Her bir seyreltmeden 0,1ml örnek besiyeri üzerine dökülerek steril bir L-baget yardımıyla homojen olarak dağıtılmış) yöntemi uygulanmıştır. Örneklerden iki tekrarlı ekimler yapılmıştır (Brock ve Madigan, 1994). İzolasyon ve sayım işlemleri için besin ortamları olarak ZooBell Agar 2216e ve R2A Agar kullanılmıştır. İzolasyon ve sayım işlemleri için petri kapları 26°C’de, 72 saat süresince inkübasyona bırakılmış ve 3. günün sonunda toplam canlı (aerobik, heterotrofik, mezofilik) bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemleri için ise, biyofilm yapısını oluşturduğu düşünülen cıvık, yapışkanimsı, farklı özellikler gösteren koloniler seçilmiş, bunlar tekrar çizgi ekim yapılarak saflaştırılmış ve yatık kültür ortamına (ZooBell Agar 2216e) aktarılmıştır. Yatık kültürler, 26°C’de 72 saat inkübe edilerek stok kültür olarak +4°C’de muhafaza edilmiştir. İzolatlar, stok olarak saklanmak amacıyla buzdolabına kaldırılmıştır (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003; Tang ve Cooney, 1998).

#### **2.2.4 Bakteriyal İzolatların Tanılanması**

##### *2.2.4.1 Kültürel Özellikler*

İzolatlar Zoobell Agar’a ekilerek 26°C’de, 24 saatlik inkübasyonlarından sonra oluşan koloniler görünüş, renk, pigmentasyon bakımından incelenmişlerdir.

##### *2.2.4.2 Mikroskopik Testler*

26°C’de, 24 saat inkübasyondan sonra Zoobell’deki kültürlerin hem gram boyama ve hem de KOH testi ile gram reaksiyonlarına bakılmış ve bakteri görünüşleri incelenmiştir.

##### *2.2.4.3 Biyokimyasal Testler*

İzolatların ön biyokimyasal tanılamalarında “Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology” (Krieg ve Holt, 1984) esas alınmıştır. Buna göre katalaz, oksidaz,

hareketlilik, Oksidasyon/Fermentasyon testleri, oksijen istekleri, Mac Conkey Agar'da üremeleri incelenmiştir.

*2.2.4.3.1 KOH Testi.* Gram Boyama testini desteklemek amacıyla yapılan bu denemede, temiz bir lamın üzerine 1 damla %3'lük KOH çözeltisi damlatılarak üzerine 26°C'de 24 saat Zobell'de büyütülmüş izolatlardan bir öze dolusu konulmuş ve bir cam çubukla karıştırılmıştır. Süspansiyondan cam çubuğu çekince bir uzama söz konusu ise, izolatın gram (-) olduğu kabul edilmiştir (Ceyhan, 2008).

*2.2.4.3.2 Oksidaz Testi.* Bir parça filtre kağıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün (Sigma Chemical co.) %1'lik solüsyonunun bir kaç damlası ile ıslatılmış ve bu solüsyon kullanılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır. 24 saatlik Zoobell Agar kültüründen bir öze dolusu organizma, platin bir öze ile alınmış (sıradan telden yapılmış özeler yanlış sonuçlara neden olabilir) ve filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu test için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

*2.2.4.3.3 Katalaz Testi.* Yatık Zoobell Agar'da 26°C'de 72 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3'lük 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Tamer ve ark. 1989).

*2.2.4.3.4 Hareketliliğin Saptanması.* %0,3 agar içeren ve dik olarak hazırlanmış yarı katı Zoobell agar'lara izolatlar dik şekilde ekim yapılmış ve 26°C'de her gün incelenerek 72 saat inkübe edilmiştir. Büyüme esnasında, hareketli bakteriler inokülasyon hattından kenarlara doğru göç etmiştir (Tamer ve ark. 1989).

*2.2.4.3.5 Oksidasyon/Fermentasyon Testi.* %1 glukoz ve brom kresol purple içeren O/F ortamları çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için birkaç dakika kaynatılmış ve tüpler çabucak soğutulmuştur. İğneyle dik ekim yapıldıktan sonra üzerlerine 10mm kalınlığında steril parafin dökülmüştür. Başka bir tüpe ise steril parafin konulmamış ve aerobik kalması sağlanmıştır. Aynı şekilde glukoz içermeyen benzer

ortam inoküle edilmiş ve başka bir tüpte inokülesiz glukoz içeren kontrol ortamı olarak 26°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Sadece aerobik tüpte asitleşme var ise organizma oksidasyon yolu ile glukozu katabolize etmiş oksidasyon yapma kabiliyetinde ve ‘O’ reaksiyon oluşturmuştur. Hem aerobik hem de anaerobik türlerde asitleşme var ise organizma fermentasyon yapma kabiliyetinde ve ‘F’ reaksiyon oluşturmuştur. Eğer iki tüpte de asitleşme yok ise organizma glukozu fermente edememiştir (Ceyhan, 2008).

*2.2.4.3.6 Oksijen İsteğinin Belirlenmesi.* Bu amaçla içerisinde yüksek Zoobell Agar bulunan tüpler eritilmiş içindeki çözülmüş oksijenin çıkması için tüpler 100C°’de 10dk bekletilmiştir. Sonra tüpler yaklaşık 40-45°C’ye kadar soğutulmuş her birine daha önceden Zoobell Agar’da büyütülmüş (26°C’de, 24 saat) izolatlardan ekim yapılmıştır. Ekim yapılan mikroorganizmaların agara homojen dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Çalkalama sırasında hava girmemesi için hızlı sallamadan kaçınılmıştır. Ekim yapılan tüplerin oda sıcaklığında katılaşmaları için bekletildikten sonra 26C°’de 48 saat inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda izolatların üremeleri agarı fazlalaştırılmış katı besiyerinde genellikle üst kısmında ise aerop, her tarafta ise fakültatif anaerop, sadece dip kısımda ise anaerop olarak adlandırılmışlardır (Arda, 1997).

*2.2.4.3.7 MacConkey Agarda Üreme.* 26°C’de 24 saat Zoobell agarda büyütülmüş kültürlerden MacConkey agar içeren petrilere çizgi ekim yapılmış ve petrilere 26C°’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere her bir izolat için üreme varlığına bakılmıştır. Bunun yanında laktozu fermente eden gram (-)’lerin fermente edemeyenlerden ayırımını anlamak için pembeleşmenin olup olmadığına bakılmıştır. Besiyerinin kırmızı olan orjinal renginden pembeye doğru renk değişimi var ise laktoz fermentasyonu pozitif olarak kabul edilmiştir (Ceyhan, 2008).

Kültürel özelliklerin incelenmesinden sonra izolatlara API Biyokimyasal test kitleri uygulanmıştır.

2.2.4.3.8 *API 20E Tanılama Testi.* API 20E kiti, gram negatif bakterilerin biyokimyasal tanılması amacıyla kullanılmaktadır. İzolatların API 20E ile tanılması için, ZooBell agar'a ekilerek aktifleşmeleri sağlanmıştır. %0,85 NaCl süspansiyon ortamı ampulleri dikkatli bir şekilde açılarak 0,5 McFarland bulanıklığında homojen bakteri seyreltileri hazırlanmıştır. API test mikrotüplerinin (kuyucuklarının) sadece tüp kısımlarına içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde steril uçlu mikropipet kullanılarak inokülasyon yapılmıştır. ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin üst kısımları konveks şeklinde mineral yağ ile örtülmüştür.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. İzolat numaraları inkübasyon kutularına yazılarak karışmaları önlenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda striplere TDA testi için TDA, IND testi için JAMES, VP testi için VP1 ve VP2, NIT testi için NIT1 ve NIT2 ayıraçlarından her bir izolat için birer damla damlatılarak 10dk beklenmiş ve gelişen bütün reaksiyonlar Tablo 2.2'ye göre okunmuştur. Sonuçlar kitlerle beraber verilen sonuç tablolarına kaydedilmiştir (Şekil 2.5).

The image shows the API 20E test kit result table. It includes a header with the API 20E logo, a CE mark, and a reference field. Below the header is a grid of 24 test wells, each with a number (1, 2, or 4) and a test name. The tests are: ONPG, ADH, LDC, ODC, LCT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, IND, LVPJ, IGELJ, GLU, MAN, IND, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, OX, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, MOB, McC, OF-0, and OF-F. Below the grid are two boxes for additional tests and identification.

Test	1	2	4
ONPG			
ADH			
LDC			
ODC			
LCT			
H <sub>2</sub> S			
URE			
TDA			
IND			
LVPJ			
IGELJ			
GLU			
MAN			
IND			
SOR			
RHA			
SAC			
MEL			
AMY			
ARA			
OX			
NO <sub>2</sub>			
N <sub>2</sub>			
MOB			
McC			
OF-0			
OF-F			

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Şekil 2.5 API 20E'ye ait boş sonuç tablosu

2.2.4.3.9 *API 20NE Tanılama Testi.* İzolatların API 20NE ile tanılmasında, API 20E'de belirtildiği gibi 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış bakteri

seyreltmelerinden NO<sub>3</sub>'den PNPG testine kadar mikrotüpler steril uçlu mikropipet yardımıyla doldurulmuştur. Daha sonra, seyreltmelerden 200µl alınarak AUX Medium ampullerinin içlerine aktarılmış, iyice homojenize edilmiştir. [GLU]'dan [PAC] testine kadar mikrotüpler bu karışım ile doldurulmuştur. Fakat GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin üst kısımları konveks şekilde mineral yağ ile örtülmüştür. Stripler inkübasyon tablalarına yerleştirildikten sonra 30C°'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda striplere TRP testi için JAMES, NO<sub>3</sub> testi için NIT1 ve NIT2 ayıraçlarından her bir izolat için birer damla damlatılarak 10dk beklenmiş ve gelişen bütün reaksiyonlar Tablo 2.3'e göre okunmuştur. Sonuçlar, sonuç tablolarına kaydedilmiştir (Şekil 2.6).

The diagram shows the API 20NE test kit result table. It features a grid of wells for 24h and 48h incubation times. The tests are arranged in three rows of three columns each. The first row contains NO<sub>3</sub>, TRP, and GLU. The second row contains ADH, URE, and ESC. The third row contains GEL, PNG, LGLU, LARA, LMNE, LMAN, LNAG, LMAL, LGNT, LCAP, LADJ, LMLT, LCIT, LPAC, and OX. Each well is labeled with a number (1, 2, or 4) indicating the test result. The table also includes fields for 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / OTRAS pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy' and 'Ident. / Ταυτοποίηση'.

Şekil 2.6 API 20NE'ye ait boş sonuç tablosu

Hem API 20E hem de API 20NE test kiti için tanılamada tür tayini, elde edilen sonuçların analitik profil indeksiyle karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır. Analitik profilde bütün reaksiyon şekilleri sayısal olarak kodlanmış olmalıdır. Sonuç tablolarında testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmışlar ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayıları ile gösterilmişlerdir. Gruptaki reaksiyonların hepsinin pozitif çıkması 7-dijit profil numarasını göstermektedir. Sonuçlar API web programı aracılığı ile alınmıştır.

#### 2.2.4.4 Moleküler Tanılama

Biyokimyasal testleri yapılan türler, moleküler tanılama için analiz edilmeye başlanmıştır. Bunun için öncelikle DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunda kit kullanılmıştır.

2.2.4.4.1 *DNA İzolasyonu.* Mikroskopik ve biyokimyasal tanılamaları yapılan izolatlardan PCR tiplendirmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İşlemler ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti kullanılarak aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

1. Uygun şeker ilaveli ZooBell agar'da üretilen 24-48 saatlik kültürlerden alınan yaklaşık  $10^9$  adet bakteriyal hücre 1,5ml'lik ependorf tüpündeki 200µl bidistile su içerisinde dikkatlice karıştırılmıştır. Elde edilen hücre solüsyonunun tümü BashingBead liziz tüpüne aktarılmıştır.

2. BashingBead liziz tüpü bir vorteks ile 5dk boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.

3. Daha sonra 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

4. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400µl, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo-Spin IV spin filtre'ye aktarılmış, ardından hemen 7.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

5. Toplama tüpündeki biriken filtrat üzere 1200µl Fungal/bakteriyal bağlama tamponu ilave edilmiştir.

6. Bu aşamadan elde edilen karışımdan 800µl alınarak yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

7. Sonra "6" nolu basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır.

8. 200µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

9. 500µl Fungal/bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

10. Zymo-Spin IIC kolonu 1,5ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve 100µl DNA elüsyon tamponu direkt olarak kolon içerisinde orta kısmındaki matrise ilave edilmiştir. Daha sonra 10.000xg'de 30sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası ependorf içerisinde DNA elde edilmiştir.

2.2.4.4.2 *DNA'ların Saflık Kontrolü.* İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar, bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezde kontrol edildikten sonra, saflık

kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapılmıştır (Ausubel, Brent ve Kingston, 1997; Dale ve Schantz, 2002).

Agaroz jel elektroforezi, 5µg/ml etidyum bromürlü %0,8 agaroz (Sigma) içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1xTBE tamponu kullanılmış, 5µl DNA solüsyonu, 3µl yükleme boya solüsyonu ile karıştırılarak 80V'da 45dk süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde, markır olarak Fermentas DNA ladder (1,5kb'lık) kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Ausubel ve ark., 1997). Ayrıca spektrofotometrede de genomik DNA'nın kalitesi ve miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla 10µl DNA+990µl bidistile su, temiz kuvars küvetlerde iyice karıştırılarak bidistile suya karşı okunmuştur. Çıkan değer µg/ml olarak DNA miktarını vermektedir. Aynı zamanda spektrofotometre ile 260 ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin oranı da belirlenmiştir. PCR için uygun kalitede DNA'lara ait  $A_{260}/A_{280}$  değeri 1,80 civarında olmalıdır (Dale ve Schantz, 2002).

2.2.4.4.3 PCR. DNA amplifikasyonu, FastStart Taq DNA Polimeraz dNTPack kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisindeki bileşiklerin yanısıra 16S rDNA'ya spesifik universal primerler (Primer 27F ve Primer 1522R (Lee ve ark., 2003) ve kalıp DNA ilave edilmiştir (Tablo 2.4).

<b>Primer</b>	<b>Nükleotid Sırası</b>
<b>27F (Forward)</b>	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
<b>1522R (Reverse)</b>	5'- AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3'

Toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde, 0,2ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne aşağıdaki bileşenler sırasıyla konulmuştur.



Tablo 2.4 PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

<b>Bileşik</b>	<b>Miktar</b>
Bidistile su	DNA miktarına bağlı olarak her bakteri için değişebilen miktarda
PCR reaksiyon tamponu	5µl
GC-RICH solüsyonu	10µl
PCR Grade Nukleotid karışımı	1µl
Primer 27F	5µl
Primer 1522R	5µl
FastStart Taq DNA polimeraz	0,4µl
Kalıp DNA	Değişen miktarlarda (200-500ng DNA)

DNA'nın amplifikasyonu programlanabilir bir PCR cihazında (GeneAmp PCR system 9700), FastStart Taq DNA Polimeraz dNTPack kiti (Roche) ve Lee ve ark. (2003) tarafından belirtilen koşulların aşağıdaki gibi modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. PCR koşullarının belirlenmesi için öncelikle bağlanma sıcaklığı saptanmıştır. Her primerin bağlanma sıcaklığı  $T_m$  (erime sıcaklığı) değerinden 4-5 °C aşağısı olarak hesaplanmaktadır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5 Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları

<b>İşlem</b>	<b>Döngü</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
İlk denatürasyon/ Aktivasyon	1	5dk.	95C°
Denatürasyon (ayırılma)	30	55sn.	95C°
Annealing (bağlanma)		40sn.	52C°
Elongasyon (uzama)		1,5dk.	72C°
Son uzama	1	7dk.	72C°
Soğutma	-	Sınırsız	4C°

**2.2.4.4.4 PCR Ürünlerinin Elektroforezi.** PCR ürünlerinin elektroforezi, %1'lik agaroz jelde, 1xTBE tampon olarak kullanılarak 80V'da 1,5 saat boyunca

sürdürülmüştür. 9µl PCR ürünü ve 6µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işlemide örneklerle beraber DNA markırıda (Fermentas DNA ladder 1,5kb) jelde yürütülmüştür. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 15µl (10mg/ml) etidyum bromür ilave edilmiştir (Ausubel ve ark., 1997; Rickwood ve Hames, 1982).

PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Temiz bir erlen içerisine 100ml 1xTBE konulur ve 1g agaroz tartılarak 1xTBE içerisine eklenmiştir.

2. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşmıca kadar ısıtılarak, agarozun erimesi ve homojenizasyonu sağlanmıştır.

3. Agaroz jel, 45-50°C'ye kadar soğutulmuştur.

4. Jel soğurken temiz elektroforez küvetinin açık uçları otoklav bandı ile kapatılmıştır.

5. 50°C'ye kadar soğutulmuş olan agaroz jelin içerisine belirtilen miktarda etidyum bromür ilave edilmiştir.

6. Elektroforez küvetine taraklar uygun şekilde yerleştirilmiş ve jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde, yaklaşık 1mm kalınlıkta dökülmüştür.

7. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45dk bekletilerek donduktan sonra bantlar dikkatlice çıkarılmıştır.

8. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jelin yüzeyini 1-2mm kaplayacak biçimde 1xTBE ilave edilmiş ve ardından taraklar çıkarılmıştır.

9. PCR ürünleri ve markır DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılmıştır.

10. 1,5 saat sonra elektroforez sonlandırılmış ve jel dikkatlice küvetten alınmıştır.

11. U.V. translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek poloroid bir kamera ile jelin fotoğrafı çekilmiştir.

PCR ürünleri daha sonra sekans analizi için kullanılmıştır.

2.2.4.4.5 *PCR Ürünlerinin Nükleotid Dizisinin Belirlenmesi.* Nükleotid dizisi, Refgen Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi tarafından belirlenmiştir.

*2.2.4.4.6 Nükleotid Dizisi ile Tür Tayininin Yapılması.* Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi tarafından her bir izolat için belirlenen 16S rDNA nükleotid dizileri, BioEdit programı kullanılarak değerlendirilip, uygun forma getirildikten sonra Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış, en uygun olanlar seçilerek Clustal W programıyla (1,81 versiyonu) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) referans diziler indirilmiş ve tanılanan diziler ile karşılaştırılmıştır. MEGA 4 programı kullanılarak, "Neighbor-joining" metoduyla (1,400 replikant) türlerin filogenetik ağacı yapılandırılmıştır (Altschul ve ark., 1997; Birgul, Ozcengiz, Coleri ve Cokmus, 2007; Tamura, Dudley, Nei, ve Kumar, 2007). Daha sonra bu izolatların her biri için 16S rDNA dizileri kullanılarak, gen bankasından NCBI (BLAST) bir giriş kodu alınarak uluslararası gen bankasında ülkemizde araştırılan türler olarak kayıtları yapılmıştır.

## **2.2.5 EPS Analizleri**

### *2.2.5.1 İzolatların Hücre Kuru Ağırlıklarının Tayini*

EPS verimini saptamak amacıyla fermentasyon sonucu fermentasyon sıvısının akışmazlığına göre kültür 4°C'de 10.000 veya 40.000xg'de santrifüj edilmiş süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipteki kısmın darası alınmış bir kaba konulmuş ve 1-2ml distile su ile santrifüj tüpünde kalan miktar alınmıştır. Daha sonra liyofilize edilmiş ve dara çıkarıldıktan sonra g/l olarak miktar hesaplanmıştır (Ceyhan, 2008; Gerhardt ve Drew, 1994).

### *2.2.5.2 EPS Ekstraksiyonu*

Fermentasyon sonucunda, fermentasyon sıvısı kültür akışmazlığına göre 10.000xg'de 4°C'de 15dk süre ile santrifüj edilmiştir. Süpernatant, 3 hacim propan-2-ol ile çöktürülerek 4°C'de 24 saat bekletildikten sonra çökelti 10.000xg'de toplanmış, liyofilize edilerek kurutulmuştur (Kwon ve ark., 2002).

### 2.2.5.3 EPS Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Fermentasyon sonucu kültür 4°C’de 10.000 veya 40.000xg’de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve propan-2-ol ile çökeltildikten sonra 4C<sup>o</sup>’de 24 saat tutulmuştur. Çökelti 5,000xg’de 10dk santrifüjle toplanarak (santrifüj tüpü içinde) 20 ml distile su ile çözülmüştür. Örneğin direkt olarak darası alınmış kap içinde liyofilize edilmiş ve sonuç g/l olarak hesaplanmıştır (Kwon ve ark., 2002).

### 2.2.5.4 EPS Verimi Katsayısının Saptanması

EPS verimi, Gerhardt ve Drew (1994)’ün belirttiği spesifik ürün verimi katsayısı formülüne göre hesaplanmıştır. Bu formüle göre:

$$\text{EPS Verimi (Yp/x)} = \frac{\text{Üretilen ürün (EPS) (g)}}{\text{Hücre (g)}}$$

### 2.2.5.5 EPS’lerin Toplam Şeker Analizleri

Toz haldeki EPS materyallerinin toplam şeker miktarlarının belirlenmesi amacıyla reaktif olarak %5 (w/v) suda fenol solüsyonu ve derişik sülfirik asit kullanılmıştır. Dubois, Gilles, Hamilton Rebers ve Smith’e (1956) göre, 0-100µg aralıklarda glukoz içeren 1ml’lik örnekler, 5 adet test tüpüne pipetlenmiştir. Ayrıca başka bir test tüpüne distile su koyulmuştur. Tüm tüplere, 1ml %5’lik fenol solüsyonu ilave edilip daha sonra 5ml derişik sülfirik asit eklendikten sonra karıştırılmıştır. 10dk beklemenin ardından tekrar karıştırılmıştır. Sonuçlar alınmadan önce tüpler, 25-30C<sup>o</sup>’lik bir su banyosunda, 10-20dk süre ile bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 490nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. 0-100µg aralıklarda glukoz içeren örneklerin 490nm dalga boyundaki absorbans değerleri standart grafik olarak belirtilmiştir.

### 2.2.5.6 EPS'lerin Toplam Protein Analizi

Protein miktarları, standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılarak, Bradford yöntemine göre saptanmıştır. Yöntem, organik boyaların asidik ve bazik gruplarıyla renk oluşturmasını esas alır. Boya bağlamaya dayalı yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen, Coomassie Brilliant Blue G-20 (100mg)'nun, 50ml %95'lik etanolde çözülmesine dayanmaktadır. Bu çözeltiye, 100ml %85 (w/v) fosforik asit ilave edilmiştir. Son hacim, 1L'ye tamamlanmıştır (Bradford, 1976).

### 2.2.5.7 EPS'lerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Şeker İçeriklerinin Belirlenmesi

İzolatların şeker içeriklerinin belirlenmesi amacıyla, ince tabaka kromatografisi uygulanmıştır (TLC). Örnekler Staneck ve Roberts (1974) ve Kwon ve ark., (2002)'nin yöntemleri modifiye edilerek hazırlanmıştır. Polisakkarit örnekleri (50mg), 4ml of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiş ve 100C<sup>o</sup>de 2 saat süresince hidroliz edilmiştir. Daha sonra, nötralizasyonu sağlamak için doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> çözeltisi pH:5-6 oluncaya kadar eklenmiştir. pH ayarlandıktan sonra, örnekler santrifüj edilmiş (17.000g, 4C<sup>o</sup>, 10dk.) ve supernatant 0,22µm membran filtereden geçirildikten sonra evaporatörde sıvı fazı uçurulmuştur. Şekerler 1ml distile suda çözüldükten sonra TLC silika jel (Merck 60 F254) kağıtlara yüklenmiştir. Çözgen olarak diklormetan-metanol-distile su (61:32:7) ve bütanol-asetik asit-distile su (4:1:5) uygulanmıştır. Şeker standartları olarak ise; sakkaroz, laktoz, glukoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, arabinoz, ramnoz, riboz kullanılmıştır.

### 2.2.6 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Testi

Minimum inhibisyon konsantrasyonu testinde, Zgoda ve Porter (2001)'in metodunun modifiye edilmiş hali uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan antifouling boyalar, DYO Boya Fabrikaları Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasından temin edilmiştir. Uygulanan 4 farklı boyadan 269.2710 kodlu, kalay oksit ve bakır oksit karışımli

zehirli boya, IMO tarafından uygulanmasının yasaklanması nedeniyle firmadan temin edilememiştir. Diğer 3 farklı boyanın ve bir de antipasın izolatlar üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Bunun için, bakterilerin 24 saatlik kültürleri ve boyaların ise 1/2 den başlayan 1/1024 kadar olan seyreltme serileri hazırlanmıştır. Toplam hacim 200µl olacak şekilde bakteri kültürü, bakterilerin büyüme ortamı ve farklı boya konsantrasyonları 96 kuyucuklu Elisa Plate'lere aktarılmıştır. 26°C'de 24 saat inkübasyondan sonra büyümenin olup olmadığının tespiti için bulanıklığa bakılmıştır, ayrıca kuyucukların her birinden petri kaplarına ekimler yapılarak büyümenin yanı sıra inhibisyonun da olup olmadığı gözlenmiştir. İşlemler iki tekrarlı olarak uygulanmıştır. Aktif boya konsantrasyonunun yanı sıra, aktif maddenin seyreltilmesinde kullanılan çözenlerinde (5µl ve 20µl) bakteriler üzerindeki etkinliği kontrol amacıyla test edilmiştir.

#### *2.2.7 İstatistiksel Analizler*

Çalışmadaki verilerin değerlendirilmesi için Statistica 7,0 programı kullanılmıştır. Toplam canlı bakteri sayısının, yat limanları arasında ve paneller arasında farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla tek yönlü varyans (One-Way ANOVA) analizi yapılmıştır. İleri testler için ise Tukey-Honesty testi seçilmiştir. Yine çevresel değişkenlerin etkisinin incelenmesinde ve EPS verimi ile ilgili sonuçların yorumlanmasında Pearson Korelasyon analizi yapılmıştır (Sokal ve Rohlf, 1995).

## BÖLÜM ÜÇ

### BULGULAR

#### 3.1 Çevresel Değişkenlerin Ölçülmesi (Fiziko-Kimyasal Analizler)

Her iki yat limanında, tespit edilen çözünmüş oksijen, sıcaklık, tuzluluk ve pH değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Çalışma süresi boyunca deniz suyu sıcaklığı değişkenlik göstermiştir. Sıcaklığın en düşük değeri Şubat ayında tespit edilmiştir (10,20°C ve 14,10°C). Çeşme Setur Marina’da ölçülen minimum ve ortalama değerler İzmir İç Körfezi’nde yer alan Levent Marina’dan daha yüksek tespit edilmiştir. Çeşme Ilıcalar mevkinde olan yat limanındaki deniz suyu sıcaklığındaki yüksekliğin, bölgedeki sıcak su çıkış noktaları kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Nisan ayından sonra sıcaklık değerleri yükselmeye başlamış ve maksimum değere Haziran ayında ulaşmıştır (23,70°C ve 22,70°C). Tuzluluk değeri her iki yat limanında da önemli bir değişkenlik göstermemiştir. 1-1,5 m derinliğindeki su kolonunda ölçülen çözünmüş oksijen değerleri değişiklik göstermiştir. En düşük oksijen değeri 5,26 mg/l ile Levent Marina’da tespit edilmiştir. pH değerleri ise her iki marinada 7,96 ile 8,27 arasında ölçülmüştür.

Tuzluluk ve çözünmüş oksijen değerlerinin Çeşme Setur Marina’da, Levent Marina’ya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki noktada da sıcaklık artışına bağlı olarak oksijen değerlerinde düşüş gözlenmiştir.

Tablo 3.1 Aralık 2006 ile Haziran 2007 arasında ölçülen fiziko-kimyasal değişkenlerin minimum, maksimum ve ortalama değerleri

İstasyon	Sıcaklık (°C)				Tuzluluk (psu)				pH				Çözünmüş Oksijen (mg/l)			
	Ort.	Min.	Mak.	S.h <sup>*</sup>	Ort.	Min.	Mak.	S.h <sup>*</sup>	Ort.	Min	Mak	S.h <sup>*</sup>	Ort.	Min	Mak	S.h <sup>*</sup>
<b>Levent M.</b>	14,60	10,20	23,70	0,93	38,72	38,00	39,40	0,10	8,08	7,96	8,26	0,03	6,48	5,26	8,40	0,23
<b>Çeşme S.M.</b>	16,60	14,10	22,70	0,55	39,52	39,00	39,50	0,06	8,20	8,15	8,27	0,01	7,60	6,84	8,82	0,15

Not: S.h.<sup>\*</sup>: Standart hata



### 3.2 Besin Elementleri Analizleri

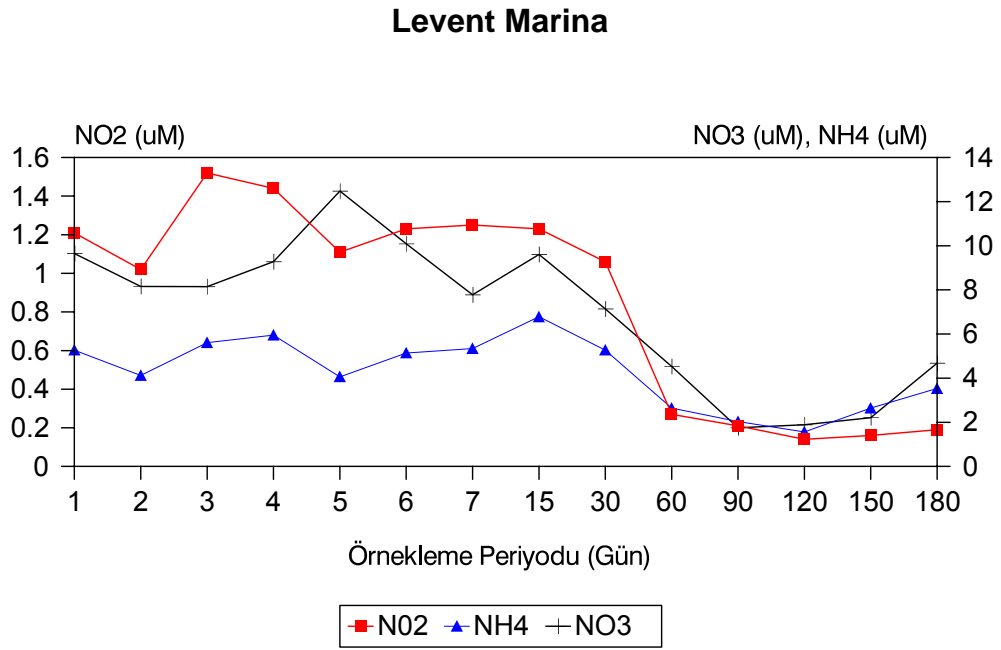
Ortam koşulları açısından farklılık gösteren Levent Marina ve Çeşme Setur Marina'da sırasıyla ölçülen besin elementlerinin değerleri TNO<sub>x</sub>-N (NO<sub>3</sub>-N+N<sub>2</sub>-N): 2,03-13,59µM; 0,34-1,87µM, NH<sub>4</sub>-N: 1,56-6,78µM, 0,10-0,95µM, T-PO<sub>4</sub>-P: 1,17-5,25µM, 0,08-0,19µM, o.PO<sub>4</sub>-P: 0,82-2,76µM, 0,01-0,05µM bulunmuştur (Şekil 3.1, 3.2, 3.3. ve 3.4'de verilmiştir).

Çözünmüş organik karbon değerleri, Çeşme Setur Marina'da (67,77-99,38µM), Levent Marina'dan (106,06-145,96µM) daha düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5). İlkbaharda, besin elementleri değerleri düşüş gösterirken, klorofil a değerlerinde her iki yat limanında da artış görülmüştür (Şekil 3.6). Bulunan sonuçlara göre Levent Marina ötrofik özellik göstermekte olup birincil üretim oranı yüksektir. Her iki yat limanında, çözünmüş besin elementleri, çözünmüş organik karbon (DOC) ve klorofil a konsantrasyonları açısından tek yönlü varyans analizi yapıldığında yat limanları arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (TNO<sub>x</sub>-N; F=42,55, p<0,05; NH<sub>4</sub>-N; F=82,96, p<0,05; T-PO<sub>4</sub>; F=90,91, p<0,05; o.PO<sub>4</sub>-P; F=143,74, p<0,05, DOC F=91,47, p<0,05 ve Klo-a F=33,41, p<0,05). Sonuçlar Tablo 3.2 de verilen değerler ile karşılaştırılmıştır.

Çevresel değişkenler ve besin elementleri arasında bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Pearson Korelasyonu katsayıları hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler, Levent Marina'da, klorofil-a ile sıcaklık arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğunu (R=0,89 p<0,05) ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, çalışma periyodu boyunca, sıcaklık ve T-PO<sub>4</sub>-P arasında anlamlı bir korelasyon (R=0,86, p<0,05) görülmüştür. Buna karşın, sıcaklık ve diğer kimyasal değişkenler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. pH ise tüm besin elementleri ile negatif ilişki göstermiştir. pH için en güçlü ilişki TNO<sub>x</sub>-N (R=-0,94, p<0,05) ile tespit edilmiştir. Diğer yandan, Levent Marina'da tuzluluk ve kimyasal parametreler arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir. Çözünmüş oksijen ise besin elementleri ve klorofil a ile negatif korelasyon göstermektedir.

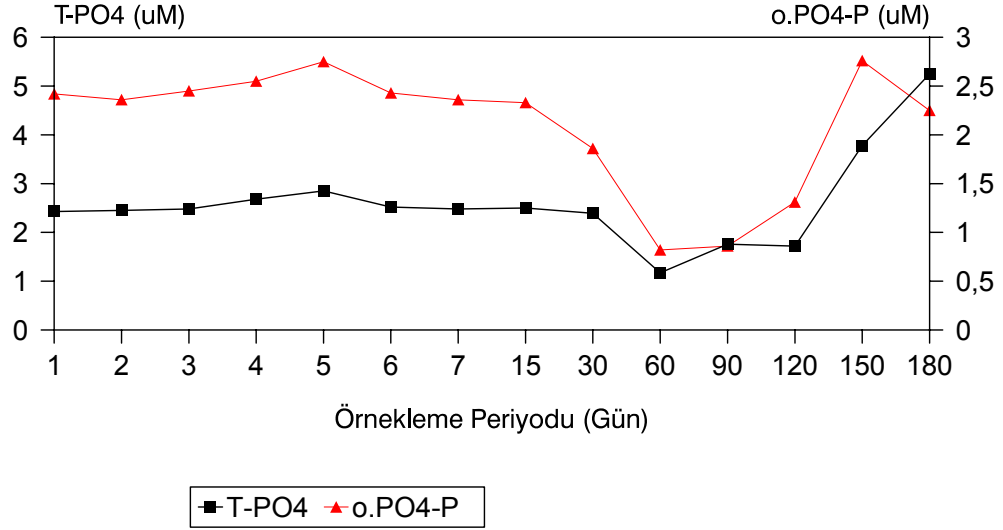
Çeşme Setur Marina'da ise tuzluluk, pH ve çözünmüş oksijen ile kimyasal değişkenler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Buna karşın, sıcaklık ile klorofil-a ( $R=0,55$ ,  $p<0,05$ ) ve  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $R=0,54$ ,  $p<0,05$ ) arasında zayıf bir pozitif ilişki görülürken, çözünmüş organik karbon değerleri ile zayıf bir negatif korelasyon ( $R=-0,59$ ,  $p<0,05$ ) belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Levent Marina'da ölçülen azot ve fosfor, çözünmüş organik karbon ve klorofil a değerlerinin, Çeşme Setur Marina'dan daha yüksek olduğu, yani İzmir İç Körfezi'nde yer alan Levent Marina'daki kirlilik yükünün fazla olduğu görülmüş, bunun yanında sıcaklık artışıyla, klorofil a değerlerindeki yani birincil üretimdeki artış da tespit edilmiştir.



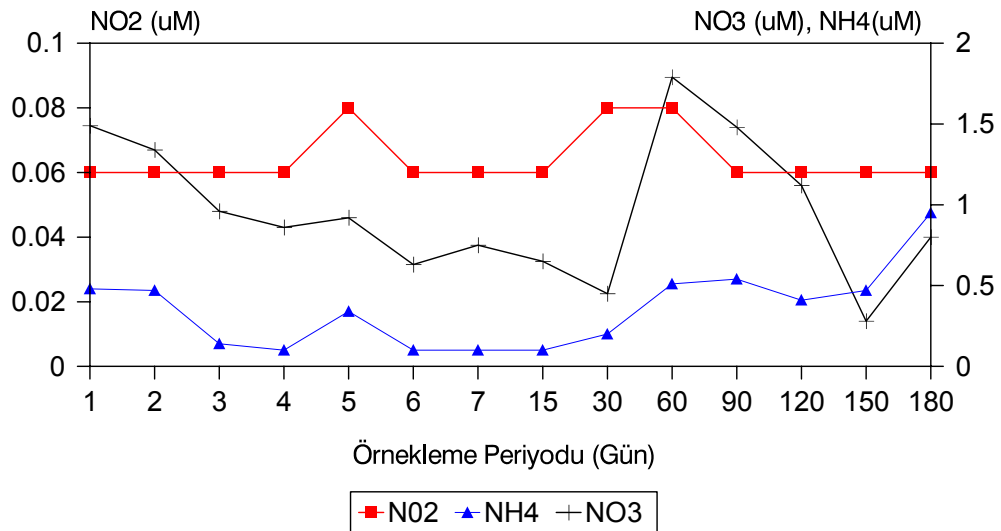
Şekil 3.1 Levent Marina'da ölçülen nitrit, nitrat ve amonyum değerleri

### Levent Marina



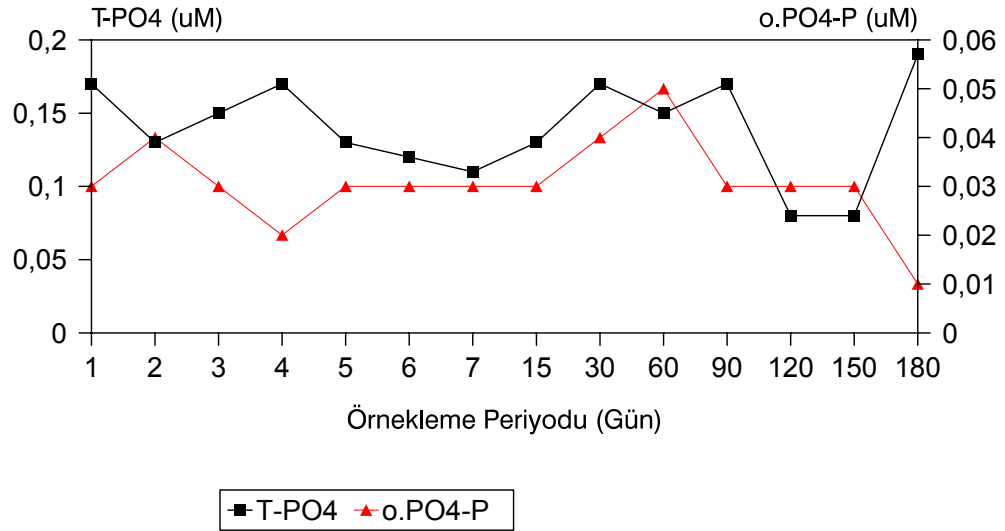
Şekil 3.2 Levent Marina'da ölçülen ortofosfat ve toplam fosfat değerleri

### Cesme Setur Marina

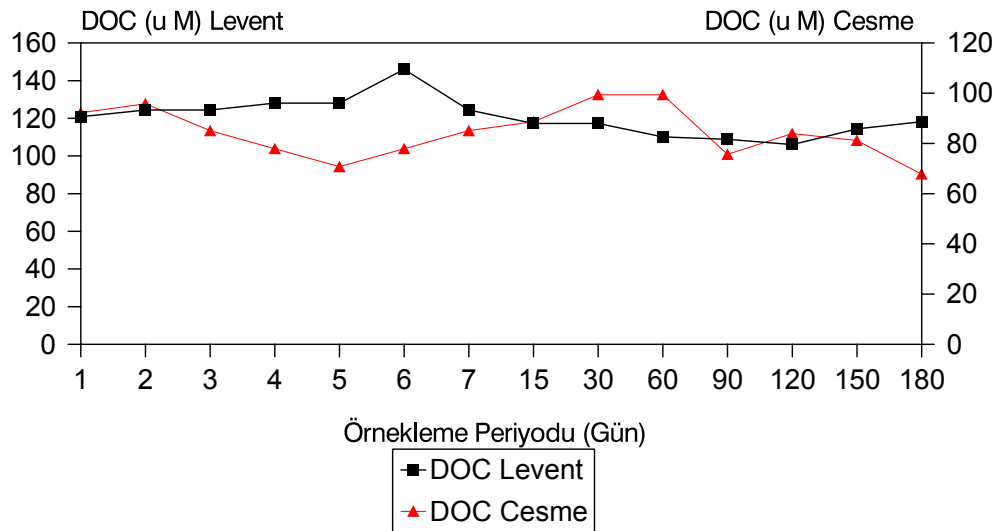


Şekil 3.3 Çesme Setur Marina'da ölçülen nitrit, nitrat ve amonyum değerleri

### Cesme Setur Marina

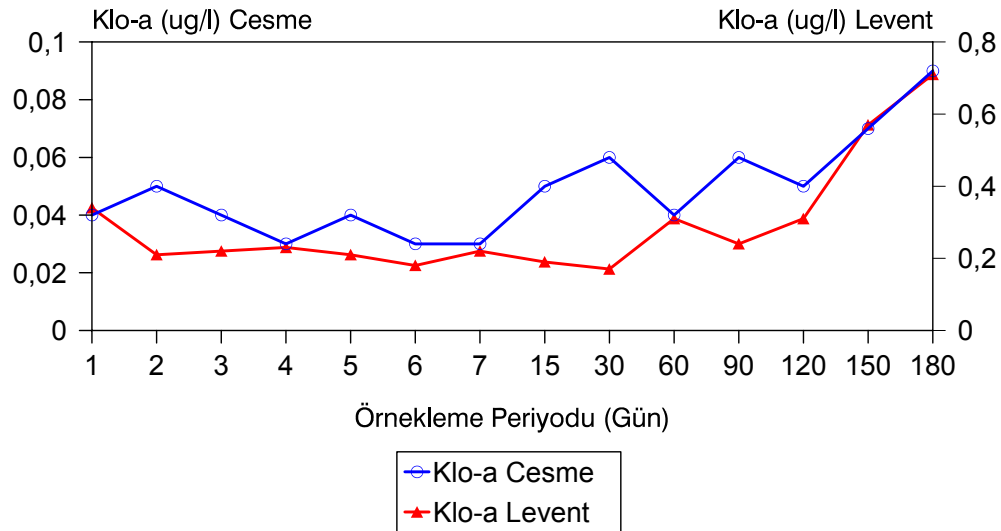


Şekil 3.4. Çesme Setur Marina'da ölçülen ortofosfat ve toplam fosfat değerleri



Şekil 3.5 Levent Marina ve Çesme Setur Marina'da ölçülen çözünmüş organik karbon değerleri

### Levent Marina ve Cesme Setur Marina



Şekil 3.6 Levent Marina ve Çesme Setur Marina'da ölçülen klorofil-a değerleri

Tablo 3.2 Adriyatik Denizi, Sarakinos Körfezi ve İzmir Körfezi'ndeki besin elementleri konsantrasyonları (Kucuksezgin ve ark., 2006)

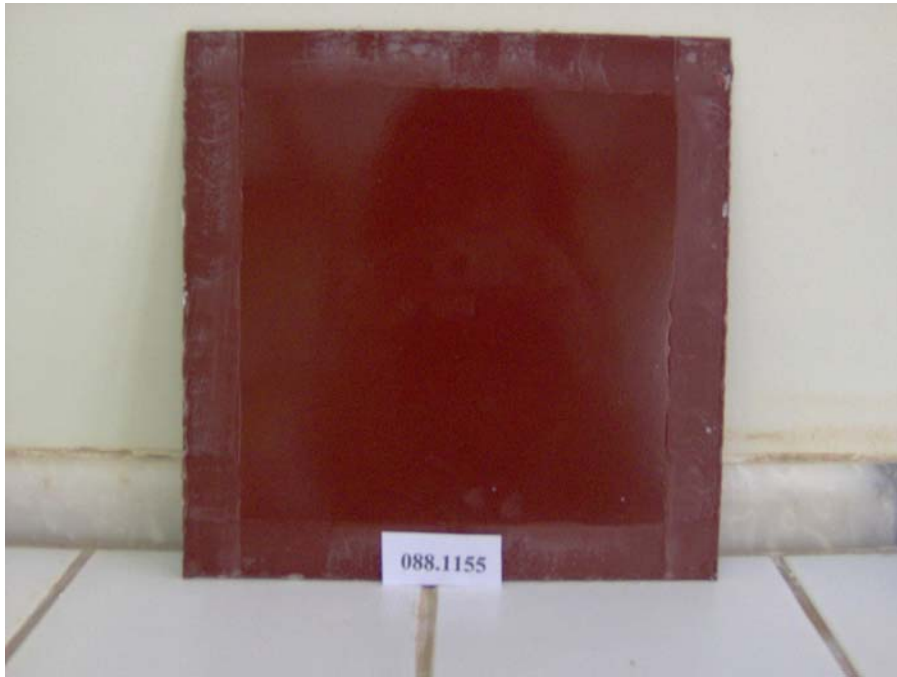
Bölge	$\text{o.PO}_4\text{-P}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_3\text{-N}$ ( $\mu\text{M}$ )
Güney Adriyatik Denizi (Oligotrofik)	0,03	1,0
Orta Adriyatik Denizi (Oligotrofik)	0,05	0,5
Kuzey Batı Adriyatik Denizi (Ötrofik)	0,30	5,0
Sarakinos Körfezi (kıydan uzak)	0,01-3,50	0,01-15,04
Sarakinos Körfezi (kıyı)	0,01-13,72	0,01-24,11
İzmir Dış Körfezi	0,01-0,19	0,10-1,80
İzmir Orta-İç Körfezi	0,01-10,0	0,12-27,0

### 3.3 Mikrobiyolojik Analizler

#### 3.3.1 Toplam Canlı Bakteri Yoğunluğu

Bakteriyal büyüme, her iki yat limanında yer alan tüm test plakaları yüzeyinde gözlenmiştir (Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9). Her iki yat limanında da, 088.1155 (temel bileşeni florlu reçine ve silikon yapıda) kodlu boyalı ve antipas uygulanmış olan plakalarda 24. saatin sonunda bakteriyal gelişim gözlenmiştir. 088.1154 (temel

bileşen çinko oksit ve bakır oksit) kodlu boyanın uygulandığı plakalarda, Levent Marina'da 72. saatin sonunda, Çeşme Setur Marina'da ise 96. saatin sonunda bakteriler gözlenirken, 269.2710 (temel bileşen tbt ve bakır oksit) kodlu plakalarda her iki marinada 120. saatte, 279.2710 (temel bileşen triazin diamin ve bakır oksit) kodlu plakalarda ise 72. saatin sonunda toplam canlı bakteri (aerobik, heterotrofik, mezofilik) sayımı tespit edilmiştir (Şekil 3.10 ve 3.11).



Şekil 3.7 088.1155 Kodlu plakanın yat limanına yerleştirilmeden önceki görüntüsü



Şekil 3.8 088.1155 Kodlu plakanın, Levent Marina'da 2. ayın sonundaki görüntüsü



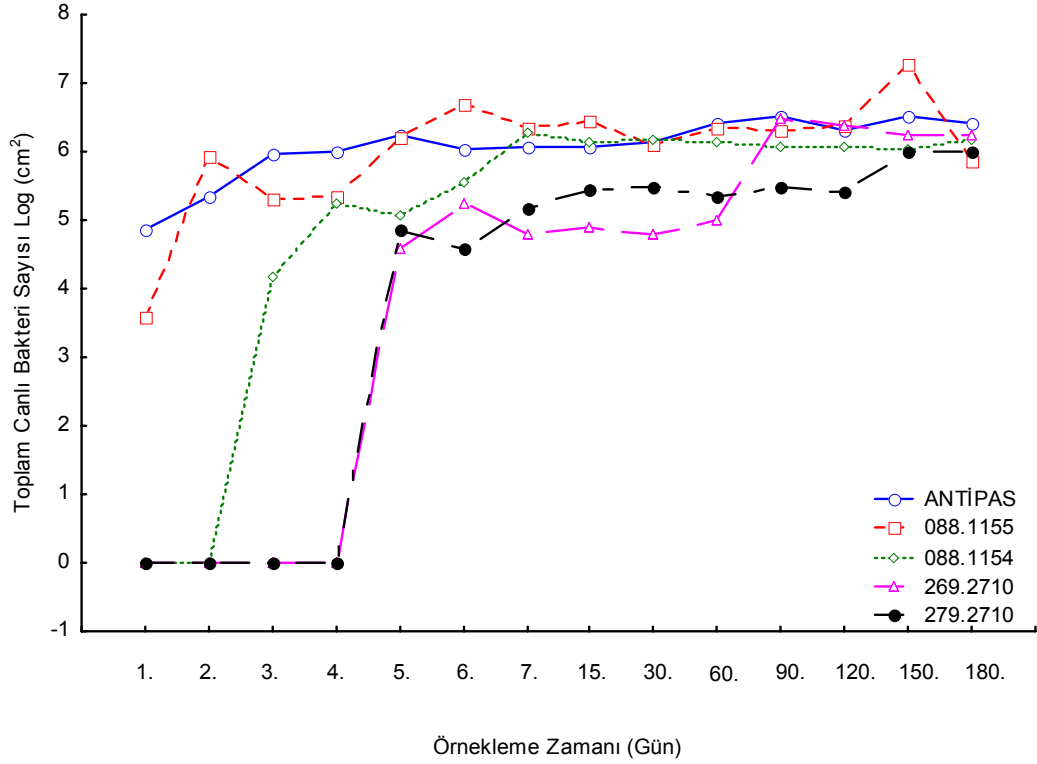
Şekil 3.9 088.1155 Kodlu plakanın, Levent Marina'da 6. ayın sonundaki görüntüsü

Örnekleme süresince, Levent Marina'da, en yüksek toplam canlı bakteri sayısı ( $1,9 \times 10^7$  kob/cm<sup>2</sup>) 088.1155 kodlu plakada tespit edilmiştir. Buna karşın, Çeşme Setur Marina'da en yüksek toplam canlı bakteri sayısı ( $2,2 \times 10^6$  kob/cm<sup>2</sup>) 279.2710 kodlu plakada belirlenmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Plakaların yüzeyindeki toplam canlı bakterilerin minimum, maksimum ve ortalama değerleri (kob/cm<sup>2</sup>)

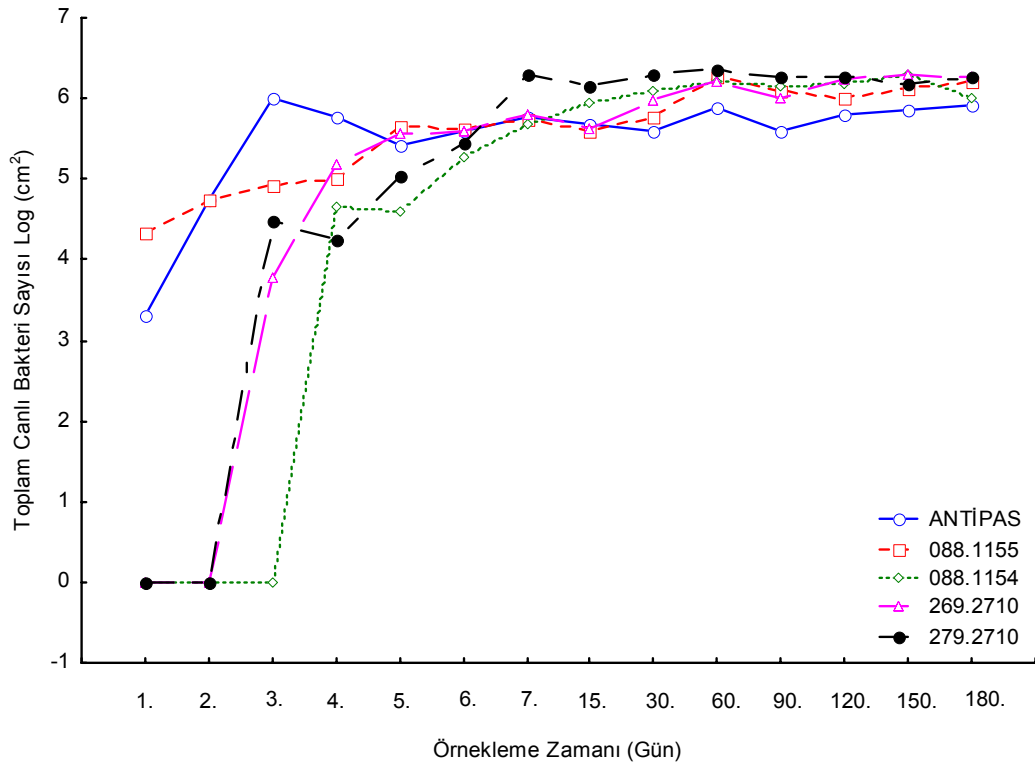
İstasyon	Boya No				
	Antipas	088.1155	088.1154	269.2710	279.2710
<b>Levent M.</b>					
Ort.	1,6x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	8,4x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>
Min-	7,4x10 <sup>4</sup> -	4x10 <sup>3</sup> -	<1-	<1-	<1-
<b>Mak.</b>	<b>3,2x10<sup>6</sup></b>	<b>1,9x10<sup>7</sup></b>	<b>1,8x10<sup>6</sup></b>	<b>3x10<sup>6</sup></b>	<b>1x10<sup>6</sup></b>
S.h.	267	1292	182	285	91
<b>Cesme M.</b>					
Ort.	5x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>5</sup>	7,8x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>
Min-	2x10 <sup>3</sup> -	2,2x10 <sup>4</sup> -	<1-	<1-	<1-
<b>Mak.</b>	<b>1x10<sup>6</sup></b>	<b>1,9x10<sup>6</sup></b>	<b>1,9x10<sup>6</sup></b>	<b>1,9x10<sup>6</sup></b>	<b>2,2 x10<sup>6</sup></b>
S.h.	75	162	189	190	245

Not: S.h.\*: Standart hata



Şekil 3.10 Levent Marina'daki plakalarda cm<sup>2</sup>'deki toplam canlı bakteri sayısı Aralık 2006-Haziran 2007





Şekil 3.11 Çeşme Setur Marina'daki plakalarda  $\text{cm}^2$ 'de ki toplam canlı bakteri sayısı Aralık 2006-Haziran 2007

İstatistik analizlerde yapılan tek yönlü varyans analizi, yat limanları arasında bakteriyal yoğunluk açısından anlamlı bir değişkenlik göstermemiştir ( $p>0,05$ ). Yine benzer şekilde, Çeşme Setur Marina'daki test plakaları arasında toplam canlı bakteri sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir varyasyon görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Diğer yandan, Levent Marina'da yapılan tek yönlü varyans analizinde, plakalar arasında toplam canlı bakteri yoğunluğu açısından değişkenlik anlamlı olarak tespit edilmiştir ( $F=4,28$ ,  $p<0,05$ ). Bu sonuçlar, Tukey Honesty testi ile kontrol edilmiş ve bu varyasyonun 269.2710 ve 279.2710 kodlu boyalardan kaynaklandığı görülmüştür. Sonuç olarak, triazine diamin ile TBT ve bakır oksit içeren boyaların diğerleri ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çevresel değişkenler ve toplam canlı bakteri yoğunluğu arasında bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Pearson Korelasyonu katsayıları hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler, Levent Marina'da sıcaklık ve canlı bakteri sayısı arasında çok zayıf bir ilişki ( $R=0,54$ ,  $p<0,05$ ) olduğunu açığa çıkarmıştır. Buna karşın, bu

değişkenler Çeşme Setur Marina'da anlamlı bir korelasyon göstermemiştir. pH değerleri ve bakteri yoğunluğu açısından her iki yat limanında da anlamlı bir ilişki görülmüştür. Bu korelasyon, Çesme Setur Marina'da ( $R=0,86$ ,  $p<0,05$ ), Levent Marina ( $R=0,60$ ,  $p<0,05$ )'ya kıyasla daha güçlü bulunmuştur. Benzer şekilde, klorofil a ve bakteriyal yoğunluk açısından zayıfta olsa bir korelasyon her iki yat limanında da (Levent Marina  $R=0,55$ , Çeşme Setur Marina  $R=0,58$ ,  $p<0,05$ ) tespit edilmiştir. Toplam canlı bakteri yoğunluğu ve diğer kimyasal parametreler karşılaştırıldığında ise güçlü bir ilişki tespit edilememiştir.

### ***3.3.2 Biyokimyasal ve Moleküler Analizler***

İzolasyon işlemlerinde, her bir plakadan izole edilen koloniler, koloni rengi, boyutu, şekli farklı olan cıvık, yapışkanimsı yapıda olanlar ayrı ayrı seçilmiştir (Şekil 3.12 ve 3.13). Elde edilen 120 izolatın kültürel özelliklerine bakılarak, ileri analizler için 20 izolat incelemeye alınmıştır. 20 izolatın gram boyama testi, mikroskopik görünümleri, kültürel ve biyokimyasal analizleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4 Bakteri izolatlarının bazı kültürel ve biyokimyasal özellikleri

Fenotipik Karakterler	Bakteriyal İzolatlar																			
	I 50	I 97	C 73	I 2	C 91	I 96	C 36	I 84	C 102	I 85	I 87	I 80	C111	C 39	I 105	I 6	C 46	C 17	C 90	I 9
Gram reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Hareketlilik	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koloni rengi	beyaz	krem	krem	krem	krem	d.tüyü	d.tüyü	beyaz	beyaz	turuncu	turuncu	krem	krem	d.tüyü	turuncu	krem	krem	krem	krem	krem
O <sub>2</sub> isteği	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	f. an.	a.	a.	f. an.	a.	a.	a.	a.	f. an.
Pigmentasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	z+	+	+	z+	+	+	+	+	+	+	z+	z+	+	+	+	+	+	+
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Nitrat indirg.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MacConkeyde büy.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Fermentasyon</i>																				
D-Glukoz	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Mannitol	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
İnositol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnoz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sakkaroz	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
D-Melibioz	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Arabinoz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kullanım</i>																				
L-Arginin	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Lisin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Üretim</i>																				
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Not; I: İzmir, C:Çeşme  
a: aerobik, f. an: fakültatif anaerobik  
z: zayıf,



Şekil 3.12 I50 numaralı izolatın Zobell 2216e besiyerindeki görüntüsü



Şekil 3.13 I85 numaralı izolatın YMG agar besiyerindeki görüntüsü

Kültürel özellikleri açısından incelenen izolatların biyokimyasal analizler için kullanılan API test kiti sonuçları Tablo 3.5’de verilmiştir. Ancak, API test kitleri deniz gibi çevresel örneklerden elde edilen türlerin tanılanmasında yeterli sonucu vermediği gibi hatalı tanılamaya neden olmuştur (Şekil 3. 14).

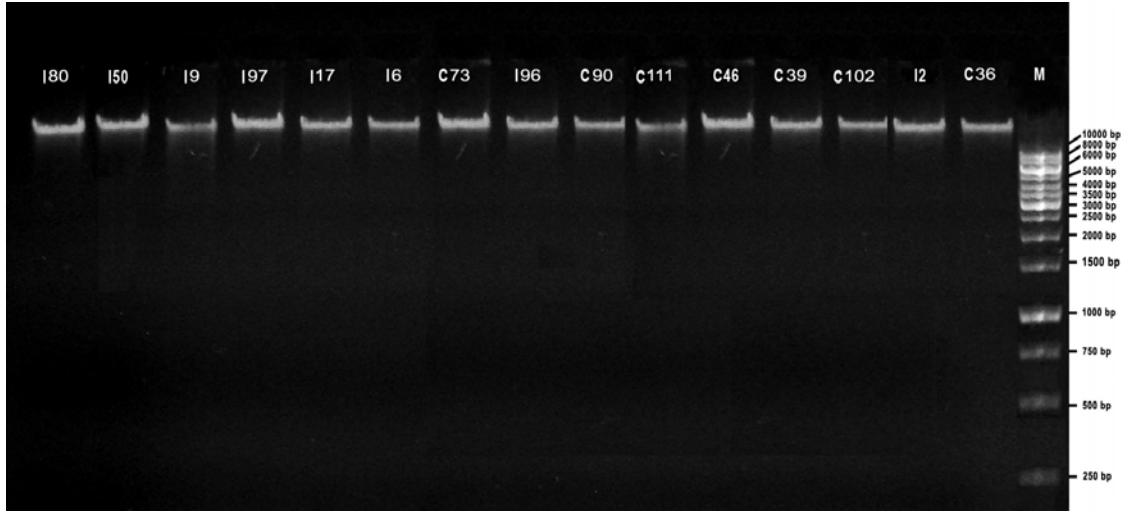


Şekil 3.14 İzolat I50'nin API 20NE ve 20E test kiti sonuçları

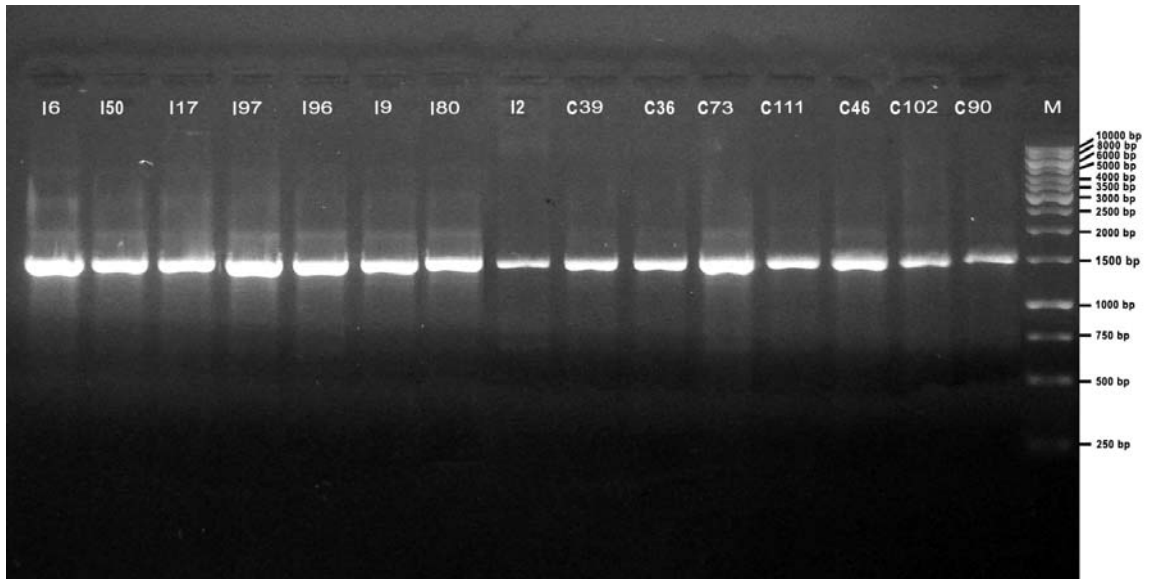
Tablo 3.5 İzole edilen bakterilerin API biyokimyasal test kiti sonuçları

İzolat No	API Test Kiti Türü	Tespit Edilen Tür	İdentifikasyon %
I 2	20NE	<i>B. vesicularis</i>	63,7
I 6	20NE	<i>B. vesicularis</i>	63,7
I 9	20E	Profil tespit edilemedi	-
I 17	20NE	Profil tespit edilemedi	-
C 36	20E	Profil tespit edilemedi	-
C 39	20NE	<i>B. vesicularis</i>	91,5
C 46	20NE	<i>B. vesicularis</i>	91,5
I 50	20NE	<i>C. luteola</i>	98,2
C 73	20NE	<i>Moraxella sp.</i>	82,2
I 80	20NE	<i>W.vinosa</i>	88,0
I 84	20NE	Profil tespit edilemedi	-
I 85	20NE	Profil tespit edilemedi	-
I 87	20NE	<i>W.vinosa</i>	80,3
C 90	20NE	<i>W.vinosa</i>	80,3
C 91	20NE	<i>B. vesicularis</i>	89,5
I 96	20NE	<i>B. vesicularis</i>	63,7
I 97	20NE	Profil tespit edilemedi	-
C 102	20E	Profil tespit edilemedi	-
I 105	20E	Profil tespit edilemedi	-
C 111	20E	Profil tespit edilemedi	-

API test kitlerinin çevresel örneklerde yeterli sonuç vermemesi üzerine, türlerin kesin tanımlanması için moleküler analizlere geçilmiştir. Moleküler analizlerde, öncelikle biyofilm oluşturan bakteriler için uygun prosedürün tespiti yoluna gidilmiştir. İlk olarak, DNA izolasyonu işlemi yapılmıştır (Şekil 3.15). Elde edilen DNA'lar evrensel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) sokulduktan sonra, reaksiyonun uygun koşullarının sağlanıp sağlanmadığının kontrolü için agaroz jelde yürütülmüştür. Jelde saf PCR ürünleri gözlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.15 Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: Markır)



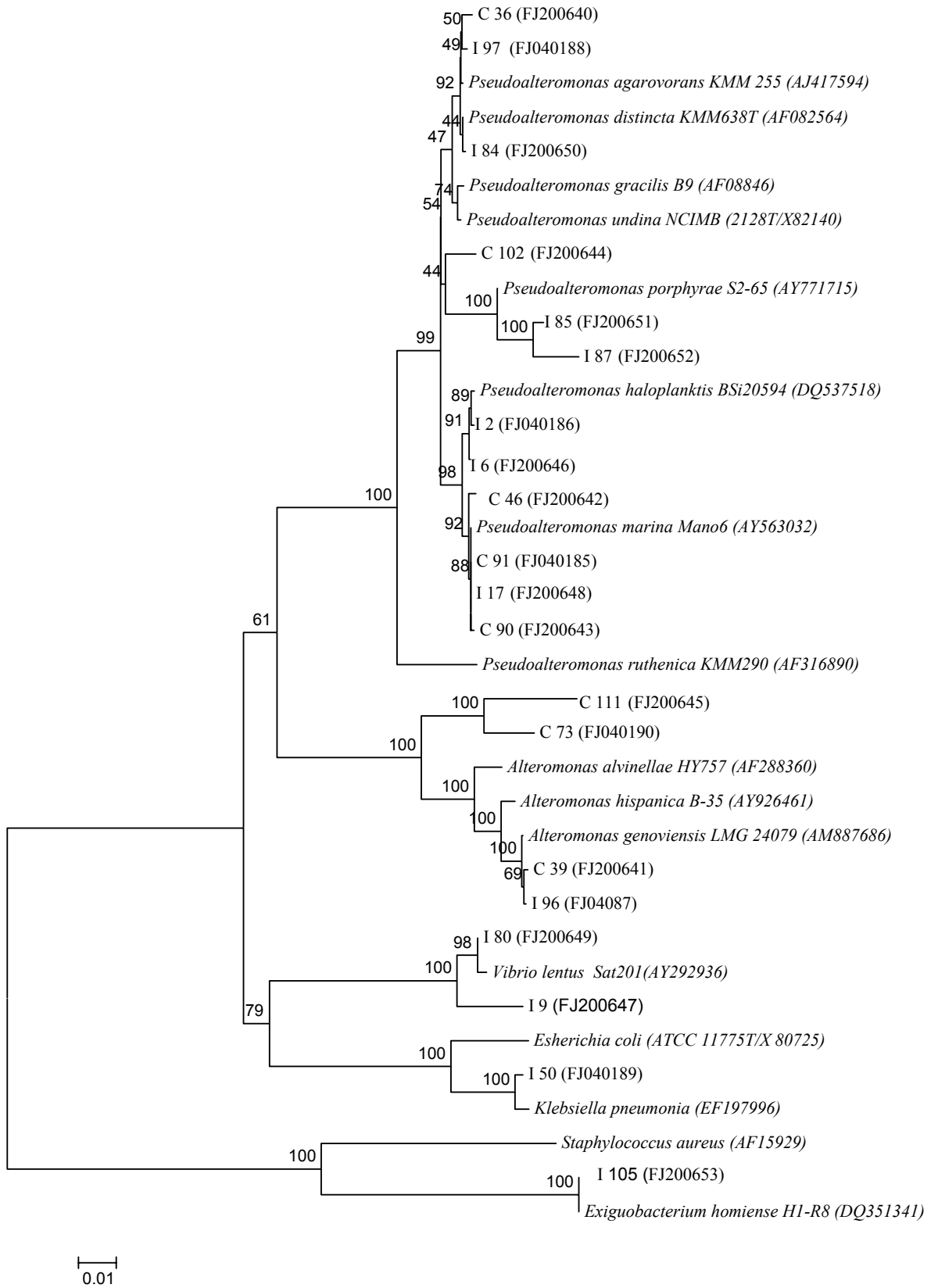
Şekil 3.16 Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait 16S rRNA'yı kodlayan DNA parçasının PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: Markır)

PCR ürünleri alınan izolatlar, nükleotid dizilerinin belirlenmesi amacıyla RefGen (Orta Doğu Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi Ankara)'e gönderilmiştir. Belirlenen nükleotid dizisi, BioEdit programı kullanılarak değerlendirilip, uygun forma getirildikten sonra Gen Bankası'na NCBI (BLAST) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve 20 izolatın tür tayini yapılmıştır. Daha sonra bu izolatların her biri için 16S RNA dizileri kullanılarak, gen bankasından bir giriş kodu alınarak uluslararası gen bankasında ülkemizde araştırılan türler olarak kayıtları yapılmıştır. C36, C39, C46, C90, C102, C111, I6, I17, I80 I84, I85, I87, I105, C91, I2, I96, I97, I50, C73 ve I9 numaralı 20 izolat için sırasıyla bu kodlar *FJ200640*, *FJ200641*, *FJ200642*, *FJ200643*, *FJ200644*, *FJ200645*, *FJ200646*, *FJ200648*, *FJ200649*, *FJ200650*, *FJ200651*, *FJ200652*, *FJ200653*, *FJ040185*, *FJ040186*, *FJ040187*, *FJ040188*, *FJ040189*, *FJ040190* ve *FJ200647* olarak alınmıştır. Türlerin  $\gamma$ -Proteobacteria and Firmicutes üyeleri olduğu ve 5 farklı cinse (*Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Klebsiella* ve *Exiguobacterium*) ait, 11 farklı tür (*Pseudoalteromonas agarivorans*, *P. elyakovii*, *P. porphyrae*, *P. haloplanktis*, *P. marina*, *Alteromonas alvinella*, *A. genoviensis*, *Vibrio lentus*, *V. splendidus*, *Klebsiella pneumonia* ve *Exiguobacterium homiense*) tespit edilmiştir (Tablo 3. 6) (Şekil 3.17). Çalışmada, her iki yat limanı açısından elde edilen cinsler karşılaştırıldığında; yapılan kimyasal analizler sonucu, oligotrofik olduğu belirlenen Çesme Setur Marina'da, biyofilm yapısında sadece *Pseudoalteromonas* ve *Alteromonas* türlerine rastlanırken, ötrofik özellik gösteren Levent Marina'da *Pseudoalteromonas* ve *Alteromonas*'ın yanısıra *Klebsiella*, *Vibrio* ve *Exiguobacterium* cinslerinin üyeleri de tespit edilmiştir. Bu da ötrofik ortamda oluşan biyofilmdeki tür çeşitliliğinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.6 İzolatların moleküler tanılama sonuçları

İzolat no.	Boya no.	16S rDNA benzerlik %	Eşleşme
C 36	Antipas	99	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>
I 84	279.2710	99	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>
C 102	088.1155	99	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>
I 85	088.1155	99	<i>Pseudoalteromonas porphyrae</i>
I 87	088.1154	99	<i>Pseudoalteromonas porphyrae</i>
I 80	269.2710	99	<i>Vibrio lentus</i>
C 111	088.1154	98	<i>Alteromonas alvinella</i>
C 39	Antipas	100	<i>Alteromonas genoviensis</i>
I 105	279.2710	99	<i>Exiguobacterium homiense</i>
I 6	Antipas	99	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
C 46	Antipas	99	<i>Pseudoalteromonas marina</i>
I 17	088.1155	99	<i>Pseudoalteromonas marina</i>
C 90	269.2710	99	<i>Pseudoalteromonas marina</i>
I 50	Antipas	99	<i>Klebsiella pneumonia</i>
I 97	279.2710	100	<i>Pseudoalteromonas agorivorans</i>
C 73	088.1154	98	<i>Alteromonas alvinella</i>
I 2	Antipas	99	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
C 91	088.1154	100	<i>Pseudoalteromonas marina</i>
I 96	088.1155	100	<i>Alteromonas genoviensis</i>
I 9	088.1155	99	<i>Vibrio splendidus</i>





Şekil 3.17 Tanılanan 20 izolattın yaklaşık 1400bp'lik nükleotid dizileri kullanılarak yapılan soy ağacı

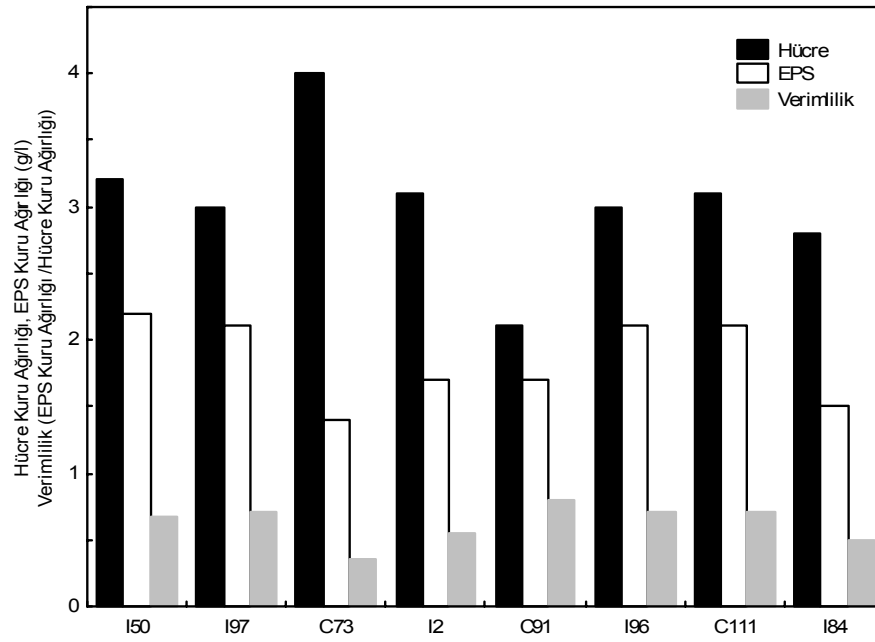
### 3.3.3 EPS Üretim Analizleri

#### 3.3.3.1 İzolatların Hücre Kuru Ağırlıklarının ve EPS Verimlerinin Saptanması

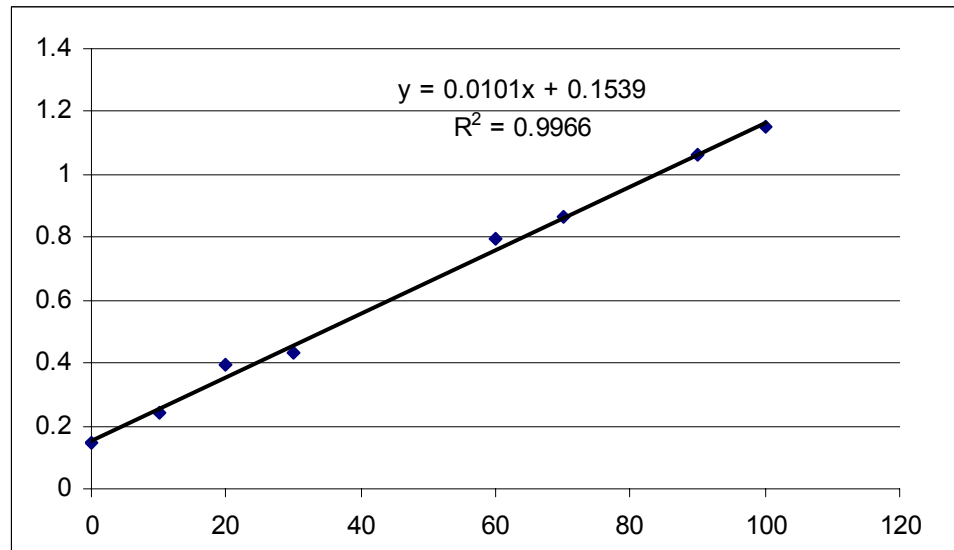
Tür tanısı yapılan 20 izolatın, laboratuvar ortamında iyi EPS üreticisi olduğu görülen 8 tanesi (I50 *Klebsiella pneumonia*, I97 *P. agarivorans*, C73 *A. alvinella*, I2 *P. haloplanktis*, C91 *P. marina*, I96 *A. genoviensis*, C111 *A. alvinella*, I84 *P. elyakovii*), EPS karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla test edilmiştir. YMG Broth' da 5 günlük inkübasyondan sonra, 8 izolat için elde edilen kuru hücre ağırlığı g/l'de  $2,10 \pm 0,18$  (*Pseudoalteromonas marina* C91) ile  $4,00 \pm 0,18$  (*Alteromonas alvinella* C73) arasında değişmektedir. EPS'nin kuru ağırlığı ise  $1,40 \pm 0,11$  (C73 *Alteromonas alvinella*) ile  $2,20 \pm 0,11$  (I50 *Klebsiella pneumonia*) g/l arasında değerler göstermektedir. Bu sonuçlarda, C73 kodlu *Alteromonas alvinella* ırkının en yüksek hücre üretimine sahipken en düşük EPS ürettiği gözlenmiştir. C91 (*Pseudoalteromonas marina*)'in en yüksek EPS verimliliğine: 0,80 (EPS kuru ağırlığı/hücre kuru ağırlığı) sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatlar ise, C91'den daha az miktarda EPS verimliliğine sahiptir (Şekil 3.18). Çalışmada hücre sayısındaki artış ile EPS üretim verimliliği arasında negatif bir ilişki görülmüştür ( $r = -0,75$ ,  $p = 0,05$ ). Yani izole ettiğimiz ırklar, metabolizmalarını EPS üretiminden ziyade, hücre üretiminde daha yoğun olarak kullanmaktadırlar.

#### 3.3.3.2 EPS'lerin Toplam Şeker Analizleri için 490nm'de ve Toplam Protein Analizleri için 595nm'de Çıkarılan Standart Grafikler ve Analiz Sonuçları

Şeker analizleri için 0-100µg/ml aralıkta glukoz solüsyonunun spektrofotometrede 490nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri sonucu çıkarılan standart grafik Şekil 3.19'da verilmiştir.

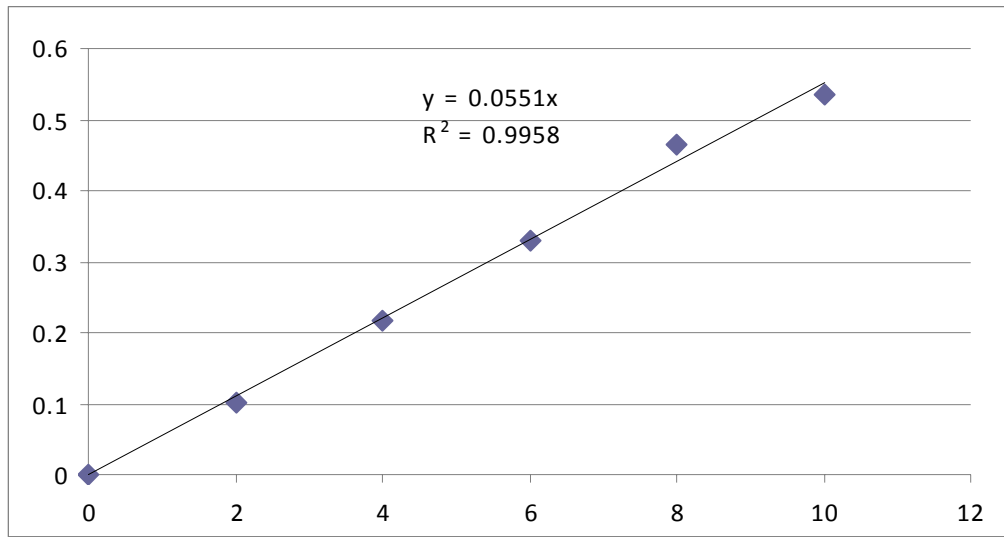


Şekil 3.18 EPS üreticisi 8 izolatin hücre kuru ağırlıklarının (g/l), EPS kuru ağırlıklarının (g/l) ve EPS verimliliğinin karşılaştırılması.



Şekil 3.19 Toplam şeker miktarı tayini için 490nm'deki standart grafik

Bradford yöntemi ile 595nm'de elde edilen ortalama absorbans değerlerine göre protein standart grafiği Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20 Toplam protein miktarı tayini için 595nm'deki standart grafik

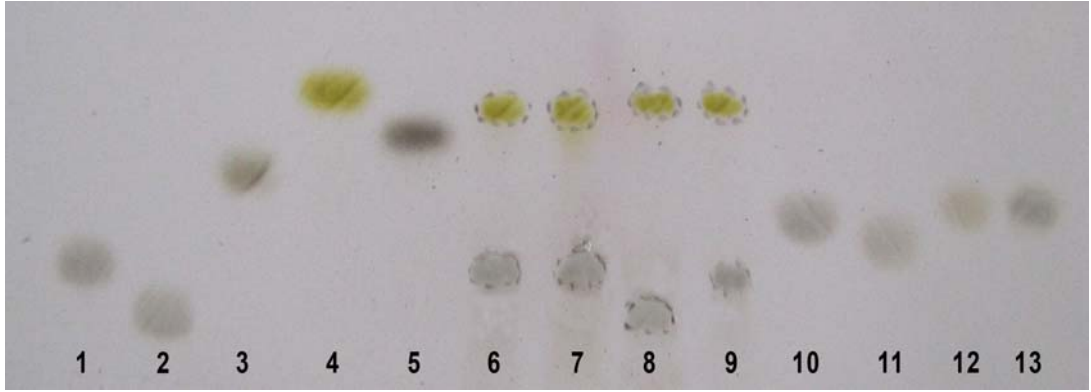
Yapılan analizlerde, 8 izolatin EPS'sinin şekerleri ve proteinleri içerdiği görülmüştür (Tablo 3.7). En yüksek şeker (510,6mg/l) C111 (*Alteromonas alvinella*) ve protein (582,0mg/l) miktarı I84 (*Pseudoalteromonas elyakovii*) numaralı izolatta tespit edilmiştir. Çalışmada izolatların tamamında düşük şeker ve protein miktarları belirlenmiştir.

Tablo 3.7 EPS üreticisi 8 izolatin EPS'sinde bulunan toplam şeker ve protein miktarları

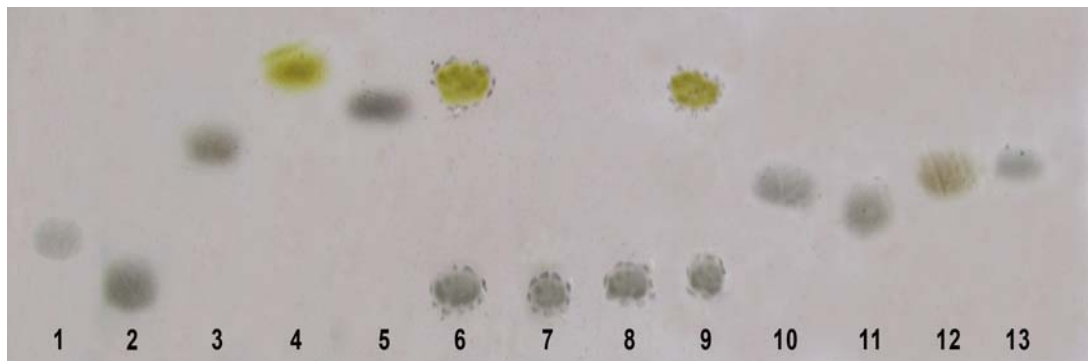
İzolot no	Toplam EPS (mg/l)	Toplam şeker (mg/l EPS)	Toplam protein (mg/l EPS)
I 50 ( <i>K. pneumonia</i> )	2200	425,6	407,4
I 84 ( <i>P. elyakovii</i> )	1500	177,0	582,0
C 111 ( <i>A. alvinella</i> )	2100	510,6	289,6
I 97 ( <i>P. agarivorans</i> )	2100	410,4	153,8
C 73 ( <i>A. alvinella</i> )	1400	380,2	130,4
I 2 ( <i>P. haloplanktis</i> )	1700	349,7	153,2
C 91 ( <i>P. marina</i> )	1700	360,6	160,0
I 96 ( <i>A. genoviensis</i> )	1600	354,0	130,2

### 3.3.3.3 EPS'lerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Şeker İçeriklerinin Belirlenmesi

İzolatların laboratuvar koşullarında tespit edilen şeker kompozisyonları, Şekil 3.21, 3.22 ve Tablo 3.8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, izolatlardaki laktoz (glukoz ve galaktoz) ve sakkaroz (glukoz ve laktoz) gibi disakkaritlerin hidrolizlenmediği görülmüştür. İzolatların ikisinde, I2 (*P. haloplanktis*) ve I96 (*A. genoviensis*)'da sadece laktoz (glukoz ve galaktoz) tespit edilirken, diğer izolatların laktoz ya da sakkarozun yanı sıra ramnozuda içerdikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.21 EPS üreticisi izolatların şeker kompozisyonları ve standartlar; 1;Sakkaroz, 2; Laktoz, 3; Arabinoz, 4; Ramnoz, 5; Riboz; 6; I84 (*P. elyakovii*), 7; I97 (*P. agarivorans*), 8; C111 (*A. alvinella*), 9; C91 (*P. marina*), 10; Glukoz, 11; Galaktoz, 12; Mannoz, 13; Fruktoz.



Şekil 3.22 EPS üreticisi izolatların şeker kompozisyonları ve standartlar; 1;Sakkaroz, 2; Laktoz, 3; Arabinoz, 4; Ramnoz, 5; Riboz; 6; I50 (*K. pneumonia*), 7; I96 (*A. genoviensis*), 8; I2 (*P. haloplanktis*), 9; C73 (*A. alvinella*) 10; Glukoz, 11; Galaktoz, 12; Mannoz, 13; Fruktoz.

Tablo 3.8 8 İzolatın ürettiği EPS'deki şeker içerikleri

İzolat no	EPS'lerdeki Şeker İçerikleri
I 50( <i>K. pneumonia</i> )	Laktoz (Glukoz ve Galaktoz), Ramnoz
I 84 ( <i>P. elyakovii</i> )	Sakkaroz (Glukoz ve Fruktoz), Ramnoz
C 111 ( <i>A. alvinella</i> )	Laktoz (Glukoz ve Galaktoz), Ramnoz
I 97 ( <i>P. agarivorans</i> )	Sakkaroz (Glukoz ve Fruktoz), Ramnoz
C 73 ( <i>A. alvinella</i> )	Laktoz (Glukoz ve Galaktoz), Ramnoz
I 2 ( <i>P. haloplanktis</i> )	Laktoz (Glukoz ve Galaktoz)
C 91 ( <i>P. marina</i> )	Sakkaroz (Glukoz ve Fruktoz), Ramnoz
I 96 ( <i>A. genoviensis</i> )	Laktoz (Glukoz ve Galaktoz)

### 3.3.4 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MICs)

Tür tanısı yapılan 20 izolatın, çalışmada kullanılan antifouling boyalara bireysel dirençlerinin saptanması amacıyla, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC) testleri yapılmıştır (Şekil 3.23 ve 3.24). Testlerin sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakılırsa, bakteri türlerinin tümünün antipaslı boyada büyüme gösterdiği gözlenmiştir. 088.1154 kodlu aktif bileşeni çinko ve bakır oksit olan boyada, ve 088.1155 kodlu aktif bileşeni flor olan boyada büyüme 1/32'lik seyreltmede başlamıştır. 279.2710 kodlu triazine diamine ve bakır oksit karışimli boyanın bakteriler üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Bu boyanın hiç bir seyreltmesinde bakteriyel büyüme gözlenmemiştir. I17 (*P. marina*), C90 (*P. marina*), I96 (*A. genoviensis*), C102 (*P. elyakovii*), I85 (*P. porphyrae*), I87 (*P. porphyrae*), C91 (*P. marina*) ve I2 (*P. haloplanktis*), numaralı izolatların tüm boya türlerine diğer türlerden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatlar kontrol amacıyla, çözenlerin 5µl ve 20µl'lik konsantrasyonları için test edilmiş ve kontrol örneklerinde büyüme göstermişlerdir.



Şekil 3.23 96 Kuyucuklu elisa platelerde yapılan mic testi (C91 numaralı izolat)



Şekil 3.24 Minimum bakterisidal konsantrasyonu (C91 numaralı izolat)

Tablo 3.9 İzolatların boyaların aktif maddelerine olan duyarlılıkları; minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC)

İzolat no	Boya no			
	088.1154	088.1155	279.2710	Antipas
C 36 ( <i>P. agarivorans</i> )	1/16	1/16	-	1/4
I 84 ( <i>P. elyakovii</i> )	1/16	1/16	-	1/4
C 102 ( <i>P. elyakovii</i> )	-	-	-	1/4
I 85 ( <i>P. porphyrae</i> )	-	-	-	1/4
I 87 ( <i>P. porphyrae</i> )	-	-	-	1/4
I 80 ( <i>V. lentus</i> )	1/16	1/16	-	1/4
C 111 ( <i>A. alvinella</i> )	1/16	1/16	-	1/4
C 39 ( <i>A. genoviensis</i> )	1/16	1/16	-	1/4
I 105 ( <i>E. homiense</i> )	1/16	1/16	-	1/8
I 6 ( <i>P. haloplanktis</i> )	1/16	1/16	-	1/4
C 46 ( <i>P. marina</i> )	1/16	1/16	-	1/4
I 17 ( <i>P. marina</i> )	-	-	-	1/8
C 90 ( <i>P. marina</i> )	-	-	-	1/8
I 50 ( <i>K. pneumonia</i> )	1/16	1/16	-	1/4
I 97 ( <i>P. agarivorans</i> )	1/16	1/16	-	1/4
C 73 ( <i>A. alvinella</i> )	1/16	1/16	-	1/8
I 2 ( <i>P. haloplanktis</i> )	-	-	-	1/16
C 91 ( <i>P. marina</i> )	-	-	-	1/16
I 96 ( <i>A. genoviensis</i> )	-	-	-	1/16
I 9 ( <i>V. splendidus</i> )	1/16	1/16	-	1/4



## **BÖLÜM DÖRT**

### **TARTIŞMA VE SONUÇ**

Bilindiği gibi sucul ortamlardaki bakterilerin bir kısmı, canlı ve cansız yüzeyler üzerinde tutunarak biyofilm yapısını oluşturacak şekilde gelişim gösterirler. Biyofilmlerin oluşumunda, hücre dışına salgılanan polimerik maddeler (EPS) önemli rol oynamaktadır. EPS; film, flok ve biyolojik çamur gibi mikrobiyal yığınları tutan yapıdadır ve filmlerin yüzeye tutunmasını sağlar. EPS oluşumu, tüm mikrobiyal yığınların mevcudiyeti için ön koşuldur (Decho, 2000). Gemi gövdeleri, su altındaki platformlar, petrol boru hatları, şamandıralar, balık ağları vb. su altı yapılarında büyük hasarlara neden olan ve ekonomik kayıplara yol açan biyofouling sürecinin de başlangıç aşamasını yaygın olarak bakteriyel biyofilm gelişimi oluşturmaktadır (Thang ve Cooney, 1998). Ancak, fouling sürecini engelleme üzerine yapılan çalışmalarda, tamamen etkili yöntemler henüz geliştirilememiştir.

Son yıllardaki çalışmalar, biyofoulinge neden olan türlerin tespit edilmesi, bunların EPS üretim mekanizmalarının moleküler düzeyde engellenmesi üzerine odaklanmaktadır. Yaptığımız çalışmada, çevresel koşullar ve besin maddelerinin miktarı açısından farklılık gösterdiği ön görülen iki ayrı yat limanına yerleştirilmiş kafes sistemlerindeki saç plakalar üzerinde oluşan bakteriyel biyofilmlerdeki, tür yoğunluğu ve çeşitliliği belirlenmiş, yine ülkemizde kullanılan çeşitli antifouling boyaaların etkinliği araştırılmıştır. Ülkemizde, benzeri bir çalışmanın yapılmaması, biyofilm yapısındaki tür çeşitliliğinin saptanmasının ve ortam şartları ile ilişkilerinin değerlendirilmesinin, yine çeşitli antifouling boyaaların etkinliğinin tespit edilmesinin gerekliliği çalışmanın çıkış kaynağını oluşturmuştur.

Limanlar ve yat limanları, su hareketlerinin zayıf ve karasal kaynaklı girdilerin dolayısıyla organik maddenin zengin olduğu kompleks kıyısal alanlardır. Bu sınırlı alanlarda, ekonomik aktiviter yoğun olarak yapılmaktadır (Kocak, 2007). Makrofoulinge yol açan organizmaların, sıcaklık, tuzluluk, çözülmüş oksijen gibi çevresel değişkenlerden etkilendiği bilinmekte ve özellikle Polychaeta, Mollusca, Crustacea ve Bryozoa grubu organizmalar ile bu çevresel değişkenlerin ilişkileri

yoğun olarak çalışılmaktadır. Sıcaklık, besin elementlerinin kullanımı ya da ışık geçirgenliği gibi faktörler, fouling topluluğu için gıda kaynaklarını etkilemektedir. Bunun yanında, larval yerleşim bilhassa mikrobiyal film oluşumundan ve çevresel koşullardaki değişkenlikten etkilenmektedir (Kocak, 2007; Nandakumar, Matsunaga ve Takagi, 2003).

Yaptığımız çalışmada, her iki yat limanında, tespit edilen çözünmüş oksijen, sıcaklık, tuzluluk ve pH değerleri bulgulara Tablo 3.1’de verilmiştir. Çeşme Setur Marina’da ölçülen minimum ve ortalama sıcaklık değerleri, İzmir İç Körfezi’nde yer alan Levent Marina’da tespit edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Çeşme Ilıcalar mevkinde olan yat limanındaki deniz suyu sıcaklığındaki yüksekliğin, bölgedeki sıcak su çıkış noktaları kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Her iki noktada da sıcaklık artışına bağlı olarak oksijen değerlerinde düşüş gözlenmiştir.

Sucul ortamlardaki başlıca kirlilik kaynaklarının evsel atıklar ve deniz taşımacılığı olduğu bilinmektedir. Azot ve fosfor gibi elementlerin artışı, daha çok insan aktiviteleri sonucu oluşan karasal kaynaklı girdiler ile olmaktadır. Mikrobiyal yıkım ve minerilizasyon sonucunda, organik maddeden türevlenen birincil üretimde artışlar görülmektedir (Kocak ve Kucuksezgin, 2000). Yürütülen çalışmada, iki ayrı yat limanında ölçülen besin elementleri (TNO<sub>x</sub>-N (NO<sub>3</sub>-N+N<sub>2</sub>O-N, NH<sub>4</sub>-N, T-PO<sub>4</sub>-P: o.PO<sub>4</sub>-P) ve çözünmüş organik karbon değerleri Çeşme Setur Marina’da, Levent Marina’ya oranla çok daha düşük olarak belirlenmiştir (Bulgular; Şekil 3.1-3.5). Her iki yat limanında, besin elementleri, çözünmüş organik karbon ve klorofil a konsantrasyonları açısından tek yönlü varyans analizi yapıldığında da, yat limanları arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, İzmir İç Körfezi’nde yer alan Levent Marina’daki kirlilik yükünün daha fazla olduğu görülmektedir. Kocak ve Kucuksezgin (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da, Çeşme’deki yat limanında, düşük besin elementleri değerleri ve yüksek oksijen konsantrasyonu tespit edilirken, İzmir’deki yat limanındaki denizsuyu ise hayli ötrofik ve birincil üretim açısından yoğun olarak değerlendirilmiştir.

Yat limanlarının fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarının yanı sıra, araştırmanın temelini oluşturan, bakteriyal biyofilm topluluğunun tespiti için öncelikle, deniz kullanımına uygun metal ve biyosit temelli boyalar uygulanmış yapay yüzeyler hazırlanmış ve bu yüzeyler altı ay süresince incelenmiştir. Bu sistem, benzeri çalışmalardakine uygun şekilde, bazı modifikasyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Benzer şekilde, Zhang, Fang ve Ko (2003), Hong Kong'daki Victoria Limanı'nda, denizdeki biyofilmlerde gelişen metan üreten bakterilerin varlığı üzerine yaptıkları bir çalışmada (40x15x1,5mm boyutlarında) paslanmaz çelik plakalar kullanmışlardır. Bakteriyal yoğunluk ve türlerin izolasyonu için plakalar, toplamda 90 gün süresince su altında bırakılmıştır. Yine başka bir çalışmada, Baltık Denizi ile Kuzey Denizi arasındaki, Skagerrak Denizi (İsveç)'nde, sabit paneller üzerinde gelişen fouling olayını incelemek amacıyla pleksiglass (110x110x2mm) plakalar kullanılmıştır. Örneklem süresi 125. güne kadar sürmüştür (Berntsson ve Johnsson, 2003). Diğer bir çalışmada ise, Nandakumar ve ark. (2003) Japonya, Chiba denizinde, mikrofouling araştırmaları için, (75x26x26mm boyutlarında) çelik plakalar hazırlamış ve 30 gün örneklem yapmışlardır. Turetgen'in (2004), soğutma suyu kulelerindeki biyofilm modeli üzerine yapmış olduğu bir çalışmada ise, yine benzer şekilde (20x50x1mm) paslanmaz çelik plakalar kullanılmış ve 30 günlük bir inceleme süreci uygulanmıştır. Drake ve ark. (2005) ise balast tanklarında gelişen biyofilmleri incelemek için 20x10cm boyutlarında polistren plakalar kullanmışlardır.

Ülkemizde kullanılan bazı antifouling boya türlerinin etkinliğinin araştırılması amacıyla yaptığımız çalışmada; her iki yat limanında da örneklem periyodu boyunca, tüm test plakaları yüzeyinde bakteriyal büyüme gözlenmiştir. Her iki yat limanında da temel bileşeni florlu reçine olan silikon temelli plakada ve sadece antipas uygulanmış olan plakalarda 24. saatin sonunda bakteriyal gelişim gözlenmiştir. Temel bileşen çinko oksit ve bakır oksit olan boyanın uygulandığı plakalarda, Levent Marina'da 72. saatin sonunda, Çeşme Setur Marina'da ise 96. saatin sonunda bakteriler gözlenirken, TBT ve bakır oksitli plakalarda her iki marinede 120. saatte, triazin diamin ve bakır oksit karışımını içeren plakalarda ise 72. saatin sonunda toplam canlı bakteri sayımı tespit edilmiştir.

Örnekleme süresince, Levent Marina'da, en yüksek toplam canlı bakteri sayısı ( $1,9 \times 10^7$  kob/cm<sup>2</sup>) 088.1155 kodlu plakada tespit edilmiştir. Buna karşın, Çeşme Setur Marina'da en yüksek toplam canlı bakteri sayısı ( $2,2 \times 10^6$  kob/cm<sup>2</sup>) 279.2710 kodlu plakada belirlenmiştir. İstatistik analizlerde yapılan tek yönlü varyans analizi, yat limanları arasında bakteriyal yoğunluk açısından anlamlı bir değişkenlik göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Yine benzer şekilde, Çeşme Setur Marina'daki test plakaları arasında toplam canlı bakteri sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir varyasyon görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Diğer yandan, Levent Marina'da yapılan tek yönlü varyans analizinde, plakalar arasında toplam canlı bakteri yoğunluğu açısından değişkenlik anlamlı olarak tespit edilmiştir ( $F=4,28$ ,  $p < 0,05$ ). Bu sonuçlar, Tukey Honesty testi ile kontrol edilmiştir ve bu varyasyonun 269.2710 ve 279.2710 kodlu boyalardan kaynaklandığı görülmüştür. Sonuç olarak, triazine diamin ile tbt ve bakır oksit içeren boyaların diğerleri ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Thang ve Cooney'in (1998) yaptıkları benzeri bir çalışmada, üç farklı yüzey üzerinde deniz boyalarının etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla, biyofilm oluşumuna yol açan *P. aeruginosa* tip türü kullanılmıştır. Aliminyum, fiberglass ve çelik yüzeyler üzerine boyaya ilave olarak bakır ve ayrıca TBT ilave etmişler. Bu biyofilm modelinde TBT ve bakır içeren antifouling boyalar, mikrobiyal filmlerin gelişiminin engellenmesi ilk aşamalarda gerçekleşmiştir. İncelemenin sonunda, her üç yüzeyde de bakteriyal büyümenin olduğunu gözlemişlerdir. TBT'li boya aliminyum yüzeyde, fiberglass ya da paslanmaz çelikten çok daha etkindir. Bakır boyalı yüzeylerde 48 saatin sonunda bakır dirençli hücreler büyüdüğü ve film oluşturdıkları görülmüştür. Yani, EPS'nin üretimiyle bakır ve TBT'nin aktivasyonu engellenebilmektedir. Drake ve ark. (2005)'nin balast sularında gelişen biyofilmler ile ilgili yaptığı başka bir çalışmada ise polivinil klorid plakaların yüzeyinde flow sitometri cihazıyla, cm<sup>2</sup>'de ortalama  $4 \times 10^3$  *Vibrio alginolyticus*,  $315 \times 10^3$  *Pseudomonas putrefaciens* belirlenmiştir.

Fang ve ark.'nın (2002) toksik metaller ve kimyasalların biyofilme etkisi ile ilgili çalışmalarında ise sülfat indirgeyen bakteriler test amaçlı kullanılmıştır. Hazırlanan özel reaktörlere, çelik plakalar yerleştirilmiş, Victoria Limanı'ndan alınan deniz suyu

steril edildikten sonra ortama eklenmiş, bakteriler sülfat içeren ortamda zenginleştirildikten sonra reaktöre koyulmuş, daha sonra ortama Hong Kong deniz sedimentinde bulunan yaklaşık konsantrasyonlarda metaller ve toksik kimyasallar eklenmiştir. Çalışmanın sonunda, metaller bakterilerin aktivitelerini etkilemiştir ancak plakalarda EPS üretimleri baskılanmamıştır. EPS yapısında, amino asitler ve karboksilik asitler gibi fonksiyonel grupları bulundurmasından ve dolayısı ile metal bağlama doğasından kaynaklanmıştır.

Biyofilm oluşturan bakterilerin izolasyonu için özel seçici bir ortam olmamasına karşın, deniz ortamından yapılan izolasyonlarda, distile suyun yanında mutlaka deniz suyu içeren Zobell 2216 e agar, Marine agar, Seawater agar ve R2A agar ortamları kullanılmakta ve inkübasyon genellikle 20-30C°'ler arasında yapılmaktadır (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003; Patel ve ark., 2003; Unabia ve Hadfield, 1999). Çalışmamızda, izolasyon amacıyla Zobell 2216e agar ve R2A agar ortamları kullanılmıştır. Plakalardan, swap ve kazıma yöntemiyle alınan örnekler besiyerlere ekilmiştir. Unabia ve Hadfield (1999), poliket *Hydroides elegans*'ın larval yerleşimi ve değişiminde, bakterilerin rolü üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, benzer şekilde bakteri izolasyonu için örnekleri steril swap ile alarak besiyeri ortamına transfer etmişlerdir. Zobell 2216e agar ve R2A agar'lı ortamlarda gelişen bakteriler, cıvık yapıdaki kolonileri oluşturmaları nedeniyle muhtemel EPS üreticileri olarak seçilmiştir. Örneklem süreci boyunca elde edilen izolatların kültürel incelemeleri ve bazı biyokimyasal analizleri "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"e göre yapılmıştır (Boureau ve ark., 2003; Patel ve ark., 2003). İleri biyokimyasal analizler için API (Biomérieux, France) hızlı tanılama sistemleri kullanılmıştır. Ancak, API biyokimyasal test kitleri ile tür tanısı açısından sonuç alınamamıştır. Bu hızlı tanıma sistemleri, klinik ve gıda kökenli patojenleri tanılamada etkin iken yavaş büyüme gösteren çevresel örneklerdeki bakteriler için daha az uygunluktur. Ceyhan (2008) tarafından yapılan benzeri bir çalışmada da soğutma suyu kulelelerinden elde edilen 12 bakteriyal izolattan sadece iki tanesi API sistemi ile %99,5 (*B. cepacia*) ve %99,2 (*B. gladioli*)'lik yüksek identifikasyon oranlarıyla tanılanmıştır. API test kitleri, "Biolog Mikroplate" yöntemi (Biolog, Inc., California) gibi fenotipik tanılama

sistemlerinin kontrolü ve doğrulanması mutlaka moleküler teknikler kullanılarak yapılmalıdır (Kwon ve ark., 2002; Rättö, Suiko ve Siika-aho, 2005).

Son yıllarda moleküler tanılama testlerindeki gelişmeler hızla devam etmektedir. DNA-DNA hibridizasyon prensibine dayalı FISH (Floresans *in-situ* Hibridisation) tekniği ve rRNAgenlerini hedefleyen PCR (Polymerase Chain Reaction)'a dayalı teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Madigan ve ark., 2003). Biyofilm oluşturan bakterilerin kesin tanılanmasında her iki yöntemde kullanılmaktadır. Bir çok çalışmada, biyofilm oluşturan bakterilerin DNA izolasyonu, hızlı ve oldukça yüksek saflıkta genomik DNA elde edilmesinden dolayı yaygın olarak ticari kitlerle gerçekleştirilmiştir. AccuPrep genomik DNA izolasyon kiti (Bioneer) (Lee ve ark., 2002), Wizard genomik DNA izolasyon kiti (Promega) (Kwon ve ark., 2003; Okabe, Ito ve Satoh, 2003) bunlardan bazılarıdır. Bizde çalışmamızda, ZR Fungal/Bakteriyal DNA izolasyon kiti (Zymo Research) kullanarak, genomik DNA'yı yüksek saflıkta elde etmiş olduk. Farklı cinslere ait türlerle çalıştığımızdan, 16S rDNA'yı kodlayan DNA kısımlarının çoğaltılması için 27F ve 1522R kodlu evrensel primerler (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003) kullanılmıştır. Biyofilmlerdeki bakterilerin tanılama çalışmalarında, 27F ve 1522 R kodlu primerlerin yanı sıra 1518R, 338F ve 518R (Kwon ve ark., 2002), pA ve pH (Patel ve ark., 2003), 1055F ve 1392R (Webster ve ark., 2004), ARCH622 ve ARCH934 (Zhang ve ark., 2003) gibi diğer primerlerde amaca göre kullanılabilir.

Yaptığımız araştırmada, DNA'nın, PCR ile çoğaltılması amacıyla da hazır PCR kiti (FastStart Taq Polimeraz, dNTPack Kiti, Roche) kullanılmıştır. PCR için en iyi sonuçların elde edildiği koşullar, ürünlerin elektroforezinde temiz bantlar elde edilinceye kadar bağlanma sıcaklığı ve süresinde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir (Kwon ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003; Patel ve ark., 2003). PCR ürünleri alınan izolatlar, yaklaşık 1400bp'lik nükleotid dizilerinin belirlenmesi amacıyla RefGen'e gönderilmiştir. Daha sonra alınan sonuçlar, Gen Bankası'na (BLAST) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve en uygun diziler seçilerek Clustal W programıyla (1.81 versiyonu) referans diziler indirilip izole edilen nükleotid dizileri ile karşılaştırılmıştır. MEGA 4 programı kullanılarak, türlerin

filogenetik ağacı yapılandırılmıştır (Altschul ve ark. 1997; Birgul ve ark., 2007; Tamura ve ark., 2007). 16S rDNA analizleri sonucunda, 20 izolatın tür tayini yapılmıştır. Türlerin  $\gamma$ -Proteobacteria and Firmicutes üyeleri olduğu ve 5 farklı cinse (*Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Klebsiella* ve *Exiguobacterium*) ait, 11 farklı tür (*Pseudoalteromonas agarivorans*, *P. elyakovii*, *P. porphyrae*, *P. haloplanktis*, *P. marina*, *Alteromonas alvinella*, *A. genoviensis*, *Vibrio lentus*, *V. splendidus*, *Klebsiella pneumonia* ve *Exiguobacterium homiense*) tespit edilmiştir (Bulgular; Tablo 3.6, Şekil 3.17). Daha sonra bu izolatların her biri için 16S RNA dizileri kullanılarak, gen bankasından NCBI (BLAST) bir giriş kodu alınarak uluslararası gen bankasında ülkemizde araştırılan türler olarak kayıtları yapılmıştır. Çalışmada her iki marina açısından elde edilen cinsler karşılaştırıldığında; yapılan kimyasal analizler sonucu, oligotrofik olduğu belirlenen Çesme Setur Marina'da, biyofilm yapısında sadece *Pseudoalteromonas* ve *Alteromonas*'ın türlerine rastlanırken, ötrofik özellik gösteren Levent Marina'da *Pseudoalteromonas* ve *Alteromonas*'ın yanısıra *Klebsiella*, *Vibrio* ve *Exiguobacterium* genusu üyeleride tespit edilmiştir. Bu durum, ötrofik ortamda oluşan biyofilmdeki tür çeşitliliğinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Kore, Dae-Ho Dike deniz suyunda, cam yüzeyler üzerinde gelişen biyofilm bakterileri üzerine yapılan bir çalışmada, suya bırakılan cam yüzeylerden yapılan örneklemeler sonucunda, 139 ırk büyüme göstermiştir. Bunlardan 8 tanesi ileri çalışmalar için seçilmiştir. Yapılan biyokimyasal testler ve 16S rDNA analizleri sonucunda, *Bacillus megaterium* (%99), *B. thuringiensis* (%100), *Staphylococcus sapropticus* (%99), *Micrococcus luteus* (%99), *Agarobacterium vitis* (%99) türleri tespit edilmiştir (Kwon ve ark.'nın 2002). Lee ve ark.'nın (2003), Mokpo Limanı'nda (Kore), deniz biyofilmleri üzerine yaptıkları benzeri bir çalışmada ise, 31 izolat kültüre edilmiş ve bunlardan 17 tanesi 16S rDNA analizleri ile tanılanmıştır. İzolatlar,  $\alpha$ -Proteobacteria (*Ochrobactrum anthropi*, *Paracoccus carotinifaciens*);  $\gamma$ -Proteobacteria (*Pseudoalteromonas agarovorans*, *P. piscicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella baltica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. pomeroyi*), CFB (Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides) grubu (*Cytophaga latercula*, *Tenacibaculum mesophilum*), yüksek GC içerikli gram-pozitifler (*Arthrobacter nicotianae*, *Brevibacterium casei*, *B. epidermidis*, *Tsakamurella inchonensis*) ve düşük GC içerikli gram-pozitifler (*Bacillus macroides*,

*Staphylococcus haemolyticus*, *S. warneri*) olarak belirlenmiştir. Patel ve ark.'nın (2003), *Enteromorpha* zoosporlarının yerleşimi ve değişiminde bakteriyal biyofilmin etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında ise, *Enteromorpha*'nın ve kayaların yüzeyleri gibi doğal ortamlardan 99 bakteriyal izolat elde edilmiş ve 16S rDNA dizi analizleri ile 37 ırk tanılanmıştır;  $\gamma$ -Proteobacteria (28 ırk), Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides (CFB) grup (6 ırk) ve  $\alpha$ -Proteobacteria (1 ırk). 2 izolat ise tam tanılanamamış ancak CFB grup ile %93 dizi benzerliği göstermiştir. Ana grup,  $\gamma$ -Proteobacteria'dan *Pseudoalteromonas* (14 ırk), *Vibrio* (5 ırk), *Shewanella* (5 ırk), *Halomonas* (3 ırk) ve *Pseudomonas* (1 ırk) ile temsil edilmektedir. Su kulelerinde biyofilm oluşturan bakteriler üzerine yapılan bir çalışmada ise, izole edilen 12 ırkın moleküler analizler sonucu *Pseudomonas cepacia*, *P. fluorescens*, *Pasteurella haemolytica*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia gladioli* ve *Sphingomonas paucimobilis* olduğu belirlenmiştir (Ceyhan, 2008).

$\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria ve CFB grup bakteriler deniz çevrelerinde kültüre edilebilir baskın gruplardır (Kelly ve Chistoserdov, 2001; Patel ve ark., 2003) ve çeşitli deniz biyofilmlerinde tanılanmışlardır.  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria ve CFB grup bakteriler mercanlarda da baskın olarak bulunurken (Frias-Lopez, Zerkle, Bonheyo ve Fouke, 2002) derin denizlerdeki sıcak su deliklerinde tüpsü kurtçuklarla ilişkili bulunmuşlardır. *Cytophaga laterculai*, *Pseudoalteromonas agarovorans*, *P. piscicida*, *Shewanella baltica* ve *Vibrio pomeroyi* gibi bir çok tür deniz suyundan ya da deniz canlılarından elde edilmişlerdir (Lee ve ark., 2003; Romanenko ve ark., 2003; Thompson ve ark., 2003). *Pseudoalteromonas* üyeleri, deniz suyu, buzullar, ökaryotik deniz canlıları gibi geniş kaynaklardan tespit edilmektedir (Evans, Raftery, Egan, ve Kjelleberg, 2007; Nam ve ark., 2007; Nichols, Garon, Bowman, Raguenees ve Guezennec, 2004). *P. agarovorans* agarolitik deniz izolatıdır (Romanenko ve ark., 2003). *P. marina* ilk olarak Yellow Denizi'ndeki gelgit alanında tanılanmıştır (Nam ve ark., 2007). *Pseudoalteromonas*'lar, bir çok deniz bakterisi içinde nadir ve merak uyandıracak ekolojik özelliklere ve tıbbi öneme sahip bakterilerdir. Bu bakterilerin aktivitelerinin anlaşılması, mikrobiyal ve deniz ekosistemi açısından önemlidir. Henüz



keşfedilmemiş bileşikler; hem ilaç üretimi açısından hem de diğer uygulamalar açısından çok faydalı olabilecektir. Bu grup, geniş kapsamlı enzimatik aktiviteleri olan değerli organizmalardır (Bowman, 2007; Dorbetsov ve ark., 2007).

*Alteromonas*'ların yine bir çok deniz yüzeyinde, kolonizasyona neden olan ilk grup olduğu bilinmektedir (Webster ve ark., 2004). *Alteromonas alvinella* ve *A. genoviensis* deniz suyundan izole edilen türlerdendir. *Vibrionaceae* ailesi, özellikle deniz ve haliç suları gibi sucul çevrelerde bulunan bakterilerden oluşmaktadır ve planktondan balığa kadar çeşitli organizmalarla ilişkilidir (Macian ve ark., 2001). *Exiguobacterium* ise filogenetik olarak *Bacillus* ile ilişkilidir ve çeşitli çevrelerden izole edilebilmektedir (Kim ve ark., 2005). Çalışmaların bir kısmı, EPS üretimleri ve biyofilm oluşturmaları nedeniyle, çeşitli sucul ortamlardan *Pseudoalteromonas*'ların izolasyonu üzerine odaklanmaktadır. Nichols ve ark.'nın (2004) yaptığı bir çalışmada, Antartik sulardan elde edilen *Pseudoalteromonas sp.* ile ilişkili bakterilerin kültürde EPS üretimleri üzerine yapılmıştır. EPS üretme yeteneğindeki bakteriler, öncü kolonize olanlar olarak yüzeye yerleşme konusunda çok başarılıdırlar.

Fouling sürecinde, doğal antibiyotiklere dirençli türler, kolonizasyonda avantaj kazanmakta (Rao, Webb ve Kjelleberg, 2006) ve oluşacak olan ekolojik nişte sayıca baskın hale gelebilmektedirler. EPS üreticisi bu bakterilerin fouling ile ilişkileri üzerine yapılmış bir çok çalışma da bulunmaktadır. Örneğin, Patel ve ark.'nın (2003) *Enteromorpha* zoosporlarının tür spesifik yerleşimi analizlerinde, cam yüzeyler üzerinde biyofilm gelişimi üzerine incelemeler yapılmıştır. Spor yerleşiminde bakteriyal yoğunluk ile zoospor sayısı karşılaştırılmış, arada pozitif bir korelasyon olduğu yani bakteriyal ırkların spor yerleşiminde etkin olduğu görülmüştür. *Vibrio* ve *Shewanella*'nın spor yerleşimini teşviklediği görülürken, bazı *Pseudoalteromonas* ırklarının ise yerleşimi engelleyici etki (lisis) gösterdiği belirlenmiştir. Aynı grubun önceki çalışmalarında ise biyofilmdeki bakteri yoğunluğu ile zoospor sayısı arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. Karışık kültürde oluşan EPS'nin *Ciona intestinalis* larvalarının yerleşiminde etkin olduğu, buna neden olanın ise EPS yapısındaki bakterilerin salgıladığı sinyaller olduğu belirlenmiştir. Son olarak,

*Enteromorpha* sporlarının yüzeye yerleşiminde bakterilerin “quorum sensing” mekanizması sırasında salgıladıkları açıl homoserin laktonun etkili olduğu tespit edilmiştir (Joint ve ark., 2002; Patel ve ark., 2003). Benzer şekilde,  $\gamma$ -Proteobacteria, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides ve bazı gram pozitif bakteri cinslerinin *H. elegans* ve diğer bir çok omurgasız larvalarının (*Anthozoa*, *Scyphozoa* ve *Hydrozoa*) ve alglerin yüzeye yerleşiminde, *Alteromonas espejiana*'nın, *Hydractinia echinata*'nın, *Vibrio alginolyticus*'un ise *Cassiopea andromeda* larvalarının değişiminde etkin oldukları belirlenmiştir (Patel ve ark., 2003; Unabia ve Hadfield, 1999; Webster ve ark., 2004).

Fouling sürecinde etkin olan EPS; oksijen, mineraller, C ve N gibi besinlerin mevcudiyetinde, büyümenin özellikle durgunluk fazında mikroorganizmaların bir kısmı tarafından üretilen bir materyaldir. Besiyeri kompozisyonunun, EPS üretiminde önemli bir yeri vardır ve genellikle C:N oranı yüksek ortamlar kullanılmaktadır. Glukoz, galaktoz ve sakkaroz mikrobiyal türlerin büyük bir kısmının EPS üretimi için yaygın olarak tercih edilen C kaynaklarıdır (Ceyhan, 2008). Çalışmamızda, tür tanısı yapılan 20 izolattın, laboratuvar ortamında iyi EPS üreticisi olduğu görülen 8 tanesi (I50 *Klebsiella pneumonia*, I97 *P. agarivorans*, C73 *A. alvinella*, I2 *P. haloplanktis*, C91 *P. marina*, I96 *A. genoviensis*, C111 *A. alvinella*, I84 *P. elyakovii*), EPS karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla YMG Broth' da fermentasyona tabi tutularak test edilmiştir (Ceyhan ve Ozdemir, 2008; Ko, Lee, Park ve Lee, 2000; Kwon ve ark., 2002; Ozdemir, Ceyhan ve Manav, 2005;). 8 izolat için elde edilen kuru hücre ağırlığı g/l'de  $2,10 \pm 0,18$  (*Pseudoalteromonas marina* C91) ile  $4,00 \pm 0,18$  (*Alteromonas alvinella* C73) arasında değişmektedir. EPS'nin kuru ağırlığı ise  $1,40 \pm 0,11$  (C73 *Alteromonas alvinella*) ile  $2,20 \pm 0,11$  (I50 *Klebsiella pneumonia*) g/l arasında değerler göstermektedir. Bu sonuçlarda, C73 kodlu *Alteromonas alvinella* ırkının en yüksek hücre üretimine, buna karşın en düşük EPS üretimine sahip olduğu gözlenmiştir. C91 (*Pseudoalteromonas marina*)'in en yüksek EPS verimliliğine: 0,80 (EPS kuru ağırlığı/hücre kuru ağırlığı) sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatlar ise, C91'den daha az miktarda EPS verimliliğine sahiptir (Bulgular; Şekil 3.18). Çalışmada, hücre sayısındaki artış ile EPS üretim verimliliği arasında negatif bir

ilişki görülmüştür ( $r=-0,75$ ,  $p=0,05$ ). Yani izole ettiğimiz ırklar, metabolizmalarını EPS üretiminden ziyade, daha yoğun olarak hücre üretiminde kullanmaktadır. Benzer bir sonuç, Kwon ve ark.'larının (2002) yaptığı çalışmada bildirilmiştir. Kuru hücre ağırlıkları (g/l'de)  $0,39\pm 0,15$  (*Agarobacterium vites*) ile  $7,09\pm 0,20$  (*Micrococcus luteus*), Kuru EPS ağırlıkları ise  $0,11\pm 0,01$  (*M. luteus*) ile  $1,32\pm 0,19$  (*Bacillus megaterium*) arasında değişmektedir. *Bacillus megaterium*, 2,60 ile en yüksek EPS verimine sahip izolat olarak bulunmuştur. Deniz suyundaki cam yüzeyde gelişen 8 izolat üzerinde yapılan çalışmada hücre büyümesi ve EPS üretkenliği arasında benzer şekilde negatif ilişki ( $r=-0,74$ ,  $p=0,03$ ) görülmüştür. Bu durumu, ırklar üstün bir hücre üretimi gösterdiklerinde, EPS verimliliğinin düşük olacağı şeklinde tanımlamışlardır. Yani organizmalar, metabolizmalarını hücre sayısını artırma yönünde kullanmışlardır. Yüksek biyokütle ve düşük biyokütleyle sahip gruplar arasındaki EPS verimliliğindeki farklılığı, karbohidratları kullanabilme yeteneklerine bağlamışlardır. Yapılan çalışmada, EPS'nin ancak çözünür formu ölçülebilmektedir. Çünkü EPS iki farklı fiziksel durumda bulunmaktadır. İlki hücre-bağlı form ve diğeri çözünür form şeklindedir. Hücre kütesinden daha çok bu hücre-bağlı EPS formunun bulunduğu örneklerde santrifüjle çöken hücre materyali yoğundur. İzolatların yoğun hücre büyümesi göstermeleri bu nedenledir. Varsayılan sonuç, izolatların iyi hücre büyümesi gösterdikleri ve hücre-bağlı EPS ürettikleri, buna karşın düşük miktarda çözünür formda EPS ürettikleri yönündedir.

Lazarova ve Manem (1995), EPS analizlerinde, biyofilmdeki başlıca bileşenler olarak karbohidratlar ve proteinlerin saptanmasını önermişlerdir. Karbohidrat miktarı tayininde en yaygın kullanılan yöntem Dubois ve ark.'nın (1956) "Spektrofotometrik Fenol Sülfirik Asit" yöntemi, protein miktar tayininde ise Bradford tarafından geliştirilen "Coomassie Brilliant Blue" yöntemidir (Bradford, 1976). Bu yöntemler kolay, güvenilirliği yüksek olup yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kwon ve ark., 2002; Ozdemir ve ark., 2005). Yaptığımız analizlerde, 8 izolatın EPS'sinin şekerleri ve proteinleri içerdiği belirlenmiştir (Bulgular; Tablo 3.7). En yüksek şeker (510,6 mg/l) C111 (*Alteromonas alvinella*) ve protein (582,0 mg/l) miktarı I84 (*Pseudoalteromonas elyakovii*) numaralı izolatta tespit edilmiştir. Çalışmada izolatların tamamında düşük şeker ve protein miktarları belirlenmiştir. Benzeri bir

çalışmada, glukoz eklenmiş olan sıvı kültürde, *Pseudoalteromonas* türlerinin ürettiği EPS de yapılan kolorimetrik kimyasal analizlerde protein, nötral şekerler ve üronik asitlerin miktarlarının düşük olduğu görülmüştür. Benzer biyokimyasal kompozisyonlar sıcak su alanlarındaki topluluklarından elde edilen *Alteromonas* türlerinden elde edilen EPS ile ilgili ilk çalışmalarda da gözlenmiştir (Nichols ve ark., 2004; Raguenes, Cambon-Bonavita, Lohier, Boisset ve Guezennec, 2003;). İzolatlarımız şeker ve protein içerikleri açısından genel olarak birbirine yakın sonuçlar gösterirken, sadece I84 kodlu *P. elyakovii*'nin protein (582,0mg/l) içeriğinin şekerlerden (177,0 mg/l) daha fazla olduğu belirlenmiştir. Fang ve ark.'nın (2002) toksik metaller ve kimyasalların biyofilm oluşumu üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, üretilen EPS'lerde proteinlerin şekerlerden yüksek olduğu görülmüş ve toksik metaller ve kimyasalların bulunuşunun protein içerikli EPS üretimini daha fazla teşviklediği şeklinde yorumlanmıştır. Ancak çalışmamızda, laboratuvar koşullarında bireysel türlerin ürettiği EPS'lerin karakterize edildiği, deniz ortamında karışık kültürlerin bir arada bulunması sonucu türler arası etkileşimlerin olabileceği ve üretilen EPS'lerde farklılık bulunabileceği göz ardı edilmemelidir.

İzolatların laboratuvar koşullarında ince tabaka kromatografisi yöntemi ile tespit edilen şeker kompozisyonları, Şekil 3.21 ile 3.22 ve Tablo 3.8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, izolatlardaki ana şeker bileşenleri laktoz (glukoz ve galaktoz) ve sakkaroz (glukoz ve laktoz) gibi disakkaritlerin hidrolizlenmediği görülmüştür. Bu sorunun aşılmasında, kromatografide kullanılan yürütücülerin ya da uygulanan konsantrasyonlarının değiştirilmesi yoluna gidilebilir. İzolatların ikisinde, I2 (*P. haloplanktis*) ve I96 (*A. genoviensis*)'da sadece laktoz (glukoz ve galaktoz) tespit edilirken, diğer izolatların glukoz, ramnoz, laktoz ya da galaktoz içerdikleri belirlenmiştir. Kwon ve ark.'nın (2002) benzer yöntem kullanarak yaptıkları çalışmada, deniz suyundaki cam yüzey üzerinden elde edilen izolatların laboratuvar ortamında ürettikleri EPS'nin ana şeker bileşenleri glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, ksiloz ve riboz olarak belirlenmiştir. Benzer şeker kompozisyonları 0,5 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile hidrolizleme basamağından sonra tespit edilmiştir. Ceyhan (2008) tarafından yapılan çalışmada, soğutma suyu kulelerinden elde edilen izolatların ürettiği EPS'lerin HPLC ile belirlenen içeriğinde başlıca glukoz bulunduğu, diğer

tanımlanan şekerlerin ise galaktoz, mannoz, ramnoz, fruktoz, arabinoz olduğu tespit edilmiştir. Şeker kompozisyonu, kültür kompozisyonu değiştiğinde farklılık gösterebilmektedir. Bir çok raporda verildiği üzere, çeşitli *Pseudomonas* ırklarından elde edilen hücre dışı polisakkaritlerde yine başlıca şeker olarak glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnoz tespit edilmiştir. Bazı EPS'lerin yüksek ve düşük moleküler ağırlık olarak iki kısımdan oluştuğu öngörülmektedir. Örneğin, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* tarafından üretilen yüksek moleküler ağırlığa sahip EPS'nin 5:1:1 oranında sırasıyla galaktoz, glukoz ve ramnoz içerdiği gözlenmiştir (Ceyhan, 2008).

Bazı türlerin, aynı ortamda kendi ırkları içinde bile EPS kompozisyonu açısından farklılık gösterdikleri bildirilmiştir Hücre dışı polimerik maddelerdeki şeker kompozisyonu, bakteriyal türlere ve bunların elde edildiği farklı kompozisyondaki kaynaklara bağlıdır (Lindberg, Holmbom, Väisänen, Weber ve Salkinojan-Salonen, 2001). Ko ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmalarda; EPS üretiminin, mikrobiyal tür, en uygun C/N oranı, kültivasyon sıcaklığı ve süresi gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin, C kaynağı olarak glukoz kullanıldığında, *Lactobacillus casei* CG 11, *Sphingomonas pancimobilis*'in en yüksek EPS verimine sahip olduğu görülmüştür. EPS'leri, C/N oranı açısından incelendiğinde; C/N oranı 3/1 oranından fazla olduğunda, verimliliğin (kuru EPS ağırlığı/kuru hücre ağırlığı) düştüğü belirlenmiştir. Maksimum EPS verimi, *Xanthomonas campestris* için ise optimum C/N oranı 2/1 olarak tespit edilmiştir. Yine, EPS verimliliğine NaCl'ün etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, *Hahella chejuensis*'in %1'lik NaCl miktarında en iyi EPS verimine sahip olduğu görülmüştür. EPS verimi için ortam sıcaklığı 20-25C°'de olması gerektiği, 30C°'nin üstünde bu verimin düştüğü de önemli koşullar arasındadır. Laboratuvardaki, kültivasyon süresi çalışmalarında ise EPS üretiminin 120. saatte en yüksek verime ulaştığı görülmüştür.

Son olarak, tür tanısı yapılan 20 izolatanın, çalışmada kullanılan antifouling boyalara bireysel dirençlerinin saptanması amacıyla, minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum bakterisidal konsantrasyonu testleri yapılmıştır.

Testlerin sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.9'da verilmiştir. Antipas, test edilen tüm bakterilere karşı zayıf bir antibakteriyal etki göstermiştir. Flor içeren silikon boya ve çinko oksit ile bakır oksit içeren boyalar tüm test organizmaları için benzer özellik göstermiştir. Triazin diamin ve bakır oksit içeren boya en etkili olarak bulunmuştur. Bu boyanın hiç bir seyreltmesinde bakteriyal büyüme gözlenmemiştir. I17 (*P. marina*), C90 (*P. marina*), I96 (*A. genoviensis*), C102 (*P. elyakovii*), I85 (*P. porphyrae*), I87 (*P. porphyrae*), C91 (*P. marina*) ve I2 (*P. haloplanktis*), numaralı izolatların tüm boya türlerine diğer türlerden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalarımızın önerdiği sonuçlar, bireysel biyofilm bakterileri antifouling boyalara duyarlı iken bakteriyal biyofilm gelişiminden sonra boyalara karşı direnç kazanmış olmalarıdır.

Boya araştırmalarında, deneysel gözlemlerin önemli yer tuttuğu görülmektedir. Biyofilmlere antifoulinglerin etkisi, biyofilmin yenilenme oranları, biyofilmden bağımsız su kolonundaki potansiyel biyosit salınımı gibi cevaplanması gereken sorular bulunmaktadır. Yeni antifouling boyaların üretim sürecinde; öncelikle modelde dikkat edilmesi gereken koşullar, boyanın kararlı ve değişken koşullardaki davranışdır. Çalışmalarda, deniz ortamının ve gemi işletim parametrelerinin etkilerinin incelenmesi gereklidir. Seçilen deneylere bağlı olarak, standart laboratuvar testlerinden (abiyotik koşullar) sonra, deniz ortamında boyanın davranışı araştırılmalıdır. Antifouling bileşiklerin salınımında önemli noktalar boyanın formülasyonu, uygulandığı yüzey ve çevre koşullarıdır. Boya denemelerinde, yapay su ortamındaki boya salınımı, doğal deniz suyuna oranla 39 kez daha fazla olabilir. Bu sapmanın potansiyel bir nedeni, doğal çevrelerde antifouling kaplı yüzeylerde biyofilm oluşmasının kaçınılmaz olmasıdır. Boyanın uygulandığı yüzeyde, mikrobiyal tabakanın oluşumunun etkiside mutlaka irdelenmelidir (Almeida ve ark., 2007; Chambers ve ark., 2006; Yebra ve ark., 2006a).

Sonuç olarak yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler; biyofilm içinde yer alan bakteri türlerinin, bireysel olarak antifouling boyalara maruz bırakıldığında, bu boyalara karşı oldukça duyarlı iken; biyofilm yapısı içinde mevcut boyalara karşı dirençli olduklarını göstermektedir. Fouling olayında büyük oranda sorunun çözümü,

biyofilm oluşumunun engellenmesidir. Bu amaçla, biyofilmi oluşturan türlerin tüm dünya genelinde tanılanması, aralarındaki etkileşimi sağlayan sinyal moleküllerinin belirlenmesi ve moleküler düzeyde bu sinyal maddelerinin salgılanmasının engellenmesi, ya da polisakkarit şekerleri arasında bağların enzimatik olarak yok edilmesi ve dolayısıyla biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerinde çalışmaların yoğunlaşmasının gerektiği bunların yanı sıra yine denizdeki bakterilerden elde edilen antimikrobiyal bileşiklerin yenilikçi ve pratik uygulamalarıyla, biyofoulinge karşı mücadelede boyalarda etkin olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Allison, D. G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19, 139-150.
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & De Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59, 2–20.
- 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 (17,) 3389–3402.
- Arda, M. (1997). *Temel mikrobiyoloji*. Ankara: Medisan Yayın Evi.
- Ausubel, F. M., Brent, R., & Kingston, R. E. (1997). *Short protocols in molecular biology* (3rd. ed.). New york: John Wiley ve Sons.
- Aydın, Ş. ve Küçüksezgin, F. (2006). *Investigation of heavy metal fractions in surface sediments from Bakırçay and Gediz Rivers*. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Baumann, P., & Baumann, L. (1981). The marine Gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel *The prokaryotes*. (1302–1331). Berlin:Springer-Verlag.
- Berntsson, K. M., & Jonsson, P. P. (2003). Temporal and spatial patterns in recruitment and succession of a temperate marine fouling assemblage: a comparison of static panels and boat hulls during the boating eason. *Biofouling*, 19, 187-195.
- Birgul, O., Ozcengiz, G., Coleri, A., & Cokmus, C. (2007). Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 985–992.



- Blake, R. C., & Ohmura, N. (1998). Aporusticyanin mediates the specific adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Society for Industrial Microbiology Annual Meeting Program*, 58.
- Blast (bt.). *Genbankası dizi analizleri*. 10 Aralık 2007. <http://ncbi.nih.gov>.
- Bowman, J. P. (2007). Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 5, 220-241.
- Boureau, T., Jacques, M. A., Berruyer, R., Dessaux, Y., Dominguez, H., & Morris, C. E. (2004). Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broad-leaved endive. *Microbial Ecology*, 47, 87–95.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
- Brady, R. F. (2001). A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 43, 188-192.
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The genus *Klebsiella*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Ed.). *The prokaryotes* (3rd ed.) (159–196). Singapore: Springer.
- Brock, T. D., & Madigan, M. T. (1994). *Biology of microorganisms* (7th ed.). New York: Prentice-Hall International.
- Burgess, J. G., Boyd, K. G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A., & Adams, D. R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19, 197-205.

- Callow, M. E. & Fletcher, R. L. (1994). The influence of low surface energy materials on bioadhesion: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 34, 333–348.
- Ceyhan, N. (2008). *Çeşitli sistemlerde sorun oluşturan hücre dışı polisakkarit üreten mikroorganizmaların polisakkaritlerinin biyoparçalanması ve parçalanma etkinliğinin saptanması*. İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Ceyhan, N., & Ozdemir, G. (2008). Extracellular polysaccharides produced by cooling water tower biofilm bacteria and their possible degradation, *Biofouling*, 24 (2), 129–135.
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201, 3642–3652.
- Characklis, W. G., & Marshall, K. C. 1990. *Biofilms*. New York: Wiley.
- Chen, X., & Stewart, P. S. (2002). Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 718–720.
- Christensen, B. E., & Characklis, W. G. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, 10, 181-202.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 18-22.
- Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V. L., & Hermansson, M. (1997). Conjugative plasmids isolated from bacteriocin marine environments show various degrees of

- homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4692-4697.
- Dale, J. W., & Schantz, M. V. (2002). *From genes to genomes concepts and applications of DNA technology*. Chichester: John Wiley ve Sons.
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Davies, D., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-298.
- DeBeer, D., & Stoodley, P. (1994). *Microbial biofilms* (3rd ed.). Berlin: Springer-Verlag Press.
- Decho, A. V. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20, 1257-1273.
- DeLaCourt, F. H., & Vries, H. V. (1973). Advances in fouling prevention. *Progress in Organic Coatings*, 1, 375-404.
- DiMartino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*, 154 (1), 9-16.
- Dobretsov, S., Dahms, H. W., & Qian, P. Y. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, 22, 43-54.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 8 (9), 881-890.

- Donlan R. M., & Costerton, W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), 167-193.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11, 30-36.
- Drake, L. A., Meyer, A. E., Forsberg, R. L., Baier, R. E., Doblin, M. A., Heinemann, S., et. al. (2005). Potential invasion of microorganisms and pathogens via ‘interior hull fouling’: biofilms inside ballast water tanks. *Biological Invasions*, 7, 969–982.
- Dubois, M., Gilles, A. K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20, 2444–2449.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology*, 2, 343- 347.
- Egan, S., James, S., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2002). Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology*, 4, 433- 442.
- Elkins, J. G., Hassett, D. J., Stewart, P. S., Schweizer, H. P., & McDermott, T. R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4594–4600.

- Ersoy, E. (2005). *İzmir ili deniz suyu ve deniz canlılarındaki lüminoz bakterilerin izolasyonu ve tanınması*. İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Evans, F. F., Raftery, M. J., Egan, S., & Kjelleberg, S. (2007). Profiling the secretome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ). *Journal of Proteome Research*, 6, 967–975.
- Fang, H. H. P., Xu, L., & Chan, K. (2002). Effect of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 36, 4709-4716.
- Farmer, J. J. & Hickman-Brenner, F. W. (2006). The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. . M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Ed.). *The prokaryotes* (3rd ed.) (508-563). Singapore: Springer.
- Foster, T. J., & Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6, 484–488.
- Franks, A., Haywood, P., Holmström, C., Egan, S., Kjelleberg, S., & Kumar, N. (2005). Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules*, 10, 1286-1291.
- Frias-Lopez, J., Zerkle, A. L., Bonheyo, G. T., & Fouke. B. W. (2002). Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2214-2228.
- Frühling, A., Schumann, P., Hippe, H., Straubler, B., & Stackebrandt, E. (2002). *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1171–1176.

- Geldiay, R. ve Kocataş, A. (2002). *Deniz biyolojisine giriş*. Bornova: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi.
- Gerhardt, P., & Drew, S. W. (1994). Liquid culture. P., Gerhardt, R. G. E., Murray, W. A., Wood & N. R., Krieg (Ed.). *Methods for general and molecular bacteriology* (224-247). Washington : ASM Press.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M, Kremling, K. 1983. *Methods of seawater analysis second revised and extended*. Weinheim' Verlag Chemie.
- Grobe, K. J., Zahller, J., & Stewart, P. S. (2002). Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 10–15.
- Hojo, S., Komatsu, M., Okuda, R., Takahashi, N., & Yamada, T. (1994). Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *Journal of Dental Research*, 73, 1853–1857.
- Holmström, C., & Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 285-293.
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., & Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 47-58.
- Huang, H., Gong, C. S. & Tsao, G. T. (2002). Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98 (100), 687–698.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-173.

- Joint, I., Tait, K., Callow, M. E., Callow, J. A., Milton, D., Williams, P. et al. (2002). Cell-to-cell communication across the prokaryote–eukaryote boundary. *Science*, 298, 1207.
- Karaboz, İ. ve Sukatar, A. (2004). Bakterilerde sosyal davranışlar (Bakterilerde iletişim mekanizmaları). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 05 (02), 23-32.
- Kelly, K. M., & Chistoserdov, A. Y. (2001). Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island). *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 85-95.
- Kjelleberg, S., & Molin, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, 5, 254–258.
- Kill, S., Weinell, C. E., Pedersen, M. S., & Dam-Johansen, K. (2001). Analysis of self-polishing antifouling paints using rotary experiments and mathematical modeling. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40, 3906-3920.
- Kim, I. G., Lee, M. H., Jung, S. Y., Song, J. J., Oh, T. K., & Yoon, J. H. (2005). *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 885–889.
- Ko, S. H., Lee, H. S., Park, S. H., & Lee, H. K. (2000). Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5, 181-185.
- Kocak, F. (2007). Bryozoan assemblages at some marinas in the Aegean Sea. *Journal of Marine Biology Assessment*. Published on-line. 1-6.

- Kocak, F., & Kucuksezgin, F. (2000). Sessile fouling organisms and environmental parameters in the marinas of the Turkish Aegean coast. *Indian Journal of Marine Sciences*, 29, 149-157.
- Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, 30, 235–248.
- Krieg, N. R., & Holt, C. G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams veWilkins Press.
- Kucuksezgin, F., Kontas, A., Altay, O., & Uluturhan, E. (2005). Elemental composition of particulate matter and nutrient dynamics in the Izmir Bay (Eastern Aegean). *Journal of Marine System*, 56, 67-84.
- Kucuksezgin F., Kontas, A., Altay, O., Uluturhan, E., & Darilmaz, E. (2006). Assessment of marine pollution in Izmir Bay: Nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environment International*, 32, 41–51.
- Kwon, K. K., Lee, H. S., Jung, S. Y., Yim, J. H., & Lee, H. K. (2002). Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. *The Journal of Microbiology*, 40, 260-266.
- Lazarova, V., & Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water research*, 29, 2227-2245.
- Lee, Y. K., Kwon, K. K., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H., & Lee, H. K. (2003). Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *The Journal of Microbiology*, 41, 183-188.
- Lee. W., & De Beer, D. (1995). Oxygen and pH microprofiles above corroding mild steel covered with a biofilm. *Biofouling*, 8, 273–280.



- Leone, S., Silipo, A., Nazarenko, E. L., Lanetta, R., Parrilli, M., & Molinaro, A. (2007). Molecular structure of endotoxins from Gram-negative, marine bacteria: an update. *Marine Drugs*, *5*, 85-112.
- Lindberg, L. E., Holmbom, B. R., Väisänen, O. M., Weber, A. M. L., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2001). Sugar composition of biofilms produced by paper mill bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*, 638-643.
- Long, R. A., Qureshi, A., Faulkner, D. J., & Azam, F. (2003). 2-n-pentyl-4-quinolinol produced by a marine *Alteromonas* sp. and its potential ecological and biogeochemical roles. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 568-576.
- Macian, M. C., Ludwig, W., Aznar, R., Grimont, P. A. D., Schleifer, K. H., Garay, E., et al. (2001). *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from mediterranean oysters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*, 1449–1456.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms* (10<sup>th</sup> ed.). New Jersey: Pearson Education.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., et al. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, *26*, 3–16.
- Michigan State University (2006). *Biyofilm yapısı*.16 Mart 2006, <http://www.msu.edu>
- Mikhailov, V. V., Romanenko, A. L., & Ivanova., E. P. (2006). The Genus *Alteromonas* and related bacteria. . M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Ed.). *The prokaryotes* (3rd ed.) (597–645). Singapore: Springer.

- Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A., Gaylarde, C. C., & Surman, S. B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *41*, 247-259.
- Naik, R. R., Brott, L. L., Rodriguez, F., Agarwal, G., Kirkpatrick, S. M., & Stone, M. O. (2003). Bio-inspired approaches and biologically derived materials for coatings. *Progress in Organic Coatings*, *47*, 249-255.
- Nam, Y. D., Chang, H. W., Park, J. R., Kwon, H. Y., Quan, Z. X., Park, Y. H., et al. (2007). *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*, 12-18.
- Nandakumar, K., Matsunaga, H., & Takagi, M. (2003). Microfouling studies on experimental test blocks of steelmaking slag and concrete exposed to seawater off Chiba, Japan. *Biofouling*, *19* (4), 257-267.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiology Reviews*, *43*, 496-518.
- Nichols, C. A. M, Garon, S., Bowman, J. P., Raguenes, G., & Guezennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology*, *96*, 1057-1066.
- Okabe, S., Ito, T., & Satoh, H. (2003). Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*, 322-334.

- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30, 295–304.
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., & Manav, E. (2005). Utilization in alginate beads for Cu(II) and Ni(II) adsorption of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05. *World Journal of Microbiology ve Biotechnology*, 21, 163–167.
- Pasmore, M., Todd, P., Smith, S., Baker, D., Silverstein, J., Coons, D., et al. (2001). Effect of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling. *Journal of Membrane Science*, 194, 15–32.
- Pasmore, M., & Costerton, J. W. (2003). Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 407–413.
- Patel, P., Callow, M. E., Joint, I., & Callow, J. A. (2003). Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environmental Microbiology*, 5 (5), 338–349.
- Perea, E. (2001). Clinical relevance of laboratory susceptibility data. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1, 29-32.
- Raguene, G., Cambon-Bonavita, M. A., Lohier, J. F., Boisset, C., & Guezennec, J. (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 448–452.
- Railkin, A. I. (2004). Marine biofouling colonization processes and defenses. New York: CRC Pres Inc.

- Rao, D., Webb, J. S., & Kjelleberg, S. (2006). Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5547-5555.
- Rättö, M., Suikho, M. L., & Siika-aho, M. (2005). Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 109-114.
- Rickwood, D., & Hames, B. D. (1982). Gel electrophoresis of nucleic acids a practical approach. Washington: IR Press.
- Romanenko, L. A., Zhukova, N. V., Rhode, M., Lysenko, A. M., Mikhailov, V., & Stackebrandt, E. (2003). *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 125-131.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184, 1140–1154.
- Scheuermann, T. R., Camper, A. K., & Hamilton, M. A. (1998). Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 208, 23-33.
- Schultz, M. P., & Swain, G. W. (2000). The influence of biofilms on skin friction drag. *Biofouling*, 15, 129-139.
- Seipp, S., Wittig, K., Stiening, B., Bottger, A., & Leitz, T. (2006). Metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria) is caspase-dependent. *International Journal of Developmental Biology*, 50, 63-70.

- Shankar, S., Ye, R. W., Schlichtman, D., & Chakrabarty, A. M. (1995). Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and regulation of gene expression. *Advances Enzymology and Related Molecular Biology*, 70, 221-255.
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: Implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14 (9), 389-397.
- Skerratt, J. H., Bowman, J. P., Hallegraeff, G., James, S; Nichols, P. D. (2002). Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecological Progress Series*, 244, 1-15.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F.J., (1995). *Biometry* (3rd ed). New York: Freeman and Company.
- Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sutherland, I. W. (2001a). The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9 (5), 222-227.
- Sutherland, I. W. (2001b). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework, *Microbiology*, 147, 3-9.
- Staneck, J. L., & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic *Actinomycetes* by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*, 226-231.
- Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E. Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989). *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu* (3. Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teksirler Serisi.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biological Evolution*, *24*, 1596-1599.
- Tang, R. J., & Cooney, J. J. (1998). Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*, 275-280.
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., Li, Y., Gomez-Gil, B., Vandenberghe, J., Hoste, B., et. al. (2003). *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine mammals. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, *53*, 753-759.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of Bacteriology*, *182*, 6482-6489.
- Turetgen, I. (2004). Comparison of the efficacy of free residual chlorine and monochloramine against biofilms in model and full scale cooling towers. *Biofouling*, *20* (2), 81-85.
- Unabia, C. R. C., & Hadfield, M. G. (1999). Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biology*, *133*, 55-64.
- Valkirs, A. O., Seligman, P. F., Haslbeck, E., & Caso, J. S. (2003). Measurement of copper release rates from antifouling paint under laboratory and in situ conditions: Implications for loading estimation to marine water bodies. *Marine Pollution Bulletin*, *46*, 763-779.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (1999). Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry*, *13*, 135-143.

- Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. fouling and antifouling:some basic aspects. *Marine Ecological Progress Series*, 58 (1-2), 175-185.
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-2679.
- Webster, N. S., Smith, L. D., Heyward, A. J., Watts, J. E. M., Webb, R. I., Blackall, L. L., et. al., (2004). Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2), 1213–1221.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E, Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., et. al. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413, 860–864.
- Yebra, D. M., Kill, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Review. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 75–104.
- Yebra, D. M., Kill, S., Weinebell, C. E., & Dam-Johansen, K. (2005). Mathematical modeling of chemically-active antifouling catings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 75-104.
- Yebra, D. M., Kill, S., Weinebell, C. E., & Dam-Johansen, K. (2006a). Effects of marine microbial biofilms on the biocide release rate from antifouling paints—A model-based analysis. *Progress in Organic Coatings*, 57, 56–66.
- Yebra, D. M., Kill, S., Weinebell, C. E., & Dam-Johansen, K. (2006b). Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints. *Biofouling*, 22 (1), 33-41.

- Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39, 221-231
- Zhang, X., Bishop, P. L., & Kinkle, B. K. (1999). Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers in Biofilms. *Water Science Technology*, 39, 211-218.
- Zhang, T., Fang, H. H. P., & Ko, B. C. B. (2003). Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 101–106.





```

Query  918  TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGA  977
      |||
Sbjct  906  TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGA  965

Query  978  GAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGT  1037
      |||
Sbjct  966  GAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGT  1025

Query  1038  CGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT  1097
      |||
Sbjct  1026  CGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT  1085

Query  1098  AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG  1157
      |||
Sbjct  1086  AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG  1145

Query  1158  GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG  1217
      |||
Sbjct  1146  GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG  1205

Query  1218  GCGCATACAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGT  1277
      |||
Sbjct  1206  GCGCATACAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGT  1265

Query  1278  CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG  1337
      |||
Sbjct  1266  CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG  1325


Query  1338  AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG  1397
      |||
Sbjct  1326  AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG  1385

Query  1398  GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTA  1441
      |||
Sbjct  1386  GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTA  1429

```

Ek 1 İzolat I17'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

```

>  gb|DQ537520.1 Pseudoalteromonas elyakovii strain BSi20610 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=1500

Score = 2634 bits (1426), Expect = 0.0
Identities = 1456/1470 (99%), Gaps = 3/1470 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  4      AACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCTCGTAACAGAAAGTAGCTTGCTAC  63
      |||
Sbjct  25      AACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC-GGTAACAGAAAGTAGCTTGCTAC  83

Query  64      TTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTTAGGTGGGGGAC  123
      |||
Sbjct  84      TTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTTAGGTGGGGGAC  143

Query  124     AACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAGGGGGCTTCGGCT  183
      |||
Sbjct  144     AACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAGGGGGCTTCGGCT  203

Query  184     CTCGCCTAAAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGG  243
      |||
Sbjct  204     CTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGG  263

Query  244     CAACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGGACTGAGACACGGTCCA  303
      |||
Sbjct  264     CGACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  323

```


Query	304	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC	363
Sbjct	324	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC	383
Query	364	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGT	423
Sbjct	384	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGT	443
Query	424	TAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT	483
Sbjct	444	TAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT	503
Query	484	GCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC	543
Sbjct	504	GCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC	563
Query	544	GTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT	603
Sbjct	564	GTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT	623
Query	604	TTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAA	663
Sbjct	624	TTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAA	683
Query	664	TGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGC	723
Sbjct	684	TGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGC	743
Query	724	TCATGTACGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA	783
Sbjct	744	TCATGTACGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA	802
Query	784	ACGATGTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTCAAAGCTAACTGCATTAAGT	843
Sbjct	803	ACGATGTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTCAAAGCTAAC-GCATTAAAGT	861
Query	844	AAACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA	903
Sbjct	862	AGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA	921
Query	904	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGAC	963
Sbjct	922	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGAC	981
Query	964	ATACAGAGAACTTACTAGAGATAGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGTGCA	1023
Sbjct	982	ATACAGAGAACTTACTAGAGATAGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGTGCA	1041
Query	1024	TGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGCAGCAACCCC	1083
Sbjct	1042	TGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGCAGCAACCCC	1101
Query	1084	TATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCG	1143
Sbjct	1102	TATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCG	1161
Query	1144	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGC	1203
Sbjct	1162	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGC	1221
Query	1204	TACAAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCG	1263
Sbjct	1222	TACAAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCG	1281
Query	1264	TCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1323
Sbjct	1282	TCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1341
Query	1324	GTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCAT	1383
Sbjct	1342	GTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCAT	1401
Query	1384	GGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCGTCGGGAGGACGTTTACCTCGGAGT	1443

```

Sbjct  1402  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1461
          GGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT
Query  1444  GATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1473
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1462  GATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1491

```

Ek 2 İzolat C102'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

 [gb|AY771715.1](#) *Pseudoalteromonas porphyrae* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1509

subject sequence by: Sort alignments for this

E value [Score](#) [Percent](#)

[identity](#) [Query start position](#)

[Subject start position](#)

Score = 1415 bits (766), Expect = 0.0  
Identities = 771/773 (99%), Gaps = 2/773 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query	5	ACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTT	64
Sbjct	17	ACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTT	76
Query	65	TGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTTTGGTGGGGACAA	124
Sbjct	77	TGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTTTGGTGGGGACAA	136
Query	125	CAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGACCTTCGG	184
Sbjct	137	CAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGACCTTCGG	196
Query	185	GCCTCACGCCAAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAAGTAATGGCTTACC	244
Sbjct	197	GCCTCACGCCAAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAAGTAATGGCTTACC	256
Query	245	AAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG	304
Sbjct	257	AAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG	316
Query	305	CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	364
Sbjct	317	CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	376
Query	365	AGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAA	424
Sbjct	377	AGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAA	436
Query	425	AGGGTGTGTTTTAATAGAGCATATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT	484
Sbjct	437	AGGGTGTGTTTTAATAGAGCATATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT	496
Query	485	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	544
Sbjct	497	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	556
Query	545	AAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT	604
Sbjct	557	AAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT	616
Query	605	GCATTTTCAAACGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAAGTGTAGCGGT	664

```


Sbjct 617 GCATTTCGAACTGGCAAAGTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGT 676
Query 665 GAAATGCGTAGAGATCTGA-GGAATACCGATGGCGAAG-CAGCCACCTGGGTCAACACTG 722
      |||
Sbjct 677 GAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTG 736
Query 723 ACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 775
      |||
Sbjct 737 ACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 789

Score = 1227 bits (664), Expect = 0.0
Identities = 672/675 (99%), Gaps = 3/675 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 778 TCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA-GATTAGATA-CCTGGTAGTCCACGCCGTAAA 835
      |||
Sbjct 741 TCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA 800
Query 836 CGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAG 895
      |||
Sbjct 801 CGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAG 860
Query 896 ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACA 955
      |||
Sbjct 861 ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACA 920
Query 956 AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTTACTTGCAT 1015
      |||
Sbjct 921 AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTTACTTGCAT 980
Query 1016 ACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATG 1075
      |||
Sbjct 981 ACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATG 1040
Query 1076 GCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA 1135
      |||
Sbjct 1041 GCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA 1100
Query 1136 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGA 1195
      |||
Sbjct 1101 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGA 1160
Query 1196 GGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTA 1255
      |||
Sbjct 1161 GGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTA 1220
Query 1256 CAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTC 1315
      |||
Sbjct 1221 CAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTC 1279
Query 1316 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGT 1375
      |||
Sbjct 1280 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGT 1339
Query 1376 ATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG 1435
      |||
Sbjct 1340 ATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG 1399
Query 1436 GAGTGGGTTGCTCCA 1450
      |||
Sbjct 1400 GAGTGGGTTGCTCCA 1414

```

Ek 3 İzolat I87'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu


  
 > [gb|AY563032.1](#) *Pseudoalteromonas marina* strain *mano6* 16S ribosomal RNA gene,
   
 partial sequence
   
 Length=1438

Score = 2628 bits (1423), Expect = 0.0
   
 Identities = 1430/1433 (99%), Gaps = 2/1433 (0%)
   
 Strand=Plus/Plus

```

Query 6      TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCT 65
             |||
Sbjct 8      TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCT 67

Query 66     GACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGT 125
             |||
Sbjct 68     GACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGT 127

Query 126    TGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCC 185
             |||
Sbjct 128    TGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCC 187

Query 186    TTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGA 245
             |||
Sbjct 188    TTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGA 247

Query 246    TCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGGACACGGTCCAGACTCC 305
             |||
Sbjct 248    TCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGGACACGGTCCAGACTCC 307

Query 306    TACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCG 365
             |||
Sbjct 308    TACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCG 367

Query 366    CGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTGTGAG 425
             |||
Sbjct 368    CGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTGTGAG 427

Query 426    TTAATACCTCATATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC 485
             |||
Sbjct 428    TTAATACCTCATATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC 487

Query 486    AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGC 545
             |||
Sbjct 488    AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGC 547

Query 546    AGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAA 605
             |||
Sbjct 548    AGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAA 607

Query 606    CTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA 665
             |||
Sbjct 608    CTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA 667

Query 666    GAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGT 725
             |||
Sbjct 668    GAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGT 727

Query 726    ACGAAAGCGTGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT 785
             |||
Sbjct 728    ACGAAAGCGTGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT 787

Query 786    CTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCC 845
             |||
Sbjct 788    CTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCC 847

Query 846    TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGT 905
             |||
Sbjct 848    TGGG-AGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGT 906

Query 906    GGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGAG 965
             |||
Sbjct 907    GGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGAG 966
  
```

```

Query 966  AACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGCT 1025
          |||
Sbjct 967  AACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTG-T 1025

Query 1026  CGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT 1085
          |||
Sbjct 1026  CGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT 1085

Query 1086  AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG 1145
          |||
Sbjct 1086  AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG 1145

Query 1146  GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG 1205
          |||
Sbjct 1146  GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG 1205

Query 1206  GCGCATACAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGT 1265
          |||
Sbjct 1206  GCGCATACAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGT 1265

Query 1266  CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG 1325
          |||
Sbjct 1266  CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG 1325

Query 1326  AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG 1385
          |||
Sbjct 1326  AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG 1385

Query 1386  GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1438
          |||
Sbjct 1386  GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1438
    
```

Ek 4 İzolat C90'a ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

> [emb|AM887686.1](#) *Alteromonas genovensis* partial 16S rRNA gene, strain LMG 24079  
 Length=1507

subject sequence by: Sort alignments for this

E value [Score](#) [Percent](#)

[identity](#) [Query start position](#)

[Subject start position](#)

```

Score = 1404 bits (760), Expect = 0.0
Identities = 764/766 (99%), Gaps = 0/766 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 836  CCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGGACAGGATTAGATACCC 895
          |||
Sbjct 711  CCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC 770

Query 896  TGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTTTGTGACTTTAAGTCGTGAGTAGC 955
          |||
Sbjct 771  TGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTTTGTGACTTTAAGTCGTGAGTAGC 830

Query 956  GAAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG 1015
          |||
Sbjct 831  GAAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG 890

Query 1016  AATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA 1075
          |||
Sbjct 891  AATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA 950

Query 1076  ACCTTACCTTACTTGGACATGCAGAGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAAC 1135
          |||
Sbjct 951  ACCTTACCTTACTTGGACATGCAGAGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAAC 1010
    
```

```

Query 1136 TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC 1195
          |||
Sbjct 1011 TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC 1070

Query 1196 CGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTTGGTTGGGCACTCTAAGGAGAC 1255
          |||
Sbjct 1071 CGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAGAC 1130

Query 1256 TGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGT 1315
          |||
Sbjct 1131 TGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGT 1190

Query 1316 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGATGTGGAGCG 1375
          |||
Sbjct 1191 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGATGTGGAGCG 1250

Query 1376 GACCCCTTAAAGAATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1435
          |||
Sbjct 1251 GACCCCTTAAAGAATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1310

Query 1436 AATCGCTAGTAATCGCAAGTCAGAATATTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1495
          |||
Sbjct 1311 AATCGCTAGTAATCGCAAGTCAGAATATTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1370

Query 1496 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGATGCAAAGAAGTAGTTAGTTAACCTTCGGGAGA 1555
          |||
Sbjct 1371 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGATGCAAAGAAGTAGTTAGTTAACCTTCGGGAGA 1430

Query 1556 ACGATTACCACTTTGTGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1601
          |||
Sbjct 1431 ACGATTACCACTTTGTGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1476

```

Score = 1376 bits (745), Expect = 0.0  
Identities = 745/745 (100%), Gaps = 0/745 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 2 CATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGAAGTGCTTGCACTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTG 61
          |||
Sbjct 35 CATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGAAGTGCTTGCACTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTG 94

Query 62 AGTAATGCTTGGGAACCTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATAC 121
          |||
Sbjct 95 AGTAATGCTTGGGAACCTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATAC 154

Query 122 CGCATAATGTCTACGGACCAAACGGGGCTTAGGCTTCGGCGCAGAGAGAGGCCCAAGTGA 181
          |||
Sbjct 155 CGCATAATGTCTACGGACCAAACGGGGCTTAGGCTTCGGCGCAGAGAGAGGCCCAAGTGA 214

Query 182 GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAG 241
          |||
Sbjct 215 GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAG 274

Query 242 GAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 301
          |||
Sbjct 275 GAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 334

Query 302 GAATATGTCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT 361
          |||
Sbjct 335 GAATATGTCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT 394

Query 362 CGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTGAGTAGTTAATACCTGCTCACCGTG 421
          |||
Sbjct 395 CGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTGAGTAGTTAATACCTGCTCACCGTG 454

Query 422 ACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG 481
          |||
Sbjct 455 ACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG 514

Query 482 GTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGCTAG 541
          |||
Sbjct 515 GTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGCTAG 574

```



```

Query 542 ATGTGAAAGCCCCGAGCTCAACTTGGGATGGTCATTTAGAACTGGCAGACTAGAGTCTTG 601
          |||
Sbjct 575 ATGTGAAAGCCCCGAGCTCAACTTGGGATGGTCATTTAGAACTGGCAGACTAGAGTCTTG 634


Query 602 GAGAGGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACATCA 661
          |||
Sbjct 635 GAGAGGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACATCA 694

Query 662 GTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGA 721
          |||
Sbjct 695 GTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGA 754

Query 722 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC 746
          |||
Sbjct 755 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC 779

```

Ek 5 İzolat C39'a ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

 [gb|DQ537518.1](#) *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain BSi20594 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1497

Score = 2625 bits (1421), Expect = 0.0  
Identities = 1430/1434 (99%), Gaps = 2/1434 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 5 CATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGG 64
          |||
Sbjct 47 CATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGG 106

Query 65 TGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAAT 124
          |||
Sbjct 107 TGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAAT 166

Query 125 ACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGT 184
          |||
Sbjct 167 ACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGT 226

Query 185 GGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGGAG 244
          |||
Sbjct 227 GGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGGAG 286

Query 245 AGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG 304
          |||
Sbjct 287 AGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG 346

Query 305 GGGAAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC 364
          |||
Sbjct 347 GGGAAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC 406

Query 365 TTCGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTGTGAGTTAATACCTCACATCTG 424
          |||
Sbjct 407 TTCGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTGTGAGTTAATACCTCACATCTG 466

Query 425 TGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA 484
          |||
Sbjct 467 TGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA 526

Query 485 GGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCG 544
          |||
Sbjct 527 GGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCG 586

Query 545 AGATGTGAAAGCCCCGGGCTCA-CCTGGGAAGTGCATTTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGT 603
          |||
Sbjct 587 AGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGT 646

```

```

Query 604 GATAGAGGGTGGTAGAATTTACGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATAC 663
          |||
Sbjct 647 GATAGAGGGTGGTAGAATTTACGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATAC 706

Query 664 CGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGC 723
          |||
Sbjct 707 CGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGC 766

Query 724 AA-CGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTAGAAAGCTCGGAA 782
          |||
Sbjct 767 AAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTAGAAAGCTCGGAA 826

Query 783 CCTCGGTTCTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA 842
          |||
Sbjct 827 CCTCGGTTCTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA 886

Query 843 AGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT 902
          |||
Sbjct 887 AGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT 946

Query 903 TCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGA 962
          |||
Sbjct 947 TCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGT 1006

Query 963 TTGGTGCCTTCGGGAGCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGA 1022
          |||
Sbjct 1007 TTGGTGCCTTCGGGAGCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCATCAGCTCGTGTGTGA 1066

Query 1023 GATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATG 1082
          |||
Sbjct 1067 GATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATG 1126

Query 1083 CTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGT 1142
          |||
Sbjct 1127 CTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGT 1186

Query 1143 CATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTGC 1202
          |||
Sbjct 1187 CATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTGC 1246

Query 1203 GAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA 1262
          |||
Sbjct 1247 GAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA 1306

Query 1263 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAGAATGACGCGGTGAATACG 1322
          |||
Sbjct 1307 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAGAATGACGCGGTGAATACG 1366

Query 1323 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGA 1382
          |||
Sbjct 1367 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGA 1426

Query 1383 TAGTCTAACCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGTGATTTCATGACTGGGGTGAA 1436
          |||
Sbjct 1427 TAGTCTAACCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGTGATTTCATGACTGGGGTGAA 1480

```

Ek 6 İzolat I6'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

[ref|NR\\_025509.1|](#) *Pseudoalteromonas agarovorans* strain KMM 255 16S ribosomal RNA, partial sequence  
 [emb|AJ417594.1|](#) *Pseudoalteromonas agarovorans* 16S rRNA gene, strain KMM 255  
 Length=1505

Score = 2689 bits (1456), Expect = 0.0  
 Identities = 1477/1486 (99%), Gaps = 5/1486 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query	5	ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGTCGCTCAACAGAGAGTAGCTTGCTAC	64
Sbjct	16	ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAG-CGGT-AACAGAGAGTAGCTTGCTAC	73
Query	65	TTTGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGAC	124
Sbjct	74	TTTGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGAC	133
Query	125	AACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCT	184
Sbjct	134	AACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCT	193
Query	185	CTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG	244
Sbjct	194	CTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG	253
Query	245	CGACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA	304
Sbjct	254	CGACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA	313
Query	305	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC	364
Sbjct	314	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC	373
Query	365	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGT	424
Sbjct	374	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGT	433
Query	425	TAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT	484
Sbjct	434	TAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT	493
Query	485	GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC	544
Sbjct	494	GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC	553
Query	545	GTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT	604
Sbjct	554	GTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT	613
Query	605	TTCGAACTGGCAAAC TAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA	664
Sbjct	614	TTCGAACTGGCAAAC TAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA	673
Query	665	TGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGC	724
Sbjct	674	TGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGC	733
Query	725	TCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGG-ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	783
Sbjct	734	TCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	793
Query	784	CGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGCTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAG	843
Sbjct	794	CGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGCTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAG	853
Query	844	ACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA	903
Sbjct	854	ACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA	913
Query	904	AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACAT	963
Sbjct	914	AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACAT	973
Query	964	ACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATG	1023
Sbjct	974	ACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATG	1033
Query	1024	GCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTA	1083
Sbjct	1034	GCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTA	1093

```

Query 1084 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGA 1143
Sbjct 1094 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGA 1153

Query 1144 GGAAGGTGGGACGACGTCAGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTA 1203
Sbjct 1154 GGAAGGTGGGACGACGTCAGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTA 1213

Query 1204 CAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTC 1263
Sbjct 1214 CAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTC 1273

Query 1264 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAT 1323
Sbjct 1274 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAT 1333

Query 1324 ATCAGAATGATGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGG 1383
Sbjct 1334 ATCAGAATGATGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGG 1393

Query 1384 GAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTAGAGGAGGACGTTTACCACGGAGTG 1443
Sbjct 1394 GAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTG-GGAGGACGTTTACCACGGAGTG 1452

Query 1444 ATT-AGGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAGGGGAACC 1488
Sbjct 1453 ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAGGGGAACC 1498

```

#### Ek 7 İzolat C36'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

```


> gb|AF288360.1|AF288360 Alteromonas alvinellae 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1459

Score = 2542 bits (1376), Expect = 0.0
Identities = 1436/1464 (98%), Gaps = 8/1464 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 5 CGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACATTTCTAGCTTGTCTAGAAGA 64
Sbjct 1 CGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACATTTCTAGCTTGTCTAGAAGA 60

Query 65 TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTCGGGAGGGGGATAACAG 124
Sbjct 61 TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTTCGAGGGGGATAACAG 120

Query 125 TTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCGGG-CTTCGGCTC-G- 181
Sbjct 121 TTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAA-CGGGGCTTCGGCTCCGG 179

Query 182 CACCTAAAGAGAGGCCCAAGTGAATAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCA 241
Sbjct 180 CGC--AAAGAGAGGCCCAAGTGAATAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCG 237

Query 242 ACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCGA 301
Sbjct 238 ACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCGA 297


Query 302 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCAT 361
Sbjct 298 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCAT 357

Query 362 GCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTG 421
Sbjct 358 GCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTA 417

```

Query	422	GTAGTTAATACCTGCCAGCTGTGACGTTAAACAACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGC	481
Sbjct	418	GTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAAACAACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGC	477
Query	482	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC	541
Sbjct	478	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC	537
Query	542	ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGATGGTCATTT	601
Sbjct	538	ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGATGGTCATTT	597
Query	602	AGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGAGAGGGGAGTGGAAATTCAGGTGTAGCCGTGAAATG	661
Sbjct	598	AGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGAGAGGGGAGTGGAAATTCAGGTGTAGCCGTGAAATG	657
Query	662	CGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTC	721
Sbjct	658	CGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTC	717
Query	722	ATGTGCGAAGGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACG	781
Sbjct	718	ATGTGCGAAGGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACG	777
Query	782	CTGTCTACTAGCTGTGTGTGAATTTAATTCGTGAAGTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGTA	841
Sbjct	778	CTGTCTACTAGCTGT-GTGTGTCTTTAAGRCGTGC-GTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGTA	835
Query	842	GACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAC	901
Sbjct	836	GACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAC	895
Query	902	AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACA	961
Sbjct	896	AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACA	955
Query	962	TGCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGACACAGGTGCTGCAT	1021
Sbjct	956	TGCAGAGAACTTTCAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGACACAGGTGCTGCAT	1015
Query	1022	GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT	1081
Sbjct	1016	GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT	1075
Query	1082	GTCCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG	1141
Sbjct	1076	GTCCCTAGTTGCCAGCCTTAAAGTTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG	1135
Query	1142	GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTAC	1201
Sbjct	1136	GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTAC	1195
Query	1202	AATGGCATTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGTGGAGCGGACCCCTTAAAGCATGTGC	1261
Sbjct	1196	AATGGCATTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTGC	1255
Query	1262	TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGG	1321
Sbjct	1256	TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGG	1315
Query	1322	TCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGG	1381
Sbjct	1316	TCAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGG	1375
Query	1382	AGTGGGATGCAAAAAGAAGTAGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACCTTGTGTT	1441
Sbjct	1376	AGTGGGATGCAAAAAGAAGTAGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACCTTGTGTT	1435
Query	1442	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC	1465
Sbjct	1436	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC	1459

## Ek 8 İzolat C111'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

>  [gb|AY292936.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AY292936.1) *Vibrio lentus strain Sat201* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length=1548

Score = 2736 bits (1481), Expect = 0.0  
Identities = 1489/1493 (99%), Gaps = 0/1493 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query  2      TGATCGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAACAAATCCTT 61
      |||
Sbjct  25      TGATCGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAACAAATCCTT 84

Query  62      CGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTG 121
      |||
Sbjct  85      CGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTG 144

Query  122     ATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGA 181
      |||
Sbjct  145     ATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGA 204

Query  182     GGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 241
      |||
Sbjct  205     GGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 264

Query  242     GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 301
      |||
Sbjct  265     GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 324

Query  302     AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC 361
      |||
Sbjct  325     AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC 384

Query  362     GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGTACTTT 421
      |||
Sbjct  385     GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGTACTTT 444

Query  422     CAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGTTAATAGCTACATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAA 481
      |||
Sbjct  445     CAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGTTAATAGCAACATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAA 504

Query  482     GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGA 541
      |||
Sbjct  505     GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGA 564

Query  542     ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCT 601
      |||
Sbjct  565     ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCT 624

Query  602     CAACCTCGGAAGTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTT 661
      |||
Sbjct  625     CAACCTCGGAAGTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTT 684

Query  662     CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGCGGCCCCC 721
      |||
Sbjct  685     CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGCGGCCCCC 744

Query  722     TGGACAGATACTGACTCAAAATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 781
      |||
Sbjct  745     TGGACAGATACTGACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 804

Query  782     GTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGG 841
      |||
Sbjct  805     GTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGG 864

Query  842     AGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAA 901
      |||

```

```

Sbjct 865 AGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTTAAACTCAAATGAA 924
Query 902 TTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 961
      |||
Sbjct 925 TTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 984
Query 962 CTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATCCAGCGGAGACGCAGGAGTGCCTTCGGGAGCTC 1021
      |||
Sbjct 985 CTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATCCAGCGGAGACGCAGGAGTGCCTTCGGGAGCTC 1044
Query 1022 TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCG 1081
      |||
Sbjct 1045 TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCG 1104
Query 1082 CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACTCCAGGGAGAC 1141
      |||
Sbjct 1105 CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACTCCAGGGAGAC 1164
Query 1142 TGCCGGTGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGT 1201
      |||
Sbjct 1165 TGCCGGTGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGT 1224
Query 1202 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCGAGCTAGCGATGGTGAGCG 1261
      |||
Sbjct 1225 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATGGTGAGCG 1284
Query 1262 AATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1321
      |||
Sbjct 1285 AATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1344
Query 1322 AATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1381
      |||
Sbjct 1345 AATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1404
Query 1382 CCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGTAGGTAGTCTAACCTTCGGGAGG 1441
      |||
Sbjct 1405 CCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGTAGGTAGTCTAACCTTCGGGAGG 1464
Query 1442 ACGCTTACCACCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCC 1494
      |||
Sbjct 1465 ACGCTTACCACCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCC 1517

```

### Ek 9 İzolat 180'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

[gb|DQ351341.1](#) *Exiguobacterium homiense* strain H1-R8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=1484

Score = 2728 bits (1477), Expect = 0.0  
 Identities = 1482/1484 (99%), Gaps = 2/1484 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 9 GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAATCGACGGAACCCCTTCGGGGGGA 68
      |||
Sbjct 1 GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAATCGACGGAACCCCTTCGGGGGGA 60
Query 69 AGTCGACGGAATGAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTAAGAACCCTGCCCCAGGTCTG 128
      |||
Sbjct 61 AGTCGACGGAATGAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTAAGAACCCTGCCCCAGGTCTG 120
Query 129 GGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCATCGGACCGCATGGTCCGAGG 188
      |||
Sbjct 121 GGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCATCGGACCGCATGGTCCGAGG 180
Query 189 ATGAAAGGCGCTTCGGCGTCGCTGGGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGG 248
      |||
Sbjct 181 ATGAAAGGCGCTTCGGCGTCGCTGGGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGG 240
Query 249 GTAATGGCCCAACAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG 308

```

Sbjct	241	 GTAATGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG	300
Query	309	GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTCCACAATGGAC	368
Sbjct	301	 GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTCCACAATGGAC	360
Query	369	GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGTTCTGT	428
Sbjct	361	 GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGTTCTGT	420
Query	429	TGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCGAGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAA	488
Sbjct	421	 TGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCGAGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAA	480
Query	489	GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA	548
Sbjct	481	 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA	540
Query	549	ATTATGGGCGTAAAGCGCGCGCAGCGCCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT	608
Sbjct	541	 ATTATGGGCGTAAAGCGCGCGCAGCGCCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT	600
Query	609	CAACCGGGGAGGGCCATTGGAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAAATTC	668
Sbjct	601	 CAACCGGGGAGGGCCATTGGAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAAATTC	660
Query	669	CACGTGTAGCCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGACTTC	728
Sbjct	661	 CACGTGTAG-CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGAC-TC	718
Query	729	TTTGGCCTATAACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC	788
Sbjct	719	 TTTGGCCTATAACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC	778
Query	789	TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC	848
Sbjct	779	 TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC	838
Query	849	TGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAG	908
Sbjct	839	 TGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAG	898
Query	909	GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG	968
Sbjct	899	 GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG	958
Query	969	AACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGG	1028
Sbjct	959	 AACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGG	1018
Query	1029	GCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG	1088
Sbjct	1019	 GCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG	1078
Query	1089	TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGA	1148
Sbjct	1079	 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGA	1138
Query	1149	GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG	1208
Sbjct	1139	 GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG	1198
Query	1209	AGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGA	1268
Sbjct	1199	 AGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGA	1258
Query	1269	GCCAATCCCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGT	1328
Sbjct	1259	 GCCAATCCCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGT	1318
Query	1329	CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTAC	1388



```

Sbjct  1319  CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAC  1378
Query   1389  ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTAGGG  1448
      |||
Sbjct  1379  ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTAGGG  1438
Query   1449  AGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA  1492
      |||
Sbjct  1439  AGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA  1482

```

Ek 10 İzolat I105'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

> [gb|AY563032.1](#) *Pseudoalteromonas marina strain mano6* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1438

subject sequence by: Sort alignments for this

E value [Score](#) [Percent](#)

[identity](#) [Query start position](#)

[Subject start position](#)

Score = 1452 bits (786), Expect = 0.0  
Identities = 791/793 (99%), Gaps = 2/793 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query   4      ACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTT  63
      |||
Sbjct   4      ACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTT  63
Query  64      TGCTGACGAGCGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAA  123
      |||
Sbjct  64      TGCTGACGAGCGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAA  123
Query  124     CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT  183
      |||
Sbjct  124     CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT  183
Query  184     CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCA  243
      |||
Sbjct  184     CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCA  243
Query  244     ACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA  303
      |||
Sbjct  244     ACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA  303
Query  304     CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCAT  363
      |||
Sbjct  304     CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCAT  363
Query  364     GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTG  423
      |||
Sbjct  364     GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTG  423
Query  424     TGAGTTAATACCTCATACTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  483
      |||
Sbjct  424     TGAGTTAATACCTCATACTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  483
Query  484     CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGAGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT  543
      |||
Sbjct  484     CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGAGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT  543
Query  544     ACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTT  603
      |||
Sbjct  544     ACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTT  603

```

```

Query 604 CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGG-GTAGCGGTGAAATG 662
          |||
Sbjct 604 CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATG 663

Query 663 CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 722
          |||
Sbjct 664 CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 723

Query 723 ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACA 782
          |||
Sbjct 724 ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAAC- 782

Query 783 GATGTCTACTAGA 795
          |||
Sbjct 783 GATGTCTACTAGA 795

Score = 1312 bits (710), Expect = 0.0
Identities = 712/713 (99%), Gaps = 0/713 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 797 GTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT 856
          |||
Sbjct 726 GTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT 785

Query 857 GTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCG 916
          |||
Sbjct 786 GTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCG 845

Query 917 CCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGG 976
          |||
Sbjct 846 CCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGG 905

Query 977 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGA 1036
          |||
Sbjct 906 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGA 965

Query 1037 GAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGT 1096
          |||
Sbjct 966 GAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGT 1025

Query 1097 CGTCAGCTCGTGTGTGAGATATTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT 1156
          |||
Sbjct 1026 CGTCAGCTCGTGTGTGAGATATTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT 1085

Query 1157 AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG 1216
          |||
Sbjct 1086 AGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG 1145

Query 1217 GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG 1276
          |||
Sbjct 1146 GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG 1205

Query 1277 GCGCATACAGAGTGCTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCGTCGTAGT 1336
          |||
Sbjct 1206 GCGCATACAGAGTGCTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCGTCGTAGT 1265

Query 1337 CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG 1396
          |||
Sbjct 1266 CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAG 1325


Query 1397 AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG 1456
          |||
Sbjct 1326 AATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG 1385

Query 1457 GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1509
          |||
Sbjct 1386 GGTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1438

```

Ek 11 İzolat C46'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

```

>  dbj|AB000389.1 Pseudoalteromonas elyakovii gene for 16S rRNA
Length=1508

Score = 2699 bits (1461), Expect = 0.0
Identities = 1476/1482 (99%), Gaps = 6/1482 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 3   ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTT 62
          |||
Sbjct 21   ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTT 80

Query 63   TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAA 122
          |||
Sbjct 81   TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAA 140

Query 123  CAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT 182
          |||
Sbjct 141  CAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT 200

Query 183  CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG 242
          |||
Sbjct 201  CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG 260

Query 243  ACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA 302
          |||
Sbjct 261  ACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA 320

Query 303  CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT 362
          |||
Sbjct 321  CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT 380

Query 363  GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTA 422
          |||
Sbjct 381  GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTA 440

Query 423  GTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGC 482
          |||
Sbjct 441  GTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGC 500

Query 483  CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT 542
          |||
Sbjct 501  CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT 560

Query 543  ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTT 602
          |||
Sbjct 561  ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTT 620

Query 603  CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATG 662
          |||
Sbjct 621  CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATG 680

Query 663  CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 722
          |||
Sbjct 681  CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 740

Query 723  ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCGTAAACG 782
          |||
Sbjct 741  ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCGTAAACG 800

Query 783  ATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGAC 842
          |||
Sbjct 801  ATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGAC 860

Query 843  CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAAATTGACGGGGGCCCGCACAA 902
          |||
Sbjct 861  CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA-TTGACGGGGGCCCGCACAA 919

Query 903  GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATA 962
          |||
Sbjct 920  GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATA 979

```

```

Query 963 CAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGG 1022
          |||
Sbjct 980 CAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGG 1039

Query 1023 CTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA 1082
          |||
Sbjct 1040 CTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAA-GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA 1098

Query 1083 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAAACCG 1142
          |||
Sbjct 1099 TCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAA-CTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAA-CCG 1156

Query 1143 GAGGAAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTG 1202
          |||
Sbjct 1157 GAGGAA-GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTG 1215

Query 1203 CTACAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGC 1262
          |||
Sbjct 1216 CTACAATGGCGCATAACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGC 1275

Query 1263 GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG 1322
          |||
Sbjct 1276 GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG 1335

Query 1323 CGTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA 1382
          |||
Sbjct 1336 CGTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA 1395


Query 1383 TGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTTCGGGAGGACGTTTACCACGGA 1442
          |||
Sbjct 1396 TGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCT-CGGGAGGACGTTTACCACGGA 1454

Query 1443 GTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAG 1484
          |||
Sbjct 1455 GTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAG 1496

```

## Ek 12 İzolat I84'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

```

>  gb|AY771715.1 Pseudoalteromonas porphyrae 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1509

Score = 2564 bits (1388), Expect = 0.0
Identities = 1395/1398 (99%), Gaps = 2/1398 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 4 ACGCTGGCGGCGAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTT 63
          |||
Sbjct 17 ACGCTGGCGGCGAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTT 76

Query 64 TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTTTGGTGGGGACAA 123
          |||
Sbjct 77 TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTTTGGTGGGGACAA 136

Query 124 CAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGACCTTCGG 183
          |||
Sbjct 137 CAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGACCTTCGG 196

Query 184 GCCTCAGCCAAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACC 243
          |||
Sbjct 197 GCCTCAGCCAAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACC 256

Query 244 AAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG 303
          |||
Sbjct 257 AAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG 316

```




```

Query 1383 ATGGGAGTGGGTTGCTCC 1400
          |||
Sbjct 1396 ATGGGAGTGGGTTGCTCC 1413

```

Ek 13 İzolat I85'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

 [gb|AY620972.1](#) *Vibrio splendidus strain 636* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1020

Sort alignments for this

subject sequence by:

<a href="#">identity</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Score</a>	<a href="#">Percent</a>
<a href="#">Subject start position</a>	<a href="#">Query start position</a>		

Score = 1249 bits (676), Expect = 0.0  
Identities = 679/680 (99%), Gaps = 1/680 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCC 60
          |||
Sbjct 45 ACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCC 104

Query 61 AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGA 120
          |||
Sbjct 105 AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGA 164

Query 121 AACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCG 180
          |||
Sbjct 165 AACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCG 224

Query 181 CGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC 240
          |||
Sbjct 225 CGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC 284

Query 241 GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 300
          |||
Sbjct 285 GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACT 344

Query 301 CCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGC 360
          |||
Sbjct 345 CCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGC 404

Query 361 CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAG 420
          |||
Sbjct 405 CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAG 464

Query 421 CGTTAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA 480
          |||
Sbjct 465 CGTTAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA 524

Query 481 GCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAT 540
          |||
Sbjct 525 GCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAT 584

Query 541 GCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAACGCATTGTA 600
          |||
Sbjct 585 GCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAACGCATTGTA 644

Query 601 AACTGGTGAAC TAGACTGTAGAGGGGGT AGAATTT CAG -TGTAGCGGTGAAATGCG 659
          |||
Sbjct 645 AACTGGTGAAC TAGACTGTAGAGGGGGT AGAATTT CAGTGTAGCGGTGAAATGCG 704

```

```

Query 660 TAGAGATCTGAAGGAATACC 679
      |||
Sbjct 705 TAGAGATCTGAAGGAATACC 724

Score = 350 bits (189), Expect = 1e-92
Identities = 189/189 (100%), Gaps = 0/189 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 682 TGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGG 741
      |||
Sbjct 832 TGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGG 891

Query 742 GAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG 801
      |||
Sbjct 892 GAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG 951

Query 802 CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAAGC 861
      |||
Sbjct 952 CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAAGC 1011

Query 862 CAGCGGAGA 870
      |||
Sbjct 1012 CAGCGGAGA 1020

```

#### Ek 14 İzolat I9'a ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

[ref|NR\\_025509.1](#) *Pseudoalteromonas agarivorans* strain KMM 255 16S ribosomal RNA, partial sequence  
 [emb|AJ417594.1](#) *Pseudoalteromonas agarovorans* 16S rRNA gene, strain KMM 255  
 Length=1505

subject sequence by: Sort alignments for this  
E value [Score](#) [Percent](#)  
[Query start position](#)  
[identity](#)  
[Subject start position](#)

```

Score = 1245 bits (674), Expect = 0.0
Identities = 674/674 (100%), Gaps = 0/674 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 695 CTCGGCTCTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA 754
      |||
Sbjct 818 CTCGGCTCTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA 877

Query 755 GGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT 814
      |||
Sbjct 878 GGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT 937

Query 815 CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTT 874
      |||
Sbjct 938 CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTT 997

Query 875 TGGTGCCTTCGGGAACCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGGTGGAG 934
      |||
Sbjct 998 TGGTGCCTTCGGGAACCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGGTGGAG 1057

Query 935 ATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGC 994
      |||
Sbjct 1058 ATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGC 1117

Query 995 TGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC 1054
      |||
Sbjct 1118 TGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC 1177

```

```

Query 1055 ATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTGCG 1114
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1178 ATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTGCG 1237

Query 1115 AACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC 1174
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1238 AACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC 1297

Query 1175 TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAGAATGATGCGGTGAATACGT 1234
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1298 TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCAGAATGATGCGGTGAATACGT 1357

Query 1235 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGAT 1294
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1358 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGAT 1417

Query 1295 AGTCTAACCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA 1354
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1418 AGTCTAACCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA 1477

Query 1355 CAAGGTAGCCCTAG 1368
          ||||||||||||||
Sbjct 1478 CAAGGTAGCCCTAG 1491

```

Score = 1238 bits (670), Expect = 0.0  
Identities = 689/697 (98%), Gaps = 6/697 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 2 ACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGAC 61
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 34 ACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGAC 93

Query 62 GGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCT 121
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 94 GGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCT 153

Query 122 AATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTAGATTGGCCCA 181
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 154 AATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTAGATTGGCCCA 213

Query 182 AGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTF 241
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 214 AGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTF 273

Query 242 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 301
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 274 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 333

Query 302 GTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG 361
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 334 GTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG 393

Query 362 GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAG 421
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 394 GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAG 453

Query 422 CTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC 481
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 454 CTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC 513

Query 482 GGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGAGGCGGTTTGTAA 541
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 514 GGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGAGGCGGTTTGTAA 573

Query 542 GCGAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTTGAAGTGGCAAAGTAGAG 601
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 574 GCGAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTTGAAGTGGCAAAGTAGAG 633

Query 602 TGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTAG-TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAG 660
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 634 TGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTAG-TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGA- 692

```



```

Query 661 AATACCGATGGCGATG-CAGC-AC-TGGGTCACCACT 694
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 693 A-TACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACT 728

```

Ek 15 İzolat 197'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

```


> gb|AF288360.1|AF288360 Alteromonas alvinellae 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1459

Score = 2542 bits (1376), Expect = 0.0
Identities = 1436/1464 (98%), Gaps = 8/1464 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 5      CGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGA 64
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1      CGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGA 60

Query 65     TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTCGGGAGGGGGATAACAG 124
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 61     TGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTCGGGAGGGGGATAACAG 120

Query 125    TTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCGGG-CTTCGGCTC-G- 181
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 121    TTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAA- CGGGGCTTCGGCTCCGG 179

Query 182    CACCTAAAGAGAGGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCA 241
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 180    CGC--AAAGAGAGGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCG 237

Query 242    ACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAG 301
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 238    ACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAG 297

Query 302    CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCAT 361
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 298    CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCAT 357

Query 362    GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTG 421
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 358    GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTA 417

Query 422    GTAGTTAATACCTGCCAGCTGTGACGTTAACAACAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGC 481
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 418    GTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAACAACAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGC 477

Query 482    CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC 541
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 478    CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC 537

Query 542    ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATGGTCATTT 601
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 538    ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATGGTCATTT 597

Query 602    AGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATG 661
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 598    AGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATG 657

Query 662    CGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTC 721
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 658    CGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTC 717

Query 722    ATGTGCGAAGGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACG 781
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |


```

```

Sbjct 718 ATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACG 777
Query 782 CTGTCTACTAGCTGTTGTGTGAATTTAATTCGTGAAGTAGCGAAGCTAACCGCTAAGTA 841
      |||
Sbjct 778 CTGTCTACTAGCTGT-GTGTGTCTTTAAGRCGTGC-GTAGCGAAGCTAACCGCTAAGTA 835
Query 842 GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAC 901
      |||
Sbjct 836 GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAC 895
Query 902 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACA 961
      |||
Sbjct 896 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACA 955
Query 962 TGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTGCTGCAT 1021
      |||
Sbjct 956 TGCAGAGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTGCTGCAT 1015
Query 1022 GGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTT 1081
      |||
Sbjct 1016 GGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTT 1075
Query 1082 GTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG 1141
      |||
Sbjct 1076 GTCCTTAGTTGCCAGCCTTAAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG 1135
Query 1142 GAAGGTGGGGACGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTAC 1201
      |||
Sbjct 1136 GAAGGTGGGGACGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTAC 1195
Query 1202 AATGGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTATGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGCATGTCG 1261
      |||
Sbjct 1196 AATGGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTATGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTCG 1255
Query 1262 TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGG 1321
      |||
Sbjct 1256 TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGG 1315
Query 1322 TCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG 1381
      |||
Sbjct 1316 TCAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG 1375
Query 1382 AGTGGGATGCAAAAAGAAGTAGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACCTTGTGTT 1441
      |||
Sbjct 1376 AGTGGGATGCAAAAAGAAGTAGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACCTTGTGTT 1435
Query 1442 TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC 1465
      |||
Sbjct 1436 TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC 1459

```

Ek 16 İzolat C73'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

>  [emb|AM887686.1](#) *Alteromonas genoviensis* partial 16S rRNA gene, strain LMG 24079  
Length=1507

Score = 2704 bits (1464), Expect = 0.0  
Identities = 1464/1464 (100%), Gaps = 0/1464 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 3 AACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGAAGTGCTTGCACTTT 62
      |||
Sbjct 13 AACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGAAGTGCTTGCACTTT 72
Query 63 GCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCCTTTCGAGGGGGATAAC 122
      |||
Sbjct 73 GCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCCTTTCGAGGGGGATAAC 132

```



```

Query 1203 GGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGTGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTCGCTAG 1262
          |||
Sbjct 1213 GGCATTTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGTGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTCGCTAG 1272

Query 1263 TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAGTCA 1322
          |||
Sbjct 1273 TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAGTCA 1332


Query 1323 GAATATTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGT 1382
          |||
Sbjct 1333 GAATATTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGT 1392

Query 1383 GGGATGCAAAAGAAGTAGTTAGTTTAACTTCGGGAGAACGATTACCACCTTTGTGTTTCA 1442
          |||
Sbjct 1393 GGGATGCAAAAGAAGTAGTTAGTTTAACTTCGGGAGAACGATTACCACCTTTGTGTTTCA 1452

Query 1443 TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1466
          |||
Sbjct 1453 TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1476

```

Ek 17 İzolat 196'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

 [gb|EU078621.1](#) *Klebsiella pneumoniae* strain HR16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1534

subject sequence by: Sort alignments for this

<a href="#">identity</a>	E value	<a href="#">Score</a>	<a href="#">Percent</a>
<a href="#">Subject start position</a>	<a href="#">Query start position</a>		
Score = 1528 bits (827), Expect = 0.0			
Identities = 839/844 (99%), Gaps = 4/844 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
Query 798	AGAGATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA-GAATACCGGTGGCGAAGG	856	
Sbjct 665	AGA-ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG	723	
Query 857	C-GCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	915	
Sbjct 724	CGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	783	
Query 916	ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGA-TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG	974	
Sbjct 784	ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG	843	
Query 975	GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAC	1034	
Sbjct 844	GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAC	903	
Query 1035	CAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACG	1094	
Sbjct 904	CAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACG	963	
Query 1095	CGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTC	1154	
Sbjct 964	CGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTC	1023	
Query 1155	GGGAACGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTT	1214	
Sbjct 1024	GGGAACGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTT	1083	
Query 1215	AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGAACTCAA	1274	

```

Sbjct 1084 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1143
Query 1275 AGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT 1334
Sbjct 1144 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1203
Query 1335 TACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGA 1394
Sbjct 1204 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1263
Query 1395 GCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG 1454
Sbjct 1264 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1323
Query 1455 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCT 1514
Sbjct 1324 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1383
Query 1515 GTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTT 1574
Sbjct 1384 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1443
Query 1575 CGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCG 1634
Sbjct 1444 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 1503
Query 1635 TAGG 1638
Sbjct 1504 |||| TAGG 1507

```

Score = 1461 bits (791), Expect = 0.0  
Identities = 796/798 (99%), Gaps = 1/798 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 4 CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGTCTCTCGGG 63
Sbjct 28 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 87
Query 64 TGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA 123
Sbjct 88 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 147
Query 124 CTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCC 183
Sbjct 148 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 207
Query 184 TCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAG 243
Sbjct 208 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 267
Query 244 GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCC 303
Sbjct 268 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 327
Query 304 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC 363
Sbjct 328 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 387
Query 364 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGC 423
Sbjct 388 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 447
Query 424 GTTAAGGTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCTAACTCCG 483
Sbjct 448 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 507
Query 484 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG 543
Sbjct 508 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 567
Query 544 CGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGA 603


```

```

Sbjct 568 |||CGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA 627
Query 604 TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA 663
Sbjct 628 |||TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA 687
Query 664 ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG 723
Sbjct 688 ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG 747
Query 724 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 783
Sbjct 748 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 807
Query 784 ACGATGTCGATTTGAGAG 801
Sbjct 808 ACGATGTCGATTTG-GAG 824

```

Ek 18 İzolat 150'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu

 [gb|DQ537518.1](#) *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain BSi20594 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1497

Score = 2612 bits (1414), Expect = 0.0  
Identities = 1422/1426 (99%), Gaps = 0/1426 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 4 ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTACAGAAAAGTAGCTTGCTACTT 63
Sbjct 26 ACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTACAGAAAAGTAGCTTGCTACTT 85
Query 64 TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGACAA 123
Sbjct 86 TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGACAA 145
Query 124 CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT 183
Sbjct 146 CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCT 205
Query 184 CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCA 243
Sbjct 206 CGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCA 265
Query 244 ACGATCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCCACTGGAAGTGGACACGGTCCAGA 303
Sbjct 266 ACGATCCCTAGCTGGTTTGTAGAGGATGATCAGCCCACTGGAAGTGGACACGGTCCAGA 325
Query 304 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCAT 363
Sbjct 326 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCAT 385
Query 364 GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTG 423
Sbjct 386 GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGTG 445
Query 424 TGAGTTAATACCTCACATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC 483
Sbjct 446 TGAGTTAATACCTCACATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC 505
Query 484 CAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT 543
Sbjct 506 CAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT 565
Query 544 ACGCAGGCGGTTTGTAAAGCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTT 603


```

```

Sbjct 566 |||||
ACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTT 625
Query 604 CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATG 663
Sbjct 626 |||||
CGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATG 685
Query 664 CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGATGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 723
Sbjct 686 |||||
CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC 745
Query 724 ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACG 783
Sbjct 746 |||||
ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACG 805
Query 784 ATGTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGAC 843
Sbjct 806 |||||
ATGTCTACTAGAAGCTCGGAACCTCGGTTCTGTTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGAC 865
Query 844 CGCCTGGGAGTACGCGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGCCCGCACAAAG 903
Sbjct 866 |||||
CGCCTGGGAGTACGCGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGCCCGCACAAAG 925
Query 904 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATFCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTACACTTGACATAC 963
Sbjct 926 |||||
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATFCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTACACTTGACATAC 985
Query 964 AGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAGCTCTGATACAGGTGCTGCATGGC 1023
Sbjct 986 |||||
AGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAGCTCTGATACAGGTGCTGCATGGC 1045
Query 1024 TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATC 1083
Sbjct 1046 |||||
TGTCATCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATC 1105
Query 1084 CTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGG 1143
Sbjct 1106 |||||
CTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGG 1165
Query 1144 AAGGTGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACA 1203
Sbjct 1166 |||||
AAGGTGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACA 1225
Query 1204 ATGGCGCATA CAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGT 1263
Sbjct 1226 |||||
ATGGCGCATA CAGAGTGTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTCGT 1285
Query 1264 AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAT 1323
Sbjct 1286 |||||
AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAT 1345
Query 1324 CAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA 1383
Sbjct 1346 |||||
CAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA 1405
Query 1384 GTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCAGGAGGACGTTT 1429
Sbjct 1406 |||||
GTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCAGGAGGACGTTT 1451

```

Ek 19 İzolat I2'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu


[gb|AY563032.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AY563032.1) *Pseudoalteromonas marina* strain *mano6* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=1438





```

Sbjct  1025  |||||TCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCT 1084
Query  1109  TAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAAACCGGAGGAA 1168
Sbjct  1085  |||||TAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAAACCGGAGGAA 1144
Query  1169  GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT 1228
Sbjct  1145  GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT 1204
Query  1229  GGCGCATAACAGAGTGCTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTGCTAG 1288
Sbjct  1205  GGCGCATAACAGAGTGCTGCGAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCCTGCTAG 1264
Query  1289  TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCA 1348
Sbjct  1265  TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTATCA 1324
Query  1349  GAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGT 1408
Sbjct  1325  GAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGT 1384
Query  1409  GGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1462
Sbjct  1385  GGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGT 1438

```

Ek 20 İzolat C91'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu