

T. C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

MİKRODALGANIN *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans* ÜZERİNE ETKİSİNİN ELEKTROFORETİK OLARAK İNCELENMESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zübeyde KAYA

T. C. DICLE ÜNİVERSİTESİ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	1993/1084
Tasnif No.	378-242
	576-645'2

K29
1991

DIYARBAKIR-1991

SUNUŞ

Bu alışma Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü denetiminde , DAP-90-FF-185 nolu proje desteğiyle Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Yrd.Doç.Dr. M.etin AYTEKİN'in danışmanlığında Yüksek Lisans ğrencisi Zübeyde KAYA tarafından yapılmış ve Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

T E Ş E K K Ü R

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm , bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım , çalışmalarım için bana gerekli koşulları sağlayan Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. M.Cetin AYTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda , bazı sonuçların tartışılmasında değerli fikirlerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd.Doç.Dr. Yavuz ENSARI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmamda , elektroforez bant profillerinin fotoğraflarını çeken Sayın Yrd.Doç.Dr. Erhan ÜNLÜ ve deneylerimin yapılması sırasında yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Murat KIZIL , Arş.Gör. Fikret UYAR ve Arş.Gör. Birol OTLUDİL'e teşekkür ederim.

Bu çalışmamda kullanılan kimyasal maddelerin bir kısmı DÜAP-90-FF-185 nolu proje ile karşılanmıştır. Bu vesile ile Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Yönetimine teşekkür etmek isterim.

TEZİN AMACI :

Son 25-30 yıl içinde hücredeki makromoleküller üzerine yapılan çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Hücrede madde alışverişini sağlayan enerjinin yanısıra bir takım proteinlerin de rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla ilgili çalışmalarda , bunların hücre içi metabolik faaliyetleri nasıl etkiledikleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Hücre dışına salgılanan proteinler çeşitli amaçlar doğrultusunda eskiden beri kullanılmaktadır. Günümüzde artık bu , yavaş yavaş bir teknoloji halini almaktadır.

Termofil bakterilerin yüksek sıcaklığa adaptasyonlarının bazı membran lipidleri ve proteinlerinden kaynaklandığı iddia edilmektedir.

Günümüzde artan bir hızla uygulamalarına şahit olduğumuz elektromagnetik dalgalar ve özellikle mikrodalgalar, beraberinde insanlar üzerinde etki yapabilen biyolojik olaylara sebep olmaktadır. En önemli etkiler gözler ve üreme organları gibi vücudun dış kısımlarında görülmektedir. Ayrıca belirli yayılma yoğunluklarında ve frekanslarda mikrodalganın davranış bozukluğu ve mutasyona neden olabilecek kadar zararlı etkilerinin olduğu belirtilmektedir.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada , nükleik asitlerin yapısında meydana gelebilecek değişikliğin yansımaları olarak hücre içi ve hücre dışı geçişleri sağlayan hücre membranındaki integral ve yüzeysel proteinler ile stoplazma proteinleri üzerine mikrodalga radyasyonu ile ısının etkisi incelendi.

ÖZET

Bu çalışmada Diyarbakır iline bağlı Çermik Belkıs Hatun termal kaplıcalarının muhtelif yerlerinden getirilen su örneklerinde , bakterilerin seçimli zenginleştirilmesinden sonra soyutlanarak teşhisleri yapıldı. Buna göre soyutlanan bakterilerden *Bacillus coagulans* ve *Staphylococcus simulans* üzerinde çalışmalar sürdürüldü.

Teşhis edilen bakteriler 15 sn süre ile mikrodalga fırın içinde 55 ; 110 ; 165 ; 220 ; 275 ve 330 W'lık mikrodalgaya tabi tutuldular. Uygun yöntemler kullanarak stoplazma ve kısmen zar proteinlerinin kantitatif tayini yapıldı ve bu proteinlerin elektroforez profilleri elde edildi.

Mikrodalga etkisiyle termal etkiyi karşılaştırmak üzere , aynı işlemler 22.5°C ; 37°C ve 50°C'de üretilen bakterilere de uygulandı.

Bu işlemler sonucu ulaşılan protein miktarları ve elektroforez profilleri mikrodalğanın , mikroorganizmalar üzerinde termal etkinin de ötesinde bir etkiye neden olduğu saptandı.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOT.....	23
3. BULGULAR.....	41
4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI.....	44
5. ÇİZELGELER ve RESİMLER.....	50
6. GRAFİKLER.....	62
7. İLAVE.....	64
8. KAYNAKLAR.....	65

BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ

Günümüzde bilinen mikroorganizmaların geniş bir sınıfının, mikrobial dünyada karşılaşılan türleri açıkladığı kabul edilmektedir. Sıcaklık, farklılık ve adaptasyonu belirtmek için iyi bir parametredir. Optimal üreme sıcaklık değerleri mikroorganizmaları belirtmek için sıklıkla kullanılmıştır. Sıcaklığa bağlı olarak yapılan en genel sınıflandırmaya göre mikroorganizmalar psikrofiller, mezofiller ve termofiller olarak incelenir:

Psikrofil Bakteriler: Bunların en iyi üreme sıcaklıkları 15-20 °C'dir. 30°C'nin üstünde ölmeye başlarlar. Soğuk seven bakteriler olarak bilinirler. Psikrofil bakteriler daha çok buzdolapları, soğuk hava depoları, soğuk tüneller gibi bilhassa et ve hayvansal ürünlerin muhafaza edildikleri ortamlarda ürerler.

Mezofil Bakteriler: 30-40°C arasında üreyen bakterilerdir. İnsanlarda, hayvanlarda birçok hastalık etkeni oluşturan bakteriler bu grupta yer alırlar.

Termofil Bakteriler: En iyi üreme dereceleri 50-75°C'dir. Daha çok termal kaynaklarda ürerler.

Daha sonraları bu sınıflamaya bazı alt bölümler de katılmıştır. Örneğin;

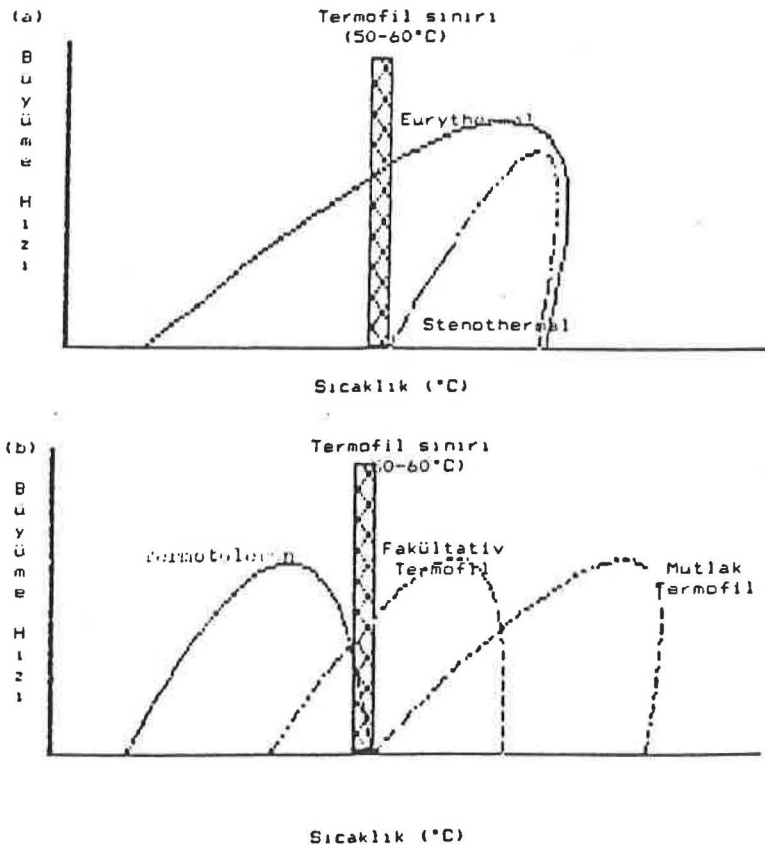
Bacillus coagulans 30-60°C'lik bir üreme sıcaklığına sahiptir ve mezofil gruplarının ikisine de girer.

Bundan dolayı *Bacillus coagulans* sıklıkla "fakültatif termofil" olarak tanımlanır.

Bazı mikroorganizmaların sıcaklığa bağlı olarak, davranışlarındaki değişim nedeniyle termofil bakterileri tanımlamak kolay olmamıştır. Sonuçta herhangi bir tanımlamaya varmanın mümkün olmadığı görülmüştür. Ancak kısa olarak 50-60°C'nin üstündeki sıcaklıklarda üreyen bir çok mikroorganizma termofil olarak belirtilmiştir.

Bazı bakteriler oldukça geniş bir sıcaklık aralığında ürerler. Böyle mikroorganizmalar "eurythermal" olarak tanımlanırlar. "Stenothermal" olarak bilinen diğer mikroorganizmalar sınırlı bir sıcaklık aralığında ürerler.

(Şekil-1.1.).



Şekil- 1.1. Farklı bakteriler için büyüme hızı ve sıcaklık arasındaki ilişki (1).

stenothermal ve eurythermal kavramı termofillere mahsus değildir. Ancak bazı organizmaların sıcaklık-üreme ilişkisini açıklayan genel terimlerdir. Şekil-1.1.b'de termofillerle ilgili olarak kullanılan bazı terimler yer almaktadır (1). Termofiller, Farrell ve Campbell'in(2) tanımladığı gibi yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen, mutlak, fakültatif veya termotoleran organizmalar olarak ayrılırlar. Termofilik bakterilerin genel bir sınıflandırması Tablo-1.1'de görülmektedir.

Genus	Tür sayısı	Sıcaklık değeri(°C)
<u>Fototrofik bakteriler</u>		
Siyano bakteriler	16	55-70
Mavi-yeşil algler	1	55-73
<u>Grampozitif bakteriler</u>		
Basiller	15	50-70
Clostridrumlar	11	50-75
Actinomyces'ler	23	55-75
<u>Diğer eubakteriler</u>		
Tiobasiller	3	50-60
Spiroketler	1	54
<u>Archabakteriler</u>		
Metanojenler	4	55-95
Termoplazma	1	37-55

Tablo 1.1.: Yüksek sıcaklıklarda üreyen Termofilik mikroorganizmaların farklı grupları(1).

Termofilik bakteriler genel olarak termal su kaynakları ve sıcak topraklarda bulunurlar. Genel olarak termofillerde, mezofiller gibi aynı karbohidratları fermente ederler, aynı azot kaynaklarını kullanırlar ve aynı oksidatif yollara sahiptirler. Adaptasyon ve mutasyon yolu ile, termofillerin mezofilik orijinleri için çok yararlı incelemeler yapılmıştır. Bu incelemelerin kaynakları ise termofilik olmayan çevrelerde termofilik mikroorganizmaların bulunmuş

olmasıdır. Ayrıca bazı mezofilik türler de sıcaklığın yükseltilmesiyle termofilik olarak üremeye adapte olabilmektedirler.

Termofilik mikroorganizmalar, ısıya dayanıklı olduklarından dolayı makromolekülleri daha kompleks bir yapıya sahiptir ve kararlılık lipid ve proteinlerle sağlanabilmektedir. Termofillige katkıda bulunan faktörlerden biri olan proteinler oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Bunun nedeni, canlı hücrelerin biyokimyasal fonksiyonlarını yürüten enzimlerin tümünün protein yapısında olmasıdır. Bir bakterinin özgül özellikleri (bir karbohidratı kullanma, aminoasitleri sentezleyebilme, v.b.) belirli bir enzim yada enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı yapan belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan kaynaklanmaktadır(3). Farrel ve Campbell (2) termofilik kaynaklardan elde edilen enzimleri 3 ana sınıfta toplamışlardır: Birinci sınıf, 55-65°C'de gerçekleşen sentezlerde kararlı olan enzimleri kapsar. Bu enzimler sentezin gerçekleştiği sıcaklığın biraz üzerinde inaktif olan enzimlerdir. İkinci sınıf, sadece substrat varlığında sentezin gerçekleştiği sıcaklıkta aktif olan enzimleri ihtiva eder. Üçüncü sınıf ise, yüksek derecede ısıya dayanıklı olan ve sentezin gerçekleştiği sıcaklığın yukarısındaki sıcaklıklarda da dayanıklı olan enzimleri kapsar.

Termofilik bakterilerin proteinleri ısıya dayanıklıdır. Halen termofilik bakterilerden yaklaşık olarak 20 kadar protein izole edilmiştir. Bu proteinlerin bir çoğu yüksek saflıkta elde edilmiş olup, fiziksel ve kimyasal olarak iyi bir şekilde karakterize edilmişlerdir(4).

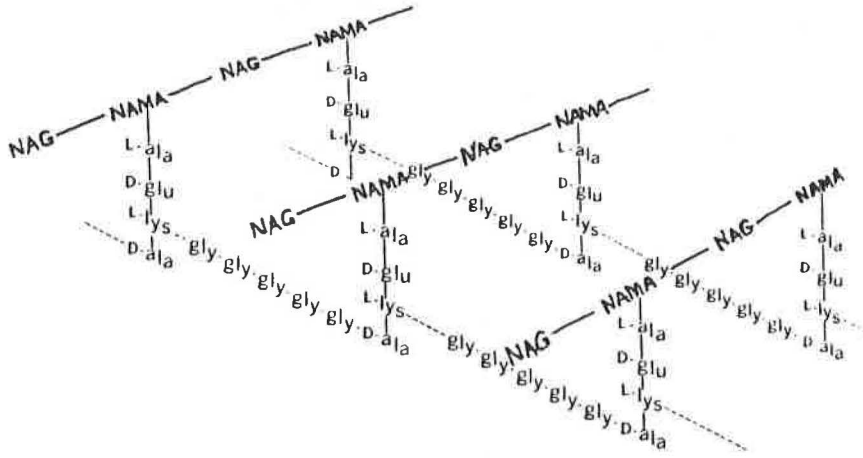
1.2. Bakterilerin Anatomik Yapısı:

Bakterilerin anatomik yapıları, başlıca iki bölümde toplanarak incelenebilir:

1-Zar ve 2-Stoplazma ve Bileşenleri

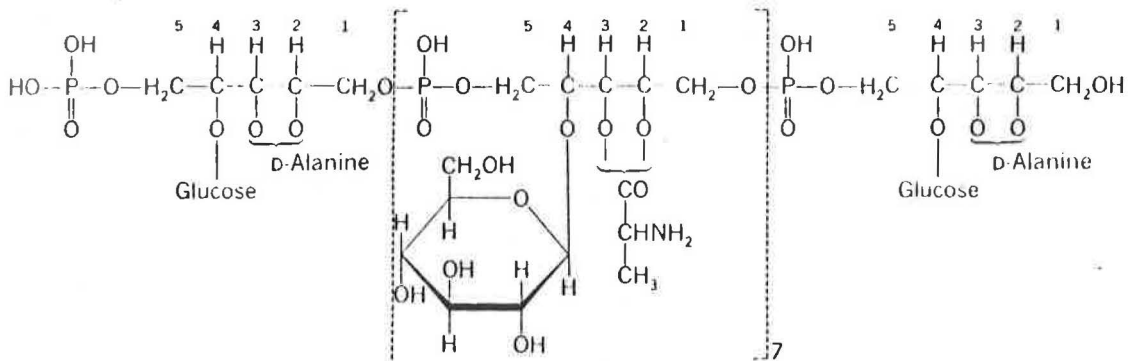
Bakterilerin dış yapısında hücre duvarı, kapsül, kirpik ve piluslar bulunmaktadır. Bakteriler için önemli olan hücre duvarı, bakteriye şekil veren ve dış etkenlere karşı dayanıklılığını sağlayan yapıdır. Gram(+) bakterilerde hücre duvarının %50-90'ını peptidoglikan (mukopeptid, glikoaminopeptid, murein tabakası) oluşturur. Bu madde hücre duvarının sağlamlık ve sertliğini sağlar. Peptidoglikan N-asetil muramik asit (NAMA) ile N-asetil glukozamin (NAGA) moleküllerinin, birbirilerini takip eden sıralar halinde, β 1 \rightarrow 4 glikozidik bağlarla birleşmesinden oluşmuş bir heteropolimerdir. NAMA molekülüne ayrıca kısa bir peptid yan zinciride katılmıştır. Bu yan zincir genellikle L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin ve D-alanin'den meydana gelmiştir. Bir NAMA molekülünde bulunan tetrapeptidin 3 pozisyonundaki L-lizin ile diğer NAMA molekülünün tetrapeptidinde 4

pozisyonunda bulunan D-alanin arasında glisinden oluşan penta-homopeptit bulunur. Böyle devam eden bağlantılarla peptidoglikan oluşturulur.



Sekil - 1.2. Peptidoglikan'ın yapısı (5).

Gram(+) mikroorganizmaların hücre duvarında, bunun kuru ağırlığının %40-50'sini teşkil eden Teikoik asit vardır. Bu da peptidoglikan omurgasındaki NAMA molekülüne fosfodiester bağı ile bağlanmış durumdadır. Teikoik asit polimerlerinin genel yapısı polidifosfat esteri şeklindedir.

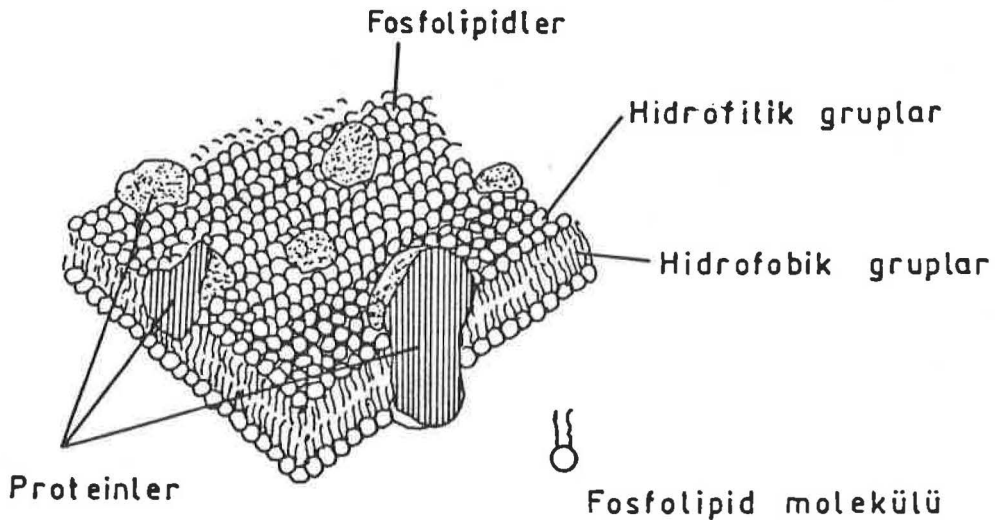


Sekil - 1.3. Teikoik asit'in yapısı (5).

Polimerin yapısında gliserin veya ribitol gibi bir polialkol bulunur. Bu alkol glukozu β -D glukoz, alanin'e -COOH grubundan esterleşmiş olarak bağlanır.

Bakterilerin iç yapısı bir çok ünitelerden oluşmaktadır. Bunlar da; stoplazmik membran(hücre membranı), stoplazma, mezozom çekirdek, ribozom, stoplazmik granüller(lipid granülleri, polisakkarid granülleri) endosporlardır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda membran yapısını aydınlatmak için en uygun model 1972 yılında Singer ve Nicolson tarafından öne sürülen akışkan-mozayik modelidir. Bu model, membranların görevleri bakımından özelleşmiş küresel proteinlerden ve lipidlerden ibaret bir akışkan olduğunu varsayar. Burada proteinler bir fosfolipid içinde dağılır ve fosfolipid iki tabakalı bir matriks oluşturur. Proteinlerin bir kısmı lipid faz içinde kısmen membran içine gömülmüştür. Bir kısmı da membranın bir yanından diğer yanına uzanır. Ortamda bulunan serbest lipid molekülleri tabakaya esneklik, akışkanlık ve karakteristik olarak yüksek bir elektriksel direnc sağlayan yana doğru salınım, dönme v.b. şekilde hareket ederler.



Şekil-1.4 : Akışkan - Mozayik Modeli (5).

Akışkan - mozayik modeli farklı tipte membranlara değişen kalınlık sağlar . Farklı tip proteinlerin fosfolipid tabakasında düzenlenmesini sağladığından dolayı membranların geçirgenlik ve elektriksel yük iletkenliğine cevap verir.

Hücreyi iç ve dış çevresinden ayıran ve bir çok hayatsal faaliyetleri sağlayan hücre membranı yarı geçirgen bir özellik gösterir. Dışarda bulunan gıda maddelerinin, suyun ve diğer lüzumlu maddelerin hücre içine girmesini, metabolizma artıklarının hücreden çıkmasını sağlar. Elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonda görevli sitokrom sistem enzimleri ile kompleks lipid sentezinde görevli olan enzimler hücre membranında bulunur (5,6).

1.3. Bakterilerin Morfolojisi:

Bakteriler, mikroskopta görülebilen bireysel formlarına göre başlıca 3 ayrı gruba ayrılabilirler: 1- Küresel, 2-Çomak, 3-Spiral şeklinde olanlar. Küresel biçiminde olan bakteriler kok olarak tanımlanırlar. Bunlar tek, çift (diplokok), zincir (streptokok), üzüm salkımı (stafilokok) veya kübik paketler (sarcina) halindedirler.

1.3.1. Stafilokoklar: Gram(+) mikroorganizmalar sınıfına giren stafilokoklar genelde insan derisi, mukozası ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda bulunur. Çapları

0.5-1.5 μ m olup, hücre duvarları peptidoglikan ve teikoik asit ihtiva eder. Karbohidrat ve aminoasitler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Koagulaz, lipaz, stafilokinaz, gelatinaz ve fosfataz gibi enzimler bilinen stafilokokkal enzimlerdir.

1.3.2. Basiller: Basil olarak tanımlanan çomak şeklindeki bakteriler düz çizgi, silindirik veya uzun elipsoid sekildedirler. Basillerin genişlikleri 0.3-2.3 μ m, uzunlukları ise 1.2-7.0 μ m arasında değişmektedir. Yüksek sıcaklıklarda üreyen bakterilerin büyük bir kısmı basil yapıdadır. Bir çok basil polisakkaridleri, nükleik asitleri ve lipidleri yıkan hidrolitik enzimleri salgılar. Kullanılan substrata bağlı olarak metabolizmaları solunum, fermentatif veya hem solunum hem de fermentatiftir(7,8).

Çevrenin mikroorganizmalar üzerine oldukça büyük bir etkisi vardır. Bunlar arasında sıcaklık, mikrodalgalar, basınç, v.b. sayılabilir. Özellikle belirli yayılma yoğunluklarında mikrodalga radyasyonları önemli biyolojik etkiler oluştururlar.

1.4. Mikrodalga Hakkında Genel Bilgi:

Yiyecek pişirme ve hazırlama teknikleri için, modern uygulamalardan biri de mikrodalga radyasyonudur. Son bir kaç yıldır mikrodalga fırınlar

oldukca bol miktarda üretilmekte ve mikrodalga ile pişirme popüler bir hale gelmektedir.

Mikrodalgalar ultraviyole, görünür ışık ve radyo dalgaları gibi elektromanyetik radyasyonun bir türüdür. Bunlar frekansları, dalga boyları ve enerjileri bakımından farklılıklar gösterir. Mikrodalga fırınlar 12 cm dalga boyuyla 915 ile 2450 MHz frekansa sahip ve kimyasal bağları kırmaksızın ısıya neden olacak yeterlilikte enerji içeren dalgalar üretirler. Mikrodalgalar enerji formunda olup, ısı formunda değildirler. Mikrodalgalar besinlerdeki yağ veya su ile etkileştikleri zaman ısı üretilir. Üretilen ısı mikrodalga etkisi ile iyonların hızlandırılmaları ve bunun sonucu diğer moleküllerle çarpışmaları veya mikrodalga etkisi ile oluşan dipollerin hızlı değişen elektriksel alan içindeki dönme ve bir düzene göre dizilme hareketleri neticesinde oluşmaktadır. Materyal içinde enerjinin bu etkileri materyalin yeterli ve hızlı bir şekilde ısınmasına neden olur. Yiyecekler normal ısıtılmaları için gerekli olan sürenin dörtte biri veya daha kısa sürede ısıtılabilirler.

Aynı zamanda mikrodalga ile ısıtmadaki gelişmeler problemsiz değildir. Mikrodalga fırınlarda dalga profillerinin konumunun düzensiz ısı yayılmalarına neden olduğu belirtilmiştir. Mikrodalga fırınlarda yanlış bilgiler sonucu pişirilen yiyeceklerden insan sağlığı tehlikeye girmekte ve tüketici zarar görmektedir(9).

1.4.1. Mikrodalğanın Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Mikrodalğanın mikroorganizmalar üzerine etkisi 1950 yılından önce çalışılmış ve çalışmaların çoğu yüksek frekanslı alanlarda yapılmıştı. Ingram ve Page yüksek voltajlı alanlarda *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, Tütün Mozaik Virüsü (TMV) ve bakteriyofaj T4'ü incelemişlerdir. Örnekler 12 dakika 10 MHz veya 20 MHz'lik bir ışınlamaya bırakıldıkları zaman iki mikroorganizmanın yaşamı ve TMV üzerinde önemli bir etki gözlenmemiştir(10).

Brown ve Morrison mikrodalga pastörizasyon deneylerinde *E.coli* kültürlerini kullanarak, kültürlerin sürekli ışınlanması sonucu yaşamlarının % 30 azaldığını göstermişlerdir. Kültürler saf su (1:100) ve % 5 NaCl ile sulandırıldıkları zaman yaşamlarının %55 ve %75 arasında azaldığı görülmüştür(11).

Delaney ve arkadaşları *Aspergillus niger* ve *Bacillus stearothermophilus* sporlarını suyun yokluğunda, disk ve kağıt şerit üzerinde, krema, sukroz, kuru süt, fizyolojik serum ve distile su gibi farklı ortamlarda ışınlamaya tabi tuttular. 2450 MHz'lik ışınlamanın *Bacillus stearothermophilus* üzerinde zararlı bir etkisinin olmadığı, fakat *Aspergillus niger*'de hücresel tahribata neden olduğu görüldü. Kuru şerit üzerinde ışınlanan bakterilerin yüksek bir yaşabilirlik şansına sahip oldukları, buna karşın deneylerin yapıldığı

bes besiyerinde yüksek miktarlarda hücresel tahribat gözlemlendi. Araştırmacılar 2450 MHz'lik mikrodalga ile ısıtılan mikroorganizmalarda gözlenen etkilerin bilinen ısıtma yöntemlerinden anlamlı oranlarda farklı olmadığını belirtmişlerdir(12).

Lechowich ve ark., *Streptococcus faecalis* ve *S. cerevisiae*'nin yaşamı ile *S. cerevisiae*'deki solunum hızı değişiklikleri üzerine 2450 MHz'lik mikrodalga ve ısıнын etkilerini incelediler. Çalışmacılar çalışmalarında sıcaklığı kontrol edilebilir mikrodalga fırını kullanmışlardır. 6 ml'lik örnekler içinde 10^8 ve 10^9 hücre içeren süspansiyonlar ışınlanarak katı besiyerine ekildi. Mikrobial süspansiyonlara mikrodalga'nın sürekli uygulanması ile, bu yöntemle üretilen ısıнын etkisi dışında, öldürücü etkilerin olmadığı görüldü. Mikrodalga uygulanan *S. cerevisiae*'nin solunum hızı, mikrodalga ile ısınlama süresinin artması sonucu oluşan hücre sayısındaki azalmayla direkt olarak ilişkilidir. Araştırmacılar tüm etkilerin, ısınlama esnasında oluşan termal inaktivasyondan kaynaklandığını ve solunumdaki hasarın yaşama şansındaki azalmayla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir(13).

Roberts *S. cerevisiae* askosporları ve vejetatif hücreler üzerine mikrodalga'nın etkisini inceledi. Mikrodalga esnasında sıcaklığın kontrol edilmesiyle vejetatif hücreler 33°C ve 8 dakikada, askosporlar ise 33°C ve 12 dakikada ölmekteydi. Ortam 5 ml'lik süspansiyon

haline getirilip , sıcaklık kontrol edilmediği zaman termal ölüm noktası 30 sn' den daha az bir zamana ulaşmaktaydı(14).

Correlli ve arkadaşları E.coli B üzerine 2,6-4,0 GHz mikrodalga ışınlamasının etkilerini çalışmışlardır. Bunun için hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinin ölçümü ve ışınlamaya tabi tutulan ve tutulmayan hücre kültürlerinin infrared spektrumlarının karşılaştırılması ile moleküller yapıdaki değişiklikler kullanılmıştır. 1 ml'lik hücre sel süspansiyonlara 10-12 saat 20 mW'lik bir radyasyon uygulandığı zaman hücrelerin koloni oluşturma yeteneği veya moleküler yapıları üzerinde herhangi bir etkinin bulunmadığı gözlenmiştir(15).

Bütün bu araştırmacıların ulaştıkları ortak sonuç,hücre ölümlerinin yegane nedeninin mikrodalga radyasyonu ile üretilen ısının olduğudur. Buna karşıt olarak bazı çalışmalarda mikrodalga radyasyonunun mikroorganizmalar üzerine termal veya non-termal etkilerinin olmadığı belirtilmiştir.

Hamrick ve Butler E.coli'nin 4 suşu ve Pseudomonas aeruginosa 'ya 12 saat, 60 mW/cm² , 2450 MHz'lik mikrodalga uygulamışlardır. 50 ml'lik süspansiyonlar radyasyona tabi tutulup,gerekli seyreltmeler yapılarak, katı besi yerinde inkübasyondan sonra sayıldı. Büyüme eğrisi, aynı ve farklı türler içindeki kontrol ve ışınlanan hücreler arasında herhangi bir farklılık

olmadığını gösterdi. 41,259 ve 450 mW/cm²'de uygulanan dozlar benzer sonuçları verdi(16).

Farklı enerji düzeylerinde mikrodalga radyasyonuna maruz bırakılan mikrobial hücrelerin nükleik asit yapılarının tetkiki üzerinde çalışmalar mevcuttur. Webb ve Booth mikrodalga radyasyonuna tabi tutulan E.coli B, Enterobacter aerogenes ve E.coli B/r'deki protein, RNA ve DNA sentezini bu moleküllerin absorpsiyon spektrumlarından yararlanarak incelemişlerdir. ¹⁴C-işaretli besiyerlerinin kullanıldığı çalışmalar 66,71 ve 73 GHz'de ¹⁴C-işaretli metabolik aktivitenin azaldığını gösterirken, 68 GHz'de oluşan aktivite artmaktaydı (17).

Yapılan diğer çalışmalar sonucu radyasyondan sonra 5 dakika aralıklarla ölçüm yapılarak 71 ve 129 GHz arasında RNA sentezinin arttığı, protein ve DNA sentezinin azaldığı, hücre büyümesinin ise zayıfladığı belirtildi (18). Sıcaklık burada bir faktör olarak göz önünde tutulmadı. Mikrodalga frekansları protein, DNA, RNA ve hücre büyümesini inhibe veya stimule etmekteydi. Bu sonuçlar glukoz, süksinat ve amonyum tuzu içeriği bakımından farklılıklar gösteren besiyerlerinde de elde edildi.

Mikrodalga radyasyonunun etkilerinin incelendiği diğer bir çalışmada radyasyonun genetik mutasyona neden olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Berteaud ve ark., E.coli hücrelerini 15 dakika 70-75 GHz 'lik bir ışınlamaya

tabi tuttular. Bu uygulamaya rağmen DNA bilinen onarım mekanizmalarına girebildiği için yeni mutantların oluşumu veya lezyonlar gözlenmemiştir(19).

Su doğada dipolar yapıda olması nedeniyle , varlığı ve yokluğunda, mikroorganizmalar üzerine mikrodalganın büyük derecedeki etkileri incelenebilir. Örneğin Clostridium sporogenes sporlarını ihtiva eden süspansiyonların bilinen ısıtma sistemlerine göre mikrodalga radyasyonundan daha çabuk etkilendikleri ancak kurutulmuş sporların etkilenmedikleri gözlenmiştir (20). A.niger , B.stearothermophilus (12). ve B.cereus'un sporları ile yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar görüldü. Ancak E.coli,S.aureus ve Salmonella enteritidis'in liyofilize kültürlerinin mikrodalgadan etkilenmedikleri belirtilmiştir(21).

Webb ve Dodds 25 °C 'lik sabit bir sıcaklıkta E.coli'ye 136 GHz'lik mikrodalga uygulamışlardır. İnkübasyondan 4 saat sonra bölünmenin olmadığı gibi, öldürücü etkinin de olmadığı belirtildi. Bu araştırmacılar radyasyona tabi tutulan hücrelerin bölünme hızlarının azaldığını ve şimdilik belirtilmeyen bazı metabolik proseslerin hücresel büyümenin erken aşamalarında spesifik olarak inhibe edilmiş olabileceğini belirtmişlerdir (22).

Son zamanlarda Dreyfuss ve ark. E.coli, B.cereus, S.aureus ve S.enteritidis kültürlerine mikrodalga fırınlar içinde mikrodalga uyguladılar.

Sonucta, ısınlama sonucu yaşıyan hücre sayısı tartışıldı. Benzer işlemler bilinen ısıtma sistemleriyle de yapıldı. Termal ölüm noktasına yaklaşıncaya kadar mikrodalga ve bilinen ısıtma sisteminde benzer sonuçlar bulunmasına rağmen, kültürler Nutrient Broth'da üretildikleri zaman, 20 sn. uygulanan mikrodalga radyasyonu sonucu hücre sayısında anlamlı bir artış görüldü. Bu artış radyasyondan sonra 2 saatten fazla devam etti. Ancak kültürler Nutrient Broth yerine fosfat tamponu içine bırakıldıkları zaman bu artış durdu. Bu dört mikroorganizmanın kültürleri indirgen, yükseltgen ve radyosensitif maddelerin varlığında da mikrodalga radyasyonuna maruz bırakıldı. Hücreler dithiothreitol, thioglycollat, sistein, metyonin, glutation, potasyum permanganat ve p-nitroasetofenon ihtiva eden ortamlarda ısınladı. Mikrodalga uygulanan hücreler üzerine alkali ve asidik çevrenin etkisini tayin etmek için kültürlerin pH'sı 6,0 ve 8,0 'a ayarlandı. Indirgen, yükseltgen ve radyosensitif maddelerin varlığında mikrodalga uygulanan kültürlerin yaşamının arttığı veya azaldığı sonucuna varıldı. Kültürler asidik pH'da, Nutrient Broth'da ısınladığı zaman üremedeki önemli düşüş, hücre popülasyonundaki azalmayla ölçülerek gözlendi (23).

Çalışmacılar son zamanlarda Bacillus sporları üzerine ısının etkisini karşılaştırmak için mikrodalga radyasyonu ve bilinen su banyosunun etkisini

karşılaştırdılar. Bu deneylerde *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.cereus*, *B.brevis* ve *B.stearothermophilus* türleri kullanıldı. Yukarıda belirtilen her türün spor süspansiyonları, süspansiyon ortamının ısısı 60 °C olacak kadar 30 sn. süre ile mikrodalgaya tabi tutuldu. Bilinen ısıtma yönteminde ise süspansiyonlar 60 dakika, 60 °C'de su banyosuna bırakıldılar. Hiçbir etkiye maruz bırakılmamış kontroller gibi bu spor süspansiyonları hemen Nutrient agara ekildi, inkübe edildi ve koloni oluşan yerler belirlendi.

Mikrodalga uygulanmış, ısıtılmış ve kontrol olarak kullanılan her bir suştan on koloni petri kutusundan alınıp, 10 ml. Nutrient Broth ihtiva eden tüplere ekildi ve inkübasyona bırakıldı. Isıtma etkisi ile herhangi bir oluşum ortaya çıkmış ise bunu tespit etmek için, bu izolatların kültürleri sonradan birkaç biyokimyasal madde ile inoküle edildi. Deneylerde biyokimyasal aktivite de değişiklik gözlenmedi. Sonuçta bu genusun sporlarının ısı aktivasyonu için mikrodalga radyasyonunun etkili bir model olarak kullanılabileceği saptanmıştır (24).

1.4.2. Mikrodalga Radyasyonunun Diğer Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi :

Mikrodalga radyasyonunun diğer biyolojik sistemler üzerine olan etkisi de incelenmiştir.

Yeagers ve ark., 10^{-6} M fosfat tamponu içinde lizozim ve tripsin'i 50 W'tan 300 W'a kadar ışınladılar. Burada sıcaklığın 30 ve 95 °C arasında spesifik bir degere ulaşması sağlandı . Bir kez istenen sıcaklığa ulaşarak, bu sıcaklığı korumak için mikrodalga güç düzeyi düşürüldü. 1,5 saat sonra enzimler fırından alınarak 25 °C'ye bırakıldı ve tayin edildi. Çalışmacılar enzimlerin bilinen yöntemlerle ısıtılmış çözeltilerini karşılaştırdıkları zaman benzer enzimatik aktiviteyi buldular(25).

Tungler ve ark., 40-115 GHz frekanslı ve 10 mW/cm²'ye yakın yoğunlukta ışınlar kullanılarak hemoglobin tarafından oksijen bağlanması ve alkol dehidrogenaz aktivitesi üzerine mikrodalga radyasyonunun etkisini çalıştılar.

İki sistem üzerine mikrodalga radyasyonunun eksinin olmadığı gözlemlendi(26).

Belkhode ve ark., asit ve alkalın fosfotaz, laktat dehidrogenaz ve insan serumu glukoz 6-fosfat dehidrogenazı üzerine invitro olarak 2,8 GHz'lik mikrodalga ışınının etkilerini çalıştılar. Enzimler 4,5 ve 18,5 dakika süre ile 37, 46.7 ve 49.7 °C'de ışınladı. İki ışınlama süresi için de 49,7 C'de enzimatik aktivitede bir azalma gözlemlendi. Fakat düşük sıcaklıklarda herhangi bir etki yoktu. Çalışmacılar sonuçta atermal etkilerinin olmadığını görmüşlerdir(27.28).

1.4.3. Mikrodalga Radyasyonunun Termal Etkilerine Karşı Non-termal Etkileri.

Mikrodalga ile yapılan çalışmalarda, ısınmanın görülen etkilerde bir parça rol oynadığı gözlemlendi. Genel fizyolojik etkiler ısıya bağlanmıştır (29-30).

Mikrodalga radyasyonunu içeren araştırmalar, önce mikroorganizmaların yaşamı üzerine limit sıcaklık noktasının etkisi üzerine oldu. Burton (1950), Jacobs ve ark. (1950), Ingram ve Page (1953), Brown ve Morrison (1954), Tomberg (1961) tarafından belirtildiği gibi mikrodalga radyasyonunun mikroorganizmalar üzerine etkisi doğada termaldir. Ayrıca Lystsov ve ark., mikrobial vejetatif hücreler, sporlar ve DNA ve dönüşümü üzerine mikrodalğanın etkilerini çalıştılar. Bu çalışmacılar, bu sistemler üzerine radyasyonunun mutajenik etkilerini veya spesifik olmayan non-termal öldürücü etkileri buldular (31).

Memelilerin virüs replikasyonu üzerine mikrodalğanın etkisini Luczak ile Szmigielski ve ark. (32) çalışmışlardır. Sonuçta bu çalışmacılar replikasyonun inhibisyonunun termal etkilerle oluştuğunu belirtmişlerdir. Vela ve Wu suyun varlığında ve yokluğunda farklı bakteriler, aktinomiçesler, mantarlar ve bakteriyofajlar üzerine 2450 \pm 20 MHz'lik mikrodalga uyguladılar. Suyun varlığında mikroorganizmalar inaktive olmaktaydılar. Oysa kuru veya liyofilize organizmalar daha uzun sürelerde

mikrodalga uygulanması halinde bile etkilenmediler. Çalışmacılar mikroorganizmaların termal etki ile öldüğünü, non-termal etkinin olmadığını ifade ettiler; Suyun dışındaki hücre bileşenlerinin hücrenin ölümü için yeterli enerjiyi absorblamadıklarını belirttiler. Bununla birlikte çalışmacılar non-termal etki varsa bunun bakterisidal olmadığını, ancak suyun non-termal etki için bir potansiyel oluşturduğunu ifade ettiler (33).

Bazı araştırmacılar moleküler transformasyon ve değişimler için enerjiye olan gereksinimden dolayı termal olmayan mikrodalga etkilerinin olabileceğini göstermişlerdir. Bunlar hidrojen bağları ile ikincil bağlanmaların kırılmasını, protein hidrotasyonundaki değişmeler gibi oluşumları kapsar (34).

Dreyfuss ve Chpley S.aureus hücreleri üzerine sublethal mikrodalga radyasyonunun bazı etkilerini belirtmek için S.aureus kültürlerini mikrodalga radyasyonuna tabi tuttular. Bilinen ısıtma yönteminin etkisini karşılaştırmak için kültürler, mikrodalga uygulanmış kültürlerde kaydedilen sıcaklıkta, sıcak su banyosunda üretildi. Kontrol, mikrodalga uygulanmış ve ısıya tabi tutulmuş kültürler santrifüjlendi, pellet saf su ile süspanse edildi. Hücre lizatları ve duvar sonra izole edilerek, enzimatik aktivite için incelendiler. Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman, mikrodalga uygulanmış

hücrelerde malat, α -ketoglutarat dehidrogenaz , sitokrom oksidaz ve stoplazmik adenozin trifosfat (ATPaz) aktivitesi daha yüksek bulundu.

Membran (ATPaz) , alkalın fosfataz ve laktat dehidrogenaz aktivitesi değişmedi. Glukoz 6-fosfat dehidrogenazın aktivitesi ise mikrodalga radyasyonu sonucu azaldı. Bilinen ısıtma yöntemi sonucu, hücrelerde glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve stoplazmik adenozin trifosfataz aktivitesinin arttığı gözlemlendi. α -ketoglutarat, laktat dehidrogenaz aktivitesi azaldı, alkalın fosfataz aktivitesi ise değişmedi. Hücrelere 10 ve 20 sn. mikrodalga uygulandığı zaman termonükleaz aktivitesinin arttığı görüldü (35).

Mikrodalga radyasyonunun non-termal etkilerini belirtten bazı teoriler açıklanmıştır. Barnes ve Hu membran içinde meydana gelen iyon değişmelerine mikrodalğanın non-termal etkilerini belirtmek için bir matematiksel yöntem geliştirmişlerdir (36). Straub ve Carver membran içinde elektiriksel akım ve potansiyel farklılıklarındaki artmalardan sorumlu olan aktif iyon transportundaki azalmayla membran yapılarında irreverzibl bir zararın meydana geldiği gözlemlendi (37).

Özet olarak mikrodalga radyasyonu içeren mikrobiyolojik çalışmalardan aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1) Termal etkilerden mikrodalga etkilerini ayırdetme yetersizliği

2) Sıcaklık ne olursa olsun mikrodalga etkilerinin ispatı

3) Mikrodalga radyasyonundan kaynaklanan termal veya non-termal etkileri gözleme güçlüğü

BÖLÜM II

2. MATERYAL VE METODLAR:

2.1. Biyolojik Materyal: Bu çalışmada Diyarbakır iline bağlı Çermik Belkıs Hatun termal kaplıcalarından getirilip soyutlanan *Bacillus coagulans* ve *Staphylococcus simulans* kullanılmıştır.

2.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN MADDELER:

Etilalkol; $MgSO_4$; K_2HPO_4 ; $FeSO_4$; KI; HCl; $HgCl_2$; I_2 ; $CuSO_4$
 H_2O_2 ; Glukoz; Sukroz; Xyloz; Laktoz; $(NH_4)_2SO_4$; $MgCO_3$;
 KOH; $NaNO_2$; H_2SO_4 ; KNO_3 ; NaCl; Sitrikasit; Üre; Fenol red;
 $NH_4H_2PO_4$; KH_2PO_4 ; Sodyum sitrat; sodyum azid; Na_2CO_3 ; Na-K
 Tartarat; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; H_3PO_4 ; Li_2SO_4 ; Br_2 ;
 Brom Cresol Purple; Sodyum Dodesil Sülfat (SDS); Amonyum
 persülfat; Glasiyel asetik asit; Metil alkol; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; β -Merkaptoetanol; Brom Phenol Blue; Gliserin
 ; N-N-N'-N' Tetrametil etilen diamin (TEMED);
 Maltoz; Trehaloz ve Nişasta analitik saflıkta ticari olarak
 Merck Darmstadt'tan sağlandı.

Sodyum kazeinat; gelatin; Tris-Base (Tris [hydroxymethyl] amino-methane); Tris-HCl; Akrilamid; N-N'-metilen bis akrilamid; Dalton Mark VII-L Protein kiti (Albumin Bovine (66.000), Albumin egg (45.000),

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000), Karbonik anhidraz (29.000), Tripsinojen (24.000), Tripsin inhibitor (20.100), α -Laktalbumin (14.200)); Coomasie Brilliant Blue R-250 Sigma Chemical Company'den ticari olarak temin edilmiştir.

Nutrient Broth (Bacto dehydrated); Agar (Difco Bacto agar); Et özütü; Pepton; Saburo Dextroz; Trypton (Bacto Tryptone); Mannitol salt agar, Difco Laboratories'den temin edildi.

CO₂ gaz jeneratörü (Gas, Generating Kid for anaerobic system) OXOID'ten sağlandı.

2.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ALETLER:

- 1) Santrifüj (Hettich EBA III)
- 2) Etüv (Nüve EN 400)
- 3) Spektrofotometre (U.V - 160 Shimadzu U.V-Visible Recording spectrophotometer)
- 4) Mikrodalga fırın (2450 MHz frekanslı Dokunmatik, Vestel -V- 8505T mikrodalga fırın)
- 5) Ultrasonik homojenizatör (Ultratip, Labline wave Energy Systems, 10 KHz, 100 W)
- 6) Elektroforez aygıtı (Gelman Gelcell, Gel Column)
- 7) Güç kaynağı (Gelman, Deluxe Regulated Power Supply)
- 8) U.V Lambası

- 9) Mikroskop (Olympus HB)
- 10) Termocift (Ni-Cr/Ni alaşımından yapılmış).

2.4. BAKTERİ TEŐHİŐİ:

2.4.1 Gram Boyama:

Jansiyen moru (Stok cözelti; 5 gr. jansiyen moru; 100 ml %95'lik etil alkol. Kullanma solüsyonu; 10 ml stok jansiyen moru cözeltisi; 100 ml %1 fenollu distile su); Lugol (1 gr. iyot; 2 gr. KI; 300 ml distile su); Sulu fuksin (stok cözelti; 3 gr. Bazik fuksin; 100ml %95'lik etil alkol. kullanma solüsyonu; 10 ml. stok bazik fuksin cözeltisi; 100ml, %5 fenollu distile su); etil alkol; su.

Steril öze ile alınan bakteri örneği lam üzerinde, bir damla fizyolojik serum ile yayılır. Havada kurutulur, alevde fikse edilir. Lamın üzerine jansiyen moru dökülerek 2 dakika bekletilir. Daha sonra lugol dökülerek 1/2 dakika bekletildikten sonra ardından etil alkol (1/2dakika) dökülür, sonrada saf su ile yıkanır. Lamın üzerine son olarak sulu fuksin dökülür. 1 dakika sonra lam yıkanır ve havada kurutulur. Bakteriler mikroskopta incelenir. Hücre duvarındaki farklılıktan kaynaklanarak G (+) bakteriler mor, G (-) bakteriler pembe görünür.

2.4.2. Bakteri Hücrelerinin Ölçülmesi:

Mikroskopta incelediğimiz canlı veya cansız maddenin boyutlarını, ölçmek mümkündür. Bu işlem için objektif mikrometre ve oküler mikrometre kullanılır. Oküler mikrometrede 5 mm'lik bir uzunluk elliye bölünmüş olup, oküler içine yerleştirilir (oküler mikrometresinin taksimat değeri, mikroskobun kullanılan büyütmesine göre değiştiği için, kullanılacak objektif mikrometre taksimatlarına göre hesaplamalar yapılır). Objektif mikrometresinde genellikle 1 mm 100'e bölünmüştür, yani her bir aralık 1/100 mm'dir. Önce bir objektif mikrometre taksimatının kaç oküler mikrometre taksimatına karşılık geldiği bulunur. Bundan yararlanarak da oküler mikrometresinde bakterinin boyutları tayin edilir.

2.4.3. Hemoliz Deneyi :

Kanlı agar (17 gr. agar; 10 gr. pepton; 5 gr. NaCl; 5gr. et özütü, 100 ml, distile su, yanakısına gelince 100 ml. kan ilave edilir.) (**)

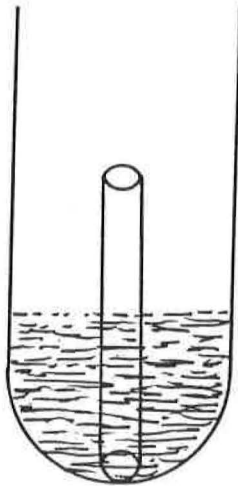
Kanlı agara ekilen bakteriler 37°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra koloni etrafında kanın erimesi hemolizi gösterir.

(*) Bütün besiyerleri 15 dakika 1,5 atm.'de otoklavda sterilize edildi.

2.4.4. Hareketlilik Deneyi

Bu deney ile bakterinin hareket edip etmediği belirtilir. 1,5 gr. et özütü; 5 gr pepton; 2,5 gr NaCl; 0,8 gr. agar ; 500 ml. distile su ihtiva eden besiyeri, hazırlandı.

Büyük tüplere iki ucu açık cam çubuk bırakılır. Cam çubunun ucu dışarda kalacak kadar tüplere besiyeri bırakılır. Cam çubunun içine ekilen bakteri 37°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakıldı. Bakterinin hareket edip etmediği kontrol edildi.



Şekil-2.1. : Hareket Besiyeri

2.4.5. Exoenzim Testleri

1) Nutrient agar (5 gr. pepton; 3 gr. et özütü; 15 gr. agar; 1000 ml. distile su. Nutrient Broth sıvı besiyeri hazırlamak için ise, ortama agar ilave edilmez.)

2) Nişasta agar (Nutrient agar + % 0.4 çözümlü nişasta)

3) Kazein agar (2.0 gr. Sodyum kazeinat; 1 gr. glukoz; 0.2 gr $MgSO_4$; 0.2 gr. K_2HPO_4 ; az miktarda $FeSO_4$; 15 gr. agar; 1000 ml. distile su)

4) Gelatin agar (2 gr. gelatin; 1.5 gr et özütü; 2.5 gr. pepton; 7.5 gr. agar; 500 ml. distile su)

5) Yağlı agar (1.5 gr.et özütü; 2.5 gr. pepton; 7.5 gr. agar; 5 gr. tereyağı; 500 ml distile su)

6) Gramın iyot çözeltisi (1 gr. iyot; 2 gr. KI; 300 ml. distile su)

7) %1'lik HCl

8) HCl, $HgCl_2$ (1.5 gr. $HgCl_2$; 20 ml. derişik HCl distile su ile 100 ml'ye seyreltildi)

9) $CuSO_4$ 'ün sudaki doygun çözeltisi

10) % 3'lük H_2O_2

İnkübasyonlar $37^\circ C$ 'de 2-3 gün yapıldı.

Bu deneyde katalaz, nişasta, kazein, gelatin ve lipaz hidrolizi incelendi.

Katalaz Testi: Ekim yapılmış Nutrient agara %3'lük H_2O_2 döküldüğü zaman hava kabarcıkları oluşursa mikroorganizma katalaz üretmektedir. Bir çok aerob ve fakültalif mikroorganizma bu enzimi üretmektedir.

Nişasta Hidrolizi: Ekim yapılmış Nutrient agara gramın iyot çözeltisi dökülerek, 2 dakika bekletildi. İyot nişastayla mavi bir renk verir. Ancak bakteriyel amilazın etkisiyle nişasta maltoz ve glukozla hidrolizlenmişse mavi bir renk oluşmayacaktır. Buna dayanarak oluşan nişasta iyot

kompleksi için yorum yapılır.

Kazein Hidrolizi: Ekim yapılmış kazein agara %1'lik HCl katılarak, 5 dakika bekletildi. Daha sonra HCl dökülerek, ışıklı bir sahada incelendi. Kültürün çevresinde açık - parlak bir bölgenin olması kazeinin hidrolizini gösterir.

Gelatin Hidrolizi: Gelatin agara HCl.HgCl₂ katılarak 5 dakika bekletildi. Kültürün beyazımsı olması gelatinaz üretiminin bir göstergesidir.

Lipaz Hidrolizi: Yağlı agara CuSO₄'un sudaki doygun çözeltisi katıldı. Yağ damlalarının mat ve yeşilimsi olması lipaz üretimini, belirgin olmayan bir renk reaksiyonu ise hidroliz olayının olmadığını gösterir.

2.4.6. Karbohidratların Fermantasyonu:

1) 0.5 gr. Glukoz; 1 gr; Trypton; Bir kaç damla Brom Cresol purple (BCP) (0.4 gr. BCP; 13.8 ml N/20 NaOH; 86.2 ml distile su)

2) 0.5 gr. Sukroz; 1 gr. Trypton; Bir kaç damla BCP

3) 0.5 gr. Laktoz; 1 gr. Trypton; Bir kaç damla BCP

4) 0.5 gr. Xyloz; 1 gr. Trypton; Bir kaç damla BCP

Bu deneyle glukoz, sukroz, laktoz ve xyloz fermentasyonu ve şekerlerden gaz oluşumu incelendi.

Deneyin sonunda BCP sarı olursa asit oluşturuyor, soluk sarı olursa hafif asit oluşturuyor, renk değişmez ise asit oluşturmuyor sonucuna varılır.

2.4.7. Amonyak testi:

1) Amonyum Besiyeri: 1 gr $(NH_4)_2SO_4$; 0.05 gr. K_2HPO_4 ; 0.025 gr. $MgSO_4$; $5 \cdot 10^{-3}$ gr. $FeSO_4$; 0.25 gr. $MgCO_3$; 50 ml. distile su.

2) Nessler reaktifi: 50 gr. KI ; 35 ml. distile su ; bir miktar $HgCl_2$; 400 ml. %50'lik KOH ; hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Ekim yapılmamış Amonyum besiyerinde bir fayans üzerine 1 damla alındı. Aynı işlem ekim yapılmış besiyeri için de yapıldı , 2-3 damla Nessler reaktifi katıldı. Koyu sarı-portakal renk oluşumu amonyak üretimini gösterir.

2.4.8. Nitrat Testi:

500 ml. Nutrient Broth sıvı besiyerine son derişimi %1 olacak şekilde KNO_3 katılarak tüplere bölüştürüldü. Ekim yapıldıktan sonra inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra tüplere $FeSO_4+H_2SO_4$ katılarak kahverenkli gaz oluşumu gözlemlendi.

2.4.9. Tuz Tolerasyonu:

içinde %3 , %6.5 ve %10'luk NaCl olan Nutrient Broth sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. 8-10 saat $37^\circ C$ 'de inkübasyondan sonra üreme gözlemlendi.

2.4.10. Indol Deneyi:

Indol, azotlu bir bileşik olup, bazı bakteriler tarafından triptofanın enzimatik hidrolizasyonu sonucu meydana getirilir.

- 1) 2,0 gr. Pepton (Triptofan)

- 2) 0.5 gr. NaCl
- 3) 100 ml. distile su

37°C'de 2-3 gün inkübasyondan sonra kültürün üst kısmında kırmızı rengin oluşumu indol varlığını gösterir. Üstte sarı rengin gözlenmesi ise, mikroorganizmanın triptofanı hidrolizleyecek enzimi salgılamadığının göstergesi olarak kabul edilir.

2.4.11. Üreaz Deneyi:

Bazı bakteriler üreaz enzimi yardımıyla üreyi hidroliz ederek amonyak oluştururlar. Kültürde meydana gelen amonyak pH'nin yükselmesine neden olur.

1,0 gr. pepton ; 5,0 gr. NaCl ; 2,0 gr. K₂HPO₄ ; 6 ml. Fenol red(1/500) ; 20.0 gr. agar ; 10.0 ml. glukoz (%10) ; 100 ml. üre(%20) ; 1000 ml. distile su ihtiva eden besiyerleri hazırlanarak tüplere bölüştürüldü. Fenol red ; 0.4 gr. Fenol red ; 23.5 ml. NaOH(N/20) ; 76.5 ml distile su ile hazırlandı.

37°C ve 2-3 gün inkübasyondan sonra, tüplerde sarıdan koyu kahverengine kadar değişen bir rengin oluşumu deneyin pozitif olduğunu gösterir. Negatif reaksiyon halinde tüplerde renk değişimi gözlenmez.

2.4.12. Sitrat Deneyi:

Bu test ile mikroorganizmanın sitratı enerji kaynağı olarak kullanabilirliği araştırılır.

5.0 gr. NaCl ; 0.2 gr. MgSO₄ ; 1.0 gr. NH₄H₂PO₄ ; 1.0 gr. KH₂PO₄ ; 5.0 gr. Sodyum sitrat, 1000 ml. distile su ihtiva eden besiyerleri hazırlandı.

37°C'de 2-3 gün inkübasyon uygulandıktan sonra besiyerinde bir bulanıklık varsa reaksiyon pozitif, ortam berraksa reaksiyon negatiftir.

2.4.13. Mannitolda üreme:

111 gr. Mannitol salt agar; 1000 ml. distile su ihtiva eden besiyeri hazırlanarak petri kutularına bölüştürüldü.

37°C'de 2-3 gün inkübasyondan sonra üremenin olup olmadığı gözlemlendi.

2.4.14. Sodyum azidli (%0.02) Besiyerinde üreme:

5 gr. Pepton ; 3 gr. et özütü 0.2 gr. Sodyum azid, 1000 ml. distile su ihtiva eden besiyeri.

37°C'de 2-3 gün inkübasyondan sonra sodyum azidli ortamda üremenin meydana gelip gelmediği gözlenir.

2.4.15. Saburo Dextroz'da üreme:

65 gr. Saburo dextroz agar; 1000 ml. distile su ile hazırlanmış besiyeri kullanıldı.

37°C ve 2-3 gün inkübasyondan sonra bu besiyerinde üremenin oluşup oluşmadığı incelenir.

2.4.16. Anaerobik Ortamda Üreme:

5.0 gr. pepton ; 3 gr. et özütü ; 15 gr agar ; 1000 ml. distile su içeren besiyerleri hazırlanarak petri kutularına bölüştürüldü.

Anaerobik sistemler için, içinde CO₂ jeneratörü bulunan kavanozda 37°C'de 2-3 gün inkübasyondan sonra bakterinin anaerobik ortamda üreyip üremediği gözlenir (38).

2.5. MIKRODALGA UYGULAMASI ;

Tür teşhisi deneyleri yapıldıktan sonra 10 ml'lik Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerine bir öze dolusu ekilen bakteriler 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra bu kültürlerden eşit optik yoğunlukta miktarlar alınarak NB sıvı besiyerine ekim yapıldı. 4 saat inkübasyondan sonra bakterilere mikrodalga fırınında 15 sn süreyle 55 ; 110 ; 165 ; 220 ; 275 ve 330 W'lık mikrodalga uygulandı. Kontrolle (37°C'de mikrodalga uygulanmayan) birlikte bakteriler 20 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Termal etkiyi incelemek için ise ; 10 ml'lik NB sıvı besiyerine ekilen bakteriler 22.5°C, 37°C ve 50°C'de üretilerek farklılıklar incelendi.

2.6. BAKTERİ SAYIMI;

Bakteri sayımı için NB sıvı besiyerinde üretilmiş olan bakterilerde 0.1 ml. alınıp, 10⁴ kez serum fizyolojik (9 gr. NaCl, 1000 ml. distile su) ile seyreltildi. Buradan 0.1 ml. alınarak katı besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra koloniler

sayılarak, ml'deki canlı bakteri sayısı hesaplandı (6).

2.7. BAKTERİLERİN PARÇALANMASI ;

NB sıvı besiyerindeki bakteriler 5.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı dökülerek , pellet 0.05 M, 1 ml Tris (Tris [hydroxymethyl] aminomethane) tamponu (Tris HCl ile PH:7.5'a ayarlandı) içinde çözüldü. 10 dakika buz içinde, ultrasonik homojenizatörle parçalanarak, +4°C'de 5.000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Pellet ve üst sıvı ayrıldı. Üst sıvı üzerinden protein miktar tayini ve elektroforez yapılarak stoplazma proteinlerinin profilleri incelendi.

Pellet %10'luk 1 ml Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile çözünürleştirilerek 15 dakika 5.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst sıvı alınıp protein miktar tayini yapılarak elektroforetik olarak membran proteinlerinin profilleri incelendi. (39)

2.8. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ ;

Protein miktarları Lowry yöntemine göre saptandı (40). Alkalın çözeltisi: %4 Na₂CO₃ ; %4 Na-K Tartarat ; %2 CuSO₄(100:1:1)Folin Reaktifi: 100 gr. Na₂WO₄.2H₂O ; 25 gr. Na₂MoO₄ . 2H₂O ; 50 ml % 85'lik H₃PO₄ ; 100 ml derişik HCl ; 150 gr. Li₂SO₄ ; Birkaç damla Br₂ ; hacim distile su ile

1000 ml'ye tamamlandı. Standart eğriyi çizmek için derişimleri bilinen bir seri Bovin serum Albumin (BSA) çözeltileri hazırlandı. Bütün tüpler distile su ile 500 Ml hacime tamamlandı. Daha sonra tüplere 5 ml alkalın çözeltisi katılarak, 15 dakika 40°C su banyosuna bırakıldı. Sonra üzerlerine Folin reaktifinden (1:1) 0.5 ml katılarak 30 dakika sonra 660 nm'deki absorpsiyon değerleri (A660)okundu. A660 değerlerine karşılık gelen BSA protein miktarlarından yararlanarak standart doğru çizildi. Örneklerin protein içeriği, 660 nm'de okunan absorpsiyon değerleri kullanılarak standart egriden hesaplandı.

2.9. Elektroforez

Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri büyük ölçüde iki faktör tarafından belirlenir: Molekül büyüklüğü ve elektriksel yük. Bu parametrelerdeki farklılıklara dayanan ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. Bunun yanında, bağlanma yeteneginin spesifik özelliklerinden de faydalanılabilir (affinite kromatografisi gibi).

Elektriksel alanda yüklü taneciklerin göç etmesi olayı olarak bilinen elektroforez, proteinlerin ayrılmasında çok etkin bir yöntemdir. Daha çok analitik yöntem olarak kullanılır ama değişik proteinlerin preparatif ayrılması için de kullanılabilir. Tampon çözelti ile ayarlanmış belirli bir pH'da değişik proteinler değişik sayıda yük taşırlar. Elektriksel alan uygulandığında protein

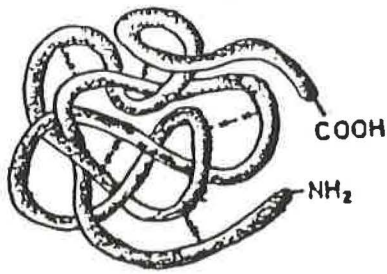
molekülleri elektriksel kuvvetlere göre yürürler. Yürüme hızı, etkileyen elektriksel kuvveti belirleyen molekül şekli ve büyüklüğüne bağlıdır.

Proteinlerin saflaştırılması için en çok kullanılan yöntemler ; diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyonu, elektroforez gibi yöntemlerdir.

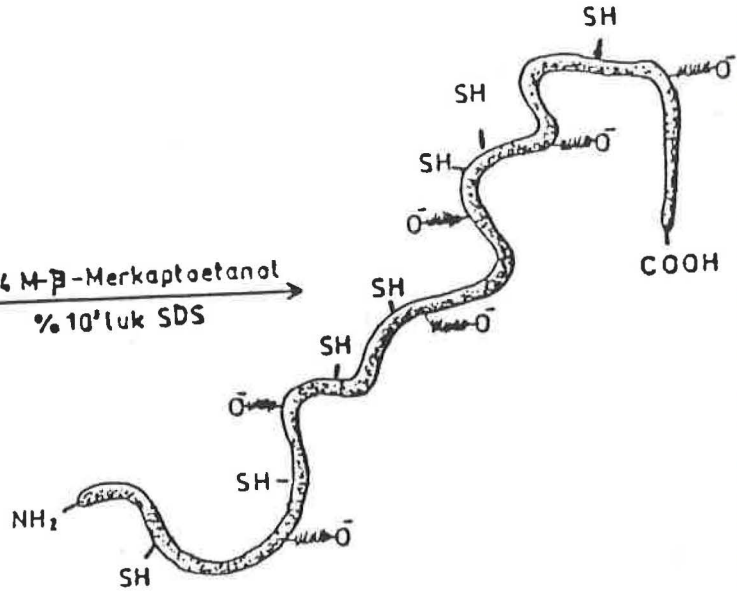
Yük, büyüklük ve biçime bağlı olarak ayırmayı sağlamak için kullanılan en uygun elektroforez metotlarından biri poliakrilamid jel elektroforezidir. Poliakrilamid jel elektroforezinin ayırma gücü proteinlerin molekül ağırlıklarının tayininde kullanılabilir. Bunun için proteinler arasındaki elektriksel yük farkının ortadan kaldırılması ve proteinlerin denatüre edilmeleri gerekir.

Oligomer proteinlerin analizinde, bir deterjan olan ve genellikle denatüre edici bir ayıraç olarak Sodyum Dodesil sülfat ((SDS), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11} \text{O SO}_3^- \text{Na}^+$) kullanılmaktadır. Hidrofobik ve hidrojen bağlarını kıran SDS'nin proteinlerle yaptığı kompleks, negatif yüklü ve çubuk şekilli partiküllerden ibarettir. Bu negatif yüklü SDS-protein kompleksleri birbirini itmekte ve proteinlerin bir araya gelmeleri önlenmektedir. Proteinlerin disülfür bağlarını kırmak için β -Merkapto etanol ($\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) kullanılır(42).

SDS = Meth-O^-



Tersiyer yapıdaki Doğal protein

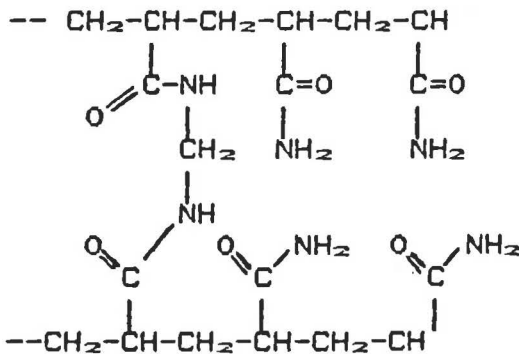
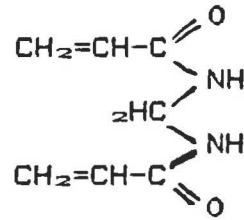
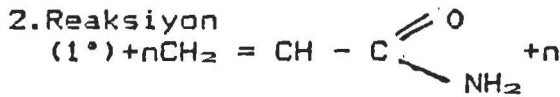


Denatüre edilmiş protein

Poliakrilamid jel elektroforezinde, poliakrilamid jelini oluşturmak için iki monomerik komponent olan akrilamid ve N-N'-metilen bis akrilamid kullanılır. Oluşulan polimerler 3 boyutlu bir ağ meydana getirirler. Bu polimerlerin şekli başlatıcı ve aktive edici bileşiklerin katılması ile düzenlenir:

1.Reaksiyon
 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Amonyum persülfat
Başlatıcı

+ TEMED \rightarrow (1°)
N-N'-N''-N''' Tetra Serbest Redikal
Metil etilen Dramin
Aktive edici



Elektroforez İşlemi:

Elektroforez işlemi Weber & Osborn yöntemine göre yapıldı (43).

A Tamponu: 25,54 gr. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 8.8 gr. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2 gr. SDS. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

B Çözeltisi: 5,5 gr. Akrilamid; 0.15 gr N-N¹ metilen bisakrilamid; 25 ml distile su.

C Çözeltisi: 15 mg/ml Amonyum persülfat

D Çözeltisi: 1:1 oranında sulandırılmış A tamponu

N-N-N¹-N¹ Tetrametil etilendiamin (TEMED); %10'luk SDS; 14 M β -Merkapto etanol; Brom Phenol Blue (BFB); Gliserin.

Boyama solüsyonu: 0.25 gr. Coomasie Brilliant Blue R-250; 25 ml metil alkol; 15 ml glasiyel asetik asit; 60 ml distile su.

Boya çıkarma solüsyonu: 50 ml metil alkol; 75 ml glasiyel asetik asit; Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Standart protein kiti (Dalton Mark VII-L); Albumin Boving (66.000); Albumin egg (45.000); Gliser aldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000); Karbonik anhidraz (29.000); Tripsojen (24.000); Tripsin inhibitör (20.100); α -Laktalbumin (14.200).

Jellerin Hazırlanması:

Jel solüsyonu olarak kullanılan 15 ml A Tamponu ; 13.5 ml B Çözeltisi ; 1.5 ml C Çözeltisi ve 45 ml TEMED buz içinde karıştırılarak hazırlandı. 80 x 5 mm ebadındaki jel tüpleri , alt kısmı parafilm ile kapatılmış bir şekilde jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Buz içinde sürekli karıştırılarak hazırlanan jel solüsyonu (6 cm) jel tüplerine dolduruldu. Jelleşmenin düzgün bir şekilde olması için üzerine distile su (1 cm) konuldu. 15 dakika U.V.lambasının önünde bırakılarak jelin iyi polimerize olması sağlandı. Elektroforez işlemi için hazırlanmış tüplere distile su, 2 ml A Tamponu , 5 ml SDS (%10) , 1 ml β -Merkapto etanol (14 M) , distile su ile hacim 75 ml olacak şekilde protein çözeltisi konularak , proteinlerin denatüre olması için tüpler 10 dk 90°C'de ısıtıldı. Daha sonra üzerlerine 10 ml BFB , 20 ml Gliserin , 5 ml β -Merkapto etanol , 50 ml D Tamponu katılıp karıştırıldı.

Jel tüplerinin alt yüzeyini kapatan parafilm çıkarılarak , jel tüpleri elektroforez aygıtına yerleştirildi. Hazırlanmış protein çözeltileri jel tüplerine verildi. Önceden hazırlanmış olan A Tamponu 1:1 oranında seyreltilerek aygıtın alt ve üst bölümüne boşaltıldı. Tamponun üst yüzeylerinin akım geçecek olan elektrotlarla temas etmesi sağlandı. Aynı şekilde jel tüplerinin alt ve üst uçlarının solüsyonla temas etmesi ve uçlarında hava

kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Her jel için 8 mA'lık bir akım uygulandı , BFB boyasının ilerleyişi kontrol edilerek proteinlerin yürümesi izlendi. BFB boyası jel tüplerinin alt kısmına yaklaşıncaya akım kesilerek , elektroforez işlemine son verildi. Jel tüpleri elektroforez aygıtından çıkarılarak bir enjektör yardımıyla jeller jel tüpünden çıkarıldı. BFB boyasının ilerlediği mesafeyi bilmek için , boyanın ilerlemiş olduğu kısım bir iğne yardımıyla delindi. Jeller temiz tüplere alınarak, üzerlerine boyama solüsyonu bırakılıp , jelin boyanması için 30 dk beklendi. Jeller boyadan alınarak üzerlerine boyanın çıkması için boya çıkarma solüsyon dökülerek beklendi.

Böylece farklı dozlarda mikrodalga uygulanan ve 22.5°C ; 37°C ve 50°C'de üretilen *Bacillus coagulans* ve *staphylococcus simulans*'ın eşit miktarda proteine göre verilmiş olan membran ve stoplazma proteinlerinin elektroforez bant profilleri incelendi.



Resim - 2.1. Elektroforez deneyinde kullanılan elektroforez aygıtı.

BÖLÜM III

3.1. BULGULAR

Çermik Belkıs Hatun Termal kaplıcalarından getirilip saflaştırılan ve Materyal ve Metod kısmında verilen bir seri deneyin yapılması sonucu teşhis edilen bakterilerle ilgili sonuçlar ve bunların ilgili literatürlerle karşılaştırılması Çizelge-3.1.'de verilmiştir.

Buna göre soyutlanan bakterilerin *Bacillus coagulans* ve *Staphylococcus simulans* olduğu sonucuna varıldı.

Farklı dozlarda mikrodalga uygulanmış ve 22,5 ;37 ve 50°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra üretilen bakterilerin sayımı için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

$$N = \frac{1}{V} \times x^- \times D$$

N: 1 ml'deki canlı bakteri sayısı

V: Ekilen miktar

x⁻: Koloni sayısı

D: Seyreltme miktarı

Mikrodalga esnasında meydana gelen sıcaklığı belirlemek için Ni-Cr/Ni alaşımından yapılmış termocit kullanıldı (44). Bu termocit ile ölçülen mV ve ona

karsılık gelen sıcaklık degerleri Çizelge-3.2'de belirtilmektedir.

Staphylococcus simulans ve *Bacillus coagulans* için kontrol ve mikrodalga uygulanması sonucu, bakteri sayısı ile eşit sayıdaki bakterinin stoplazma ve membran protein miktarları sırasıyla Çizelge-3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Termal etkiyi incelemek üzere 22.5 ; 37 ve 50°C'de üretilen *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans* için bakteri sayısı ile eşit sayıdaki bakterinin stoplazma ve membran protein miktarları Çizelge-3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Staphylococcus simulans ve *Bacillus coagulans*'ın gram boyamadan sonra mikroskop altındaki görüntüleri Resim-3.1 ve 3.2'de görülmektedir.

Mikrodalga uygulanmış *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans*'ın stoplazma çözünür proteinleri ve membran proteinlerinin her biri kendi içinde, eşit miktarlarının elektroforez bant profilleri sırasıyla Resim-3.3 ; 3.4 ; 3.5 ; 3.6'da verilmiştir.

22.5 ; 37 ve 50°C'de üretilen *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans*'ın stoplazma çözünür proteinleri ve membran proteinlerinin her biri kendi içinde, eşit miktarlarının elektroforez bant profilleri ise sırasıyla Resim-3.7 ; 3.8 ; 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

Staphylococcus simulans ve Bacillus coagulans için, uygulanan güç ile eşit sayıdaki bakterinin stoplazma ve membran protein miktarlarına ilişkin grafikler Şekil-3.1 ve Şekil-3.2' de belirtilmiştir.

Termal etkiyi incelemek üzere 22.5 ; 37 ve 50° C' de üretilen Staphylococcus simulans ve Bacillus coagulans için üretilen sıcaklık ile eşit sayıdaki bakterinin stoplazma ve membran protein miktarlarına ilişkin grafikler Şekil-3.3 ve Şekil-3.4' de belirtilmiştir.

BÖLÜM - IV

SONUÇLARIN TARTIŞILMASI

Mikrodalğanın termal etkileri ile ilgili çalışmalardan giriş kısmında söz etmiştik ; mikrodalğanın termal etkisinin ortaya çıkması için $10\text{mW}/\text{cm}^2$ yoğunluğunda bir ısınlama gerekmektedir. Hücresel ve biyokimyasal düzeylerde değişiklikler $1\text{mW}/\text{cm}^2$ veya düşük dozlarda başlamaktadır.

Mikrodalğanın termal olmayan etkileri de 50 yıldan beri bilinmekte ve bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Amerika'da hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar yüksek dozlarda sürekli mikrodalga etkisinin dokularda mutasyona , gözde perde oluşmasına , anormal çocuk doğumlarına , davranış bozukluklarına , demir metabolizmasında bozukluklara , akyuvar artışlarına (Lökozitoz) , alyuvar azalmasına (anemi) , kromozomal bozukluklara , v.s. neden olduğu saptanmıştır.

Mikrodalga fırınların günlük yaşama girmesinden ve mikrodalğanın canlı sistemler üzerindeki olumsuz etkilerinden yola çıkarak , farklı morfolojik gruplardan seçilen *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus coagulans*'ın genetik materyalleri üzerindeki etkisinin bir yansıması olarak protein miktarları ve proteinlerinin elektroforez profilleri incelenmeye çalışıldı.

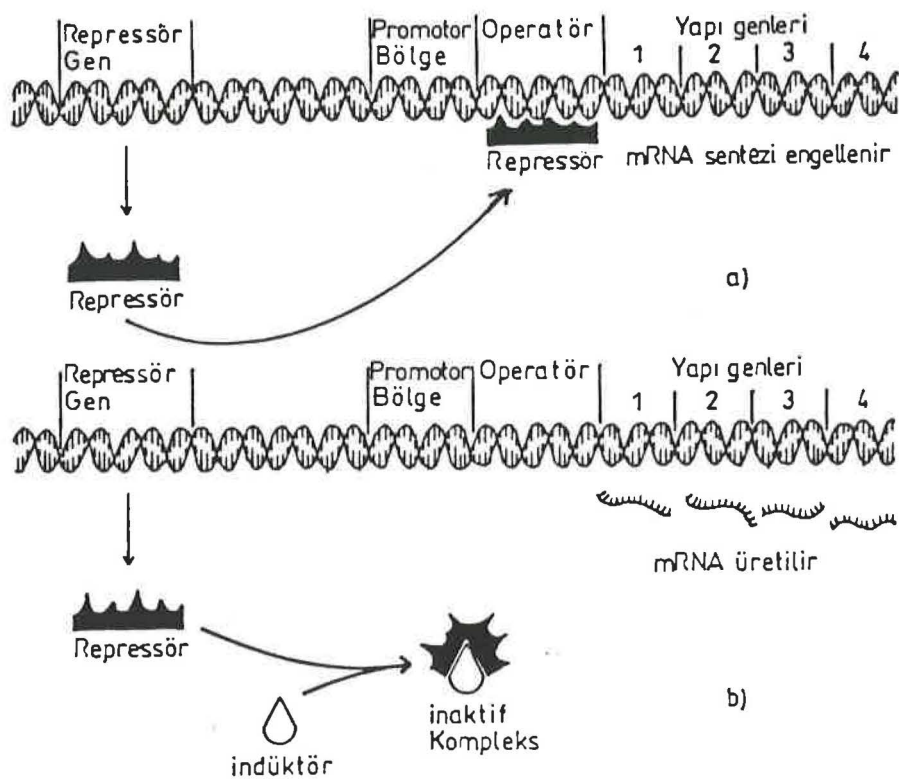
Cizelge-3.3'de değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış eşit sayıdaki (3.7×10^6 tane/ml) *Staphylococcus simulans*'ın stoplazma çözünür protein miktarı ile %10'luk SDS ile

çözünürleştirilebilen membran protein miktarları ile eşit sürede ve optik yoğunlukta bakteri inokülasyonu sonucu ulaşılan bakteri yoğunluğu mililitredeki bakteri sayısı cinsinden verilmiştir.

55 W'lık mikrodalga uygulanan bakteri örneğinin stoplazma çözünür protein içeriğinin kontrole nazaran azaldığı , bu değerin 110 ve 165 W'lık uygulamalarda arttığı 220 W'lık uygulamada ise yeniden azaldığı görülmektedir.

Bu artma ve azalmalar , termal etki nedeniyle enzim aktivitelerindeki değişimlere bağlanabileceği gibi(17,18), mikrodalga etkisiyle besiyeri ortamında oluşan radikallerin mutasyona neden olmasıyla da açıklanabilir (20,12). Oluşan radikaller operon modelinde gösterilen represörlerin sentezinden sorumlu gende bir mutasyona neden olursa , represör operatör bölgeye bağlanamayacağından ilgili yapısal genlerin çalışması kontrol dışı kalır. Böylece yaşamsal öneme sahip olmayan proteinlerin sentezinde bir artma meydana gelecektir.

Eğer yapısal genlerin birleştiği yerde bir nokta mutasyon oluşmuş ise , sentezlenmesi gereken farklı protein sayısından daha az sayıda protein sentezleneceğinden , eşit miktarda bakteri ihtiva eden stoplazma çözünür protein miktarı kontrole nazaran bir azalma gösterir.



Gen aktivitesinin regülasyon şeması. (a) da represör molekül transkripsiyonu bloke eder, (b) de indüktör represörü inaktive etmiştir ve böylece transkripsiyon engelsiz yürümektedir (41).

Resim-3.3'te de görüldüğü gibi 165,220,275 ve 330 W'lık uygulamalar ile elde edilen elektroforez profillerinde , kontrol , 55 ve 110 W'lık uygulamalarda görülmeyen büyük molekül ağırlıklı proteinlere ait (165 W : 68.000 ; 220 W : 68.000 ve 74.000 ; 275 W : 70.000 ; 76.000 ; 100.000 ; 330 W : 68.000 ; 100.000 Dalton) bantların böyle bir nokta mutasyondan veya sözü edilen proteinlerin sentezinden sorumlu yeni genlerin oluşmasına neden olabilen daha anlamlı mutasyondan kaynaklanmış olabilecekleri düşünülmektedir.

Çizelge-3.3'de belirtildiği gibi mikrodalga uygulama ile Staphylococcus simulans'ın membran protein miktarları kontrole nazaran azalmaktadır. Ancak , farklı dozlarda

mikrodalga uygulanmasına karşın kontrole nazaran , özütlenebilen membran protein miktarındaki azalmanın hemen hemen sabit olması , uygulanan her dozun membranın bileşiminden sorumlu genlerin aynı oranda etkilendiğini düşündürürse de , bu örneklerin elektroforez bant profilleri düşünceyi geçersiz kılmaktadır. Çünkü her doz uygulama sonucu elde edilen profil bantları molekül ağırlığı ve bir diğelerlerinden farklı , en az bir proteini içermektedir. Mikrodalğanın transport sistemini etkilediği (37) , ve transporttan membran proteinlerinin sorumlu olduğu düşünülürse elde edilen sonuçların Straub'un arkadaşlarıyla ileriye sürdüğü görüşü desteklediği kanısındayız.

Çizelge-3.3'te eşit miktarda inokülasyondan uygulanan mikrodalga dozunun artmasına koşut olarak üreyen bakteri sayısının azalması , uygulanan mikrodalga dozunun giderek arttırılması halinde öldürücü etkisini göstereceği aşıkardır. Bu özelliğinden yararlanarak mikrodalga fırınlar özellikle ameliyathanelerde , neşter , pens , makas , v.b. ameliyat gereçlerinin sterilizasyonunda kullanılmaktadır.

Çizelge-3.4 , Resim-3.5 ve Resim-3.6'dan , *Bacillus coagulans*'ın da *Staphylococcus simulans* gibi mikrodalgadan etkilendiği , *Bacillus coagulans*'ın fakültatif termofil , *Staphylococcus simulans*'ın termotoleran olması ve farklı morfolojik grupların üyeleri olmaları nedeniyle ultra yapılarında ki değişikliklere bağlı olarak , etkilenme şiddetlerinin farklı olabileceği anlaşılabilir. Ürnegin

kontrole nazaran 55 W'lık uygulama ile *Bacillus coagulans*'ın protein miktarında artma olmasına karşın , aynı doz *Staphylococcus simulans*'ta protein miktarının kontrole nazaran azalmasına neden olmaktadır. Bu sonuç , Webb'in ileriye sürdüğü gibi (18) mikrodalğanın DNA , RNA ve protein sentezini stimule etme veya inhibe etme etkisiyle açıklanabilir.

Çizelge-3.4'te verilen membran protein miktarlarının beklenenden fazla olması pellet içerisinde , parçalanmamış hücrelerin membran proteinlerinin de SDS ile alınmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge-3.5 ve Çizelge-3.6'da sıcaklığa bağlı olarak *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus cagulans*'ın çözünür stoplazma proteinleriyle membran protein miktarlarındaki değişim verilmiştir. 37°C'de eşit sayıdaki bakteri stoplazma proteinlerinin 22.5 ve 50°C'de üretilenlerden fazla olması 37°C'nin *Staphylococcus simulans* ve *Bacillus cagulans*'ın optimal üreme sıcaklığına yakın olması , dolayısıyla bu sıcaklıkta metabolik aktivitenin yüksek olmasına bağlanabilir.

Resim-3.7 ve Resim-3.9'da eşit miktarda protein verilmesine karşın 22.5 ve 50°C'ye ait jellerde 37°C'de görülmeyen , molekül ağırlığı 66.000 Daltondan büyük üç yeni bant görülmektedir. Bu bantların ancak antibiyotik gibi değişik ortam koşullarında faaliyet gösteren genler gibi ,

çevreye adaptasyondan sorumlu genlerden kaynaklandığı ileriye sürülebilir.

Membran proteinlerinin 22.5°C'de görülmemesi ideal metabolik ortamın olmamasından kaynaklanmaktadır. Buna bağımlı olarak , taşımada ihtiyaç duyulmayan proteinler meydana getirilmemektedir. Membranların lipid ve protein ağırlıklı olduğu düşünüldüğünde , membranda o koşullarda bulunan proteinlerin SDS gibi deterjanlarla membrandan koparılamadığını düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucu , protein miktar tayinlerinden ve elektroforez bant profillerinden , mikrodalga'nın protein sentezini gen düzeyinde etkilediği , bu etkinin uygulanan mikrodalga'nın dozuna , mikroorganizmanın morfolojik yapısına ve içinde bulunduğu bölünme evresine bağlı olarak değişiklikler gösterdiği kanısına varılabilir.

Cizelge - 3.1. Bacillus coagulans ve Staphylococcus simulans için elde edilen veriler.

Özellik	Bacillus coagulans		Staphylococcus simulans	
	Denel	Referans	Denel	Referans
Max.üreme sıc.(°C)	54,5	55-60	51	Belirtilmemiş
Min.üreme sıc.(°C)	22,5	15-25	22	Belirtilmemiş
Genişlik (Mm)	0,7-0,8	0,6-1,0		
Uzunluk (Mm)	5-6	2,5-5		
Çap (Mn)			1,36	Belirtilmemiş
Gram reaksiyon	+	+	+	+
Hemoliz	-	Belirtilmemiş	-	Zayıf veya -
Hareket	+	+	-	+
Spor oluşturma	+	Zayıf	+	-
Nişasta hidrolizi	+	+	+	Belirtilmemiş
Kazein hidrolizi	+	+/-	+	Belirtilmemiş
Jelatin hidrolizi	+	Belirtilmemiş	-	-
Katalaz üretimi	+	+	+	Belirtilmemiş
Lipaz hidrolizi	+	Belirtilmemiş	-	-
NO ₃ 'ü indirgeme	+	+/-	-	+
NH ₃ üretimi	+	Belirtilmemiş	+	Belirtilmemiş
%3 NaCl'de üreme	+	Belirtilmemiş	+	Belirtilmemiş
%10 NaCl'de üreme	-	Belirtilmemiş	-	Belirtilmemiş
Sukroz	-	Belirtilmemiş	+	+
Xyloz	-	-/+	-	-
Laktoz	+	Belirtilmemiş	+	Belirtilmemiş
Glukoz	+	+	+	Belirtilmemiş
Ureaz	+	Belirtilmemiş	+	Belirtilmemiş
Mannitolda üreme	+	+/-	-	-/+
Sitratlı Besiyerinde üreme	-	Belirtilmemiş	-	Belirtilmemiş
Anaerobik Besiyerinde üreme	+	+	+	Belirtilmemiş
Saburo Dextrozda üreme	+	+	+	Belirtilmemiş
Sodyum Azid(%0,02)	-	+	-	Belirtilmemiş
Trehaloz		Bakılmadı	-	-/+
Maltoz		Bakılmadı	-	-/+
Indol Besiyeri	-	-	-	Belirtilmemiş

Cizelge-3.2: Değişik dozlarda mikrodalga uygulanması sonucu oluşan ortalama ve maximum mV ve ona karşılık gelen sıcaklık değerleri.

Uygulanan güç (Watt) süre:15 sn	Ortalama mV değerleri	Sıcaklık (°C)	Maximum mV	Sıcaklık (°C)
55	0.1	39.5	17.9	472.4
110	0.3	44.5	44.3	1083.6
165	0.3	44.5	5.5	134.3
220	0.4	47	28.2	677.8
275	0.4	47	8.3	204.2
330	0.6	52	14.3	350.2

Cizelge-3.3: Değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Staphylococcus simulans*'ın bakteri sayısı , stoplazma ve membran proteinleri miktarı.

Uygulanan Güç(Watt) Süre:15sn	Bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^6$	Eşit miktarda bakterinin ($3,7 \cdot 10^6$ tane/ml) Stoplazma proteinleri (mg/ml) Membran proteinleri (mg/ml)	
Kontrol	11,2	3,63	0,82
55	9,2	2,02	0,62
110	5,4	2,98	0,60
165	5,2	3,26	0,62
220	3,8	2,43	0,57
275	4	2,72	0,44
330	3,7	2,55	0,67

Cizelge-3.4: Değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Bacillus coagulans* 'ın bakteri sayısı , stoplazma ve membran proteinleri miktarı.

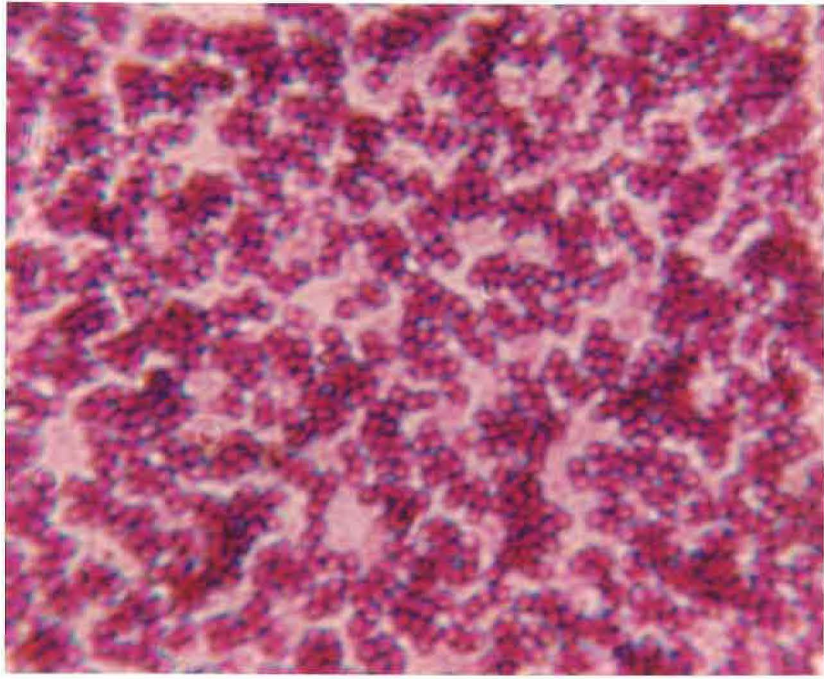
Uygulanan Güç(Watt) Süre:15sn	Bakteri sayısı (tane/ml) $\times 10^6$	Eşit miktarda bakterinin ($1 \cdot 10^6$ tane/ml) Stoplazma proteinleri (mg/ml) Membran proteinleri (mg/ml)	
Kontrol	9	2,22	1,29
55	90,1	3,46	2,65
110	2	1,056	1,056
165	6	2,09	2,09
220	1	2,16	0,672
275	3	2,76	1,51
330	1,1	2,02	0,74

Cizelge-3.5: 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen Staphylococcus simulans 'ın bakteri sayısı , stoplazma ve membran proteinleri miktarı.

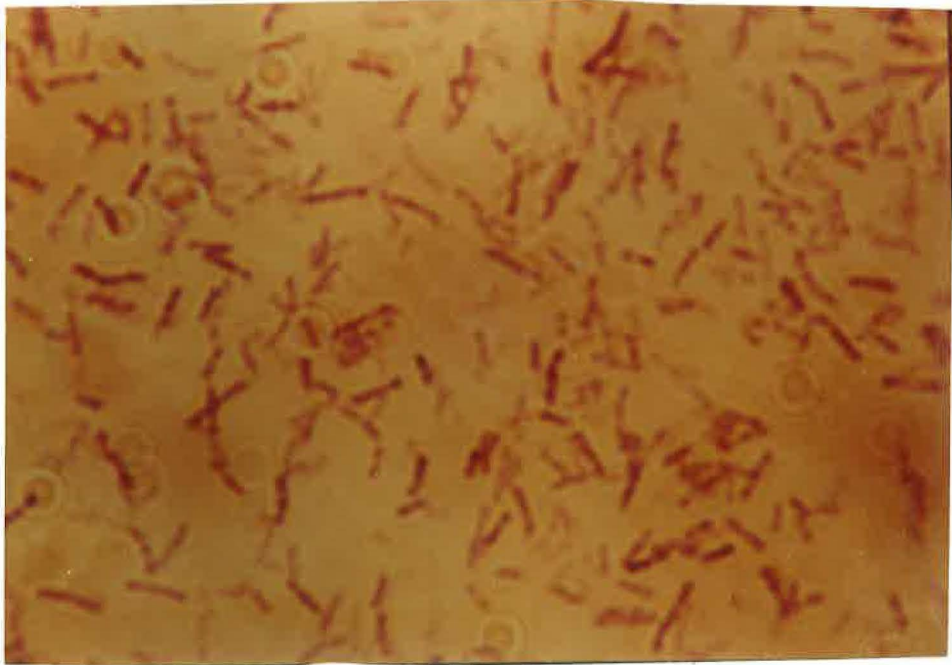
Üreme sıcaklığı (°C)	Bakteri sayısı (tane/ml) x 10 ⁶	Eşit miktarda bakterinin (2,2.10 ⁶ tane/ml)	
		Stoplazma prote- inleri (mg/ml)	membran prote- inleri (mg/ml)
22,5	14,3	1,73	1
37	11,2	2,23	1,41
50	2,2	1,9	2,016

Cizelge-3.6: 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen Bacillus coagulans 'ın bakteri sayısı , stoplazma ve membran proteinleri miktarı.

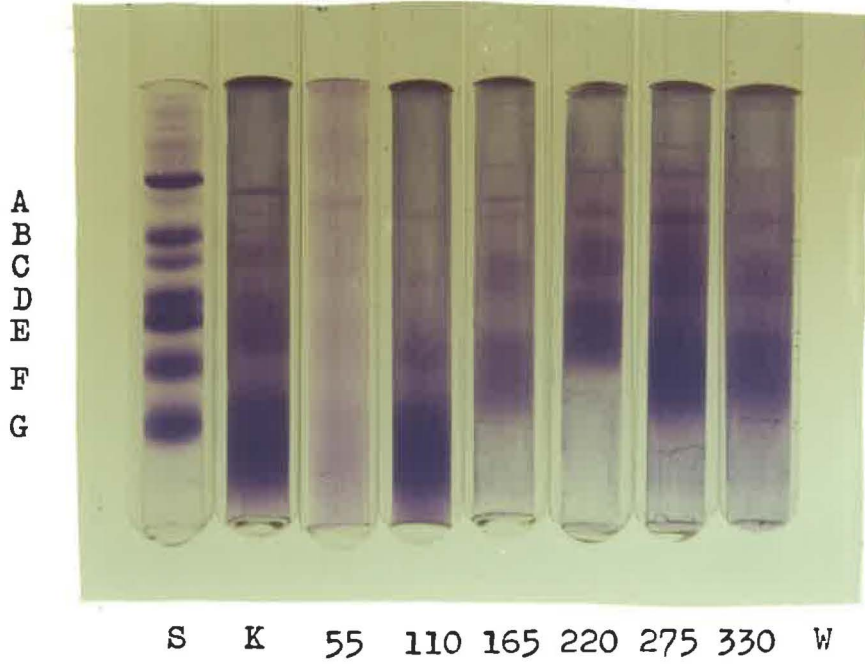
Üreme sıcaklığı (°C)	Bakteri sayısı (tane/ml) x 10 ⁶	Eşit miktarda bakterinin (2,2.10 ⁶ tane/ml)	
		Stoplazma prote- inleri (mg/ml)	membran prote- inleri (mg/ml)
22,5	24,4	0,64	0,270
37	9	2,51	0,607
50	20,2	1,63	1,27



Resim-3.1: *Staphylococcus simulans*'ın Gram Boyamadan sonra mikroskop altındaki görüntüsü (1360 kez büyütülmüş).



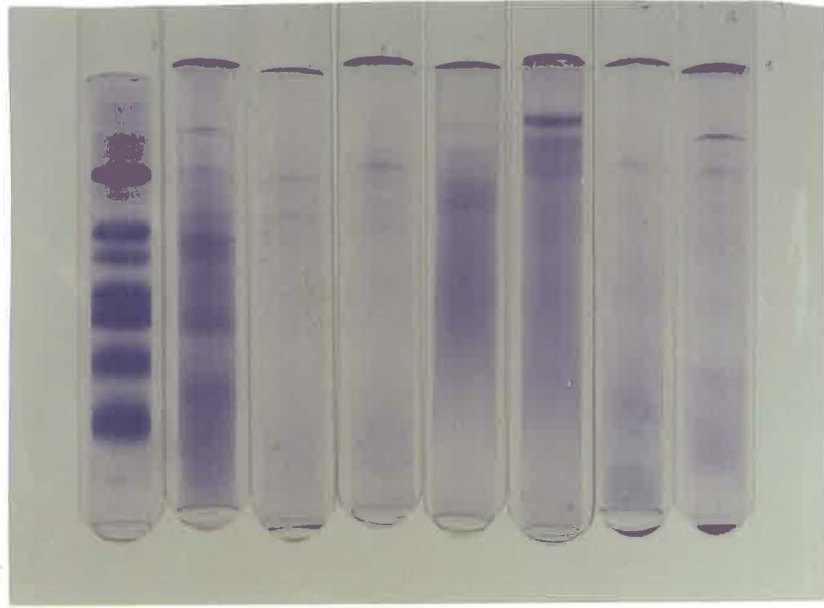
Resim-3.2: *Bacillus coagulans*'ın Gram Boyamadan sonra mikroskop altındaki görüntüsü (1360kez büyütülmüş).



Resim-3.3: Degişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Staphylococcus simulans*'ın stoplazma proteinlerinin esit miktarda protein (2,02 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100); G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

A
B
C
D
E
F
G

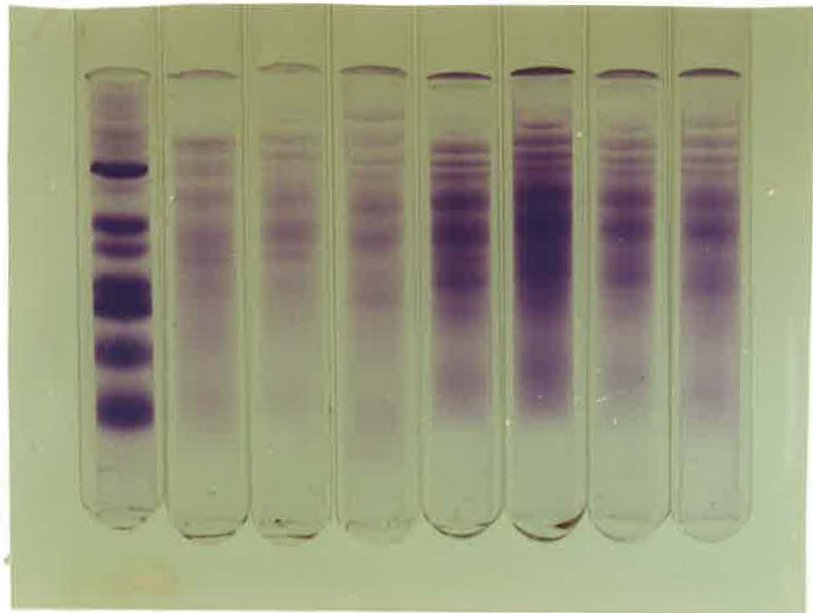


S K 55 110 165 220 275 330 W

Resim-3.4 :Değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Staphylococcus simulans*'ın membran proteinlerinin eşit miktarda protein (0,44 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

A
B
C
D
E
F
G

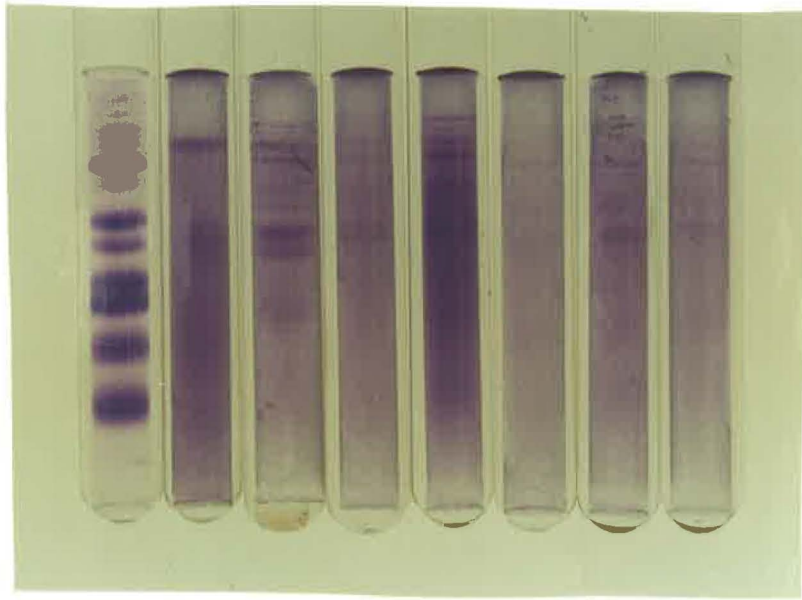


S K 55 110 165 220 275 330 W

Resim-3.5 :Değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Bacillus coagulans*'ın stoplazma proteinlerinin eşit miktarda protein (1,056 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

A
B
C
D
E
F
G



S K 55 110 165 220 275 330 W

Resim-3.6 :Değişik dozlarda mikrodalga uygulanmış *Bacillus coagulans*'ın membran proteinlerinin eşit miktarlarda protein (0,672 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ; E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100); G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

A
B
C
D
E
F
G

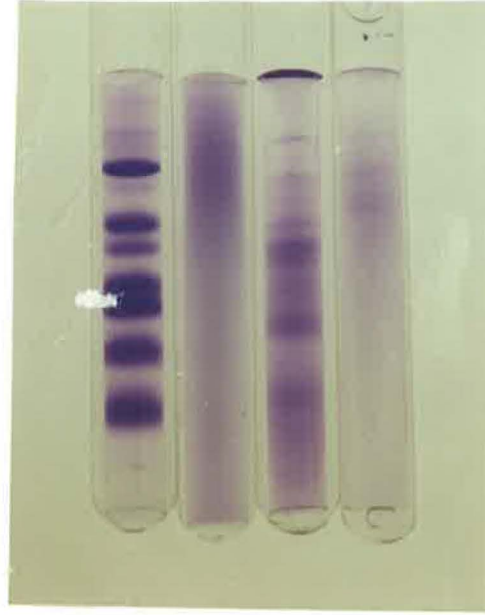


S 22,5 37 50 °C

Resim-3.7 : 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen *Staphylococcus simulans*'ın stoplazma proteinlerinin eşit miktarda protein (1,73 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

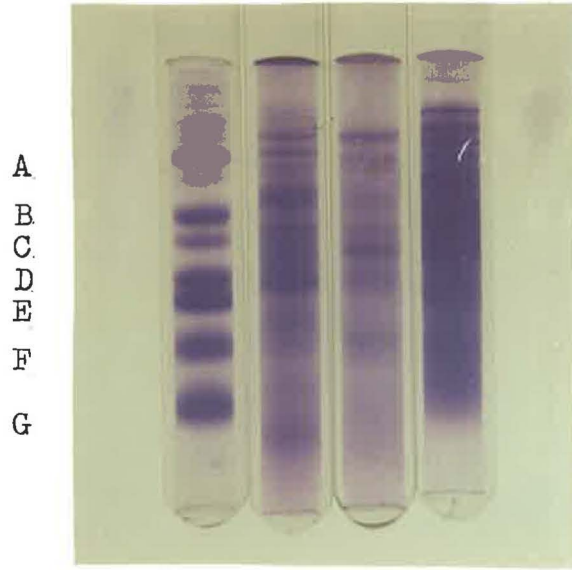
A
B
C
D
E
F
G



S 22,5 37 50 °C

Resim-3.8.: 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen *Staphylococcus simulans*'ın membran proteinlerinin eşit miktarda protein (1 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

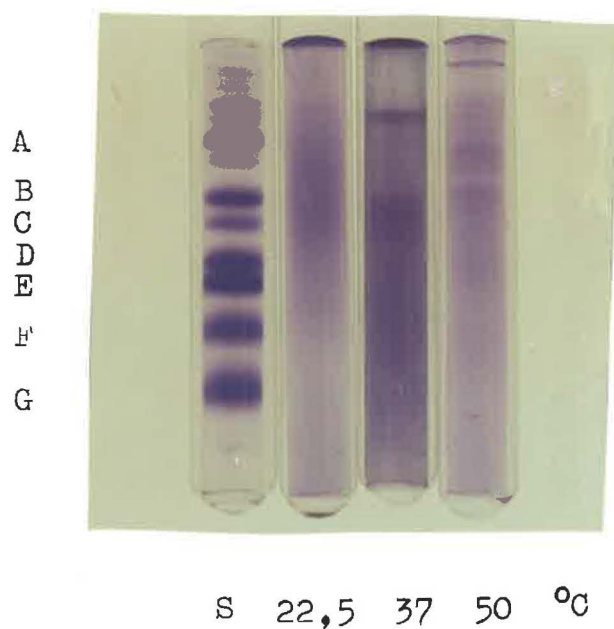
S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ; E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).



S 22,5 37 50 °C

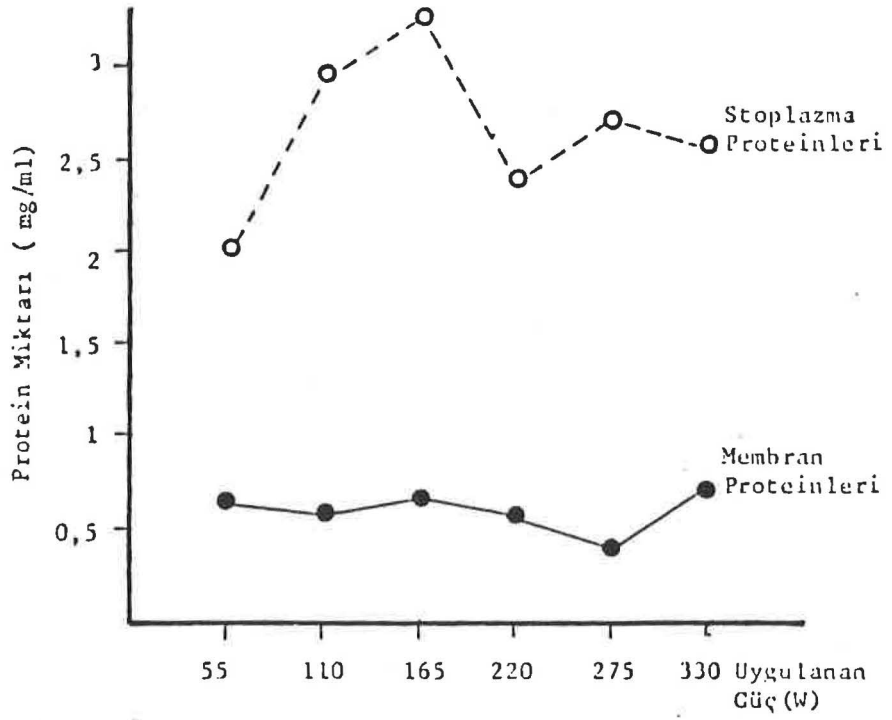
Resim-3.9 : 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen *Bacillus coagulans*'ın stoplazma proteinlerinin eşit miktarda protein (0,64 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Boving (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).

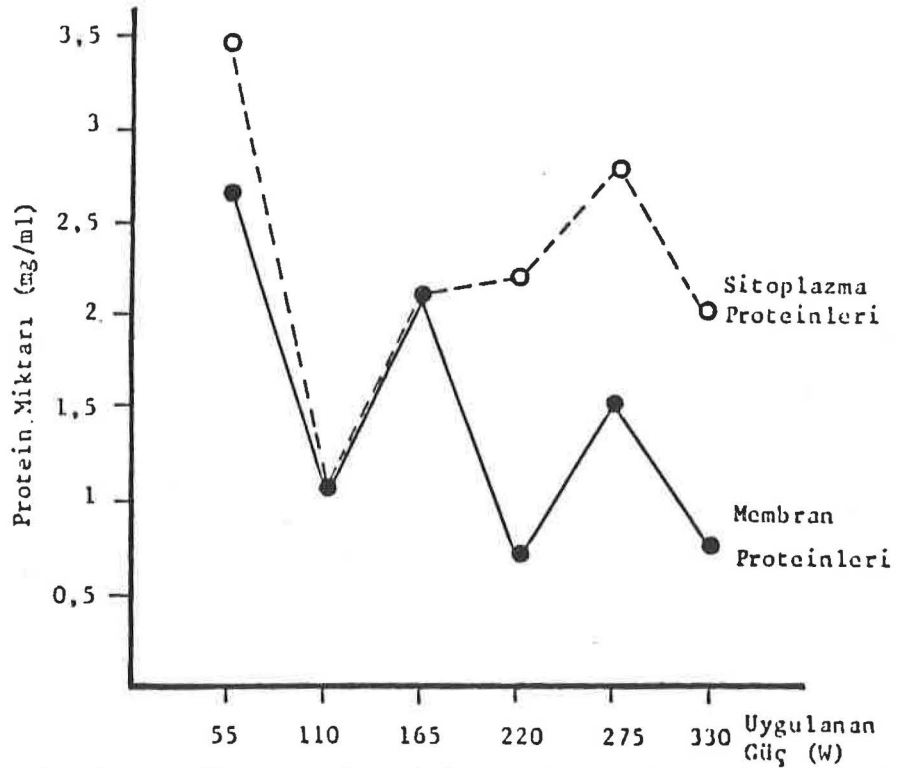


Resim-3.10 : 22,5 ; 37 ve 50 °C'de üretilen *Bacillus coagulans*'ın membran proteinlerinin eşit miktarda protein (0,270 mg/ml) verilmiş elektroforez bant profilleri.

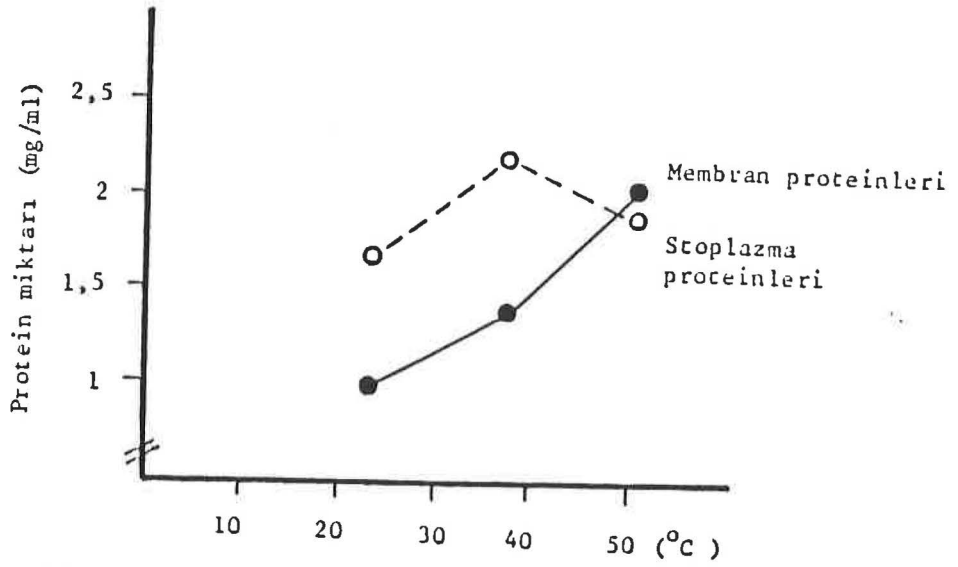
S:Standart proteinler ; K: Kontrol ; A: Albumin Bovine (66.000 Dalton) ; B: Albumin egg (45.000 Dalton) ; C: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Dalton) ; D: Karbonik Anhidraz (29.000 Dalton) ;E:Tripsinojen (24.000 Dalton) ; F: Tripsin inhibitör (20.100);G: α -Laktalbumin (14.200 Dalton).



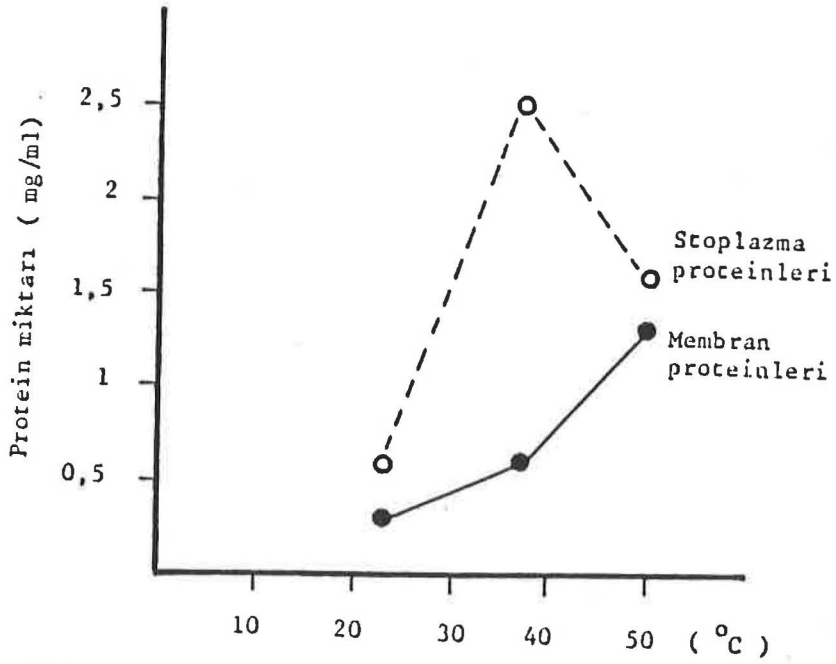
Şekil 3.1 *Staphylococcus simulans* için uygulanan mikrodalga güçleri ile sitoplazma ve membran protein miktarları arasındaki ilişki



Şekil 3.2 : *Bacillus coagulans* için uygulanan mikrodalga güçleri ile sitoplazma ve membran protein miktarları arasındaki ilişki



Şekil 3.3 : *Staphylococcus simulans* için, sıcaklık ile sitoplazma ve membran protein miktarları arasındaki ilişki



Şekil 3.4 : *Bacillus coagulans* için sıcaklık ile sitoplazma ve membran protein miktarları arasındaki ilişki

ILAVE - I:

DIYARBAKIR-CERMİK KAPLICASI

Yeri: Diyarbakır iline bağlı Cermik ilçesindedir. Kaplıca mahallinin yüksekliği 600 metredir.

Kısa tarihçesi: Cermik kaplıcası , tarihi kaplıcalarımızdan olup , Selçuklular zamanında işletilmiştir. Mevcut tarihi havuzlar Selçukluklardan kalmadır.

Konaklama tesisleri: Kaplıcadaki muhtelif konaklama tesislerinin toplam yatak kapasitesi 100 kadardır.

Tedavi tesisleri: İki adet umumi havuz ve Dicle Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi'nden ibarettir.

Yardımcı tesisler: Bir gazino ile bir lokanta bulunmaktadır.

Şifalı suyun grubu: Sodyum , bikarbonatlı , klorürlü , sülfatlı , iodlu , bromürlü , kükürtlü.

Şifalı suyun teknik vasıfları: Cermik kaplıcası kaynaklarının sıcaklıkları 52 °C , pH değerli ise 7,3'dür.

Endikasyon (Şifa Niteliği):

Banyo tedavisi ile: "Romatizmalar , nevrit , polinevrit , çocuk felçleri ve kadın hastalıklarında. Ayrıca serpintileme ile de ; dermaztozlar ile solunum yolu hastalıkları" için tavsiye edilmektedir.

Ulaşım durumu: Kaplıca , Cermik ilçesine 3 km. uzaklıktadır.

Sezon süresince kaplıcaya Cermik'ten devamlı şekilde karayolu taşıt araçları işletilmektedir.

Enformasyon (Danışma): Her türlü bilgi ve rezervasyon için Cermik Belediyesine müracaat edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Brock, D.T: Thermophiles , General , Molecular And Applied Microbiology. A.Wiley-Interscience Publication John Wiley and Sons Newyork , Chishester , Brisbane , Toronto , Singapore. P:1-5 , (1986).
2. Farrell, J. , and Campell , L.L. Advan. Microbial. Physiol. 3:83-109 (1969).
3. Akman , M.‡ Bakteri Genetigi , Teorik-Pratik. 2.Baskı. Cumhuriyet Universitesi Tıp Fakültesi Yayını , No:8 ; 79-83 (1983).
4. Singleton , R. , J.R. and Amelunxen R.E. Bacteriological Reviews. 37:320-342 (1973).
5. Conn , E.E and Stumpf , P.K. : Outlines of Biochemistry. Third Edition. Department of Biochemistry and Biophysics University of California at Davis , John Wiley and Sons. Inc, 127-141 (1972).
6. Arda , M.: Genel Bakteriyoloji , A.O. Vet. Fak. Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü. A.O. Basım evi. Ankara. (1978).
7. Howard , J.B. , Klass , J. , Rubin , S.J. , Weissfeld , A.S , Tilton , R.C: Clinical and Pathogenic Microbiology. The C.V. Mosby Company. St. Louis. Washington , D.C Toronto. 231-244. (1987).
8. Buchanan , R.E. , and Gibbons , N.E. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eighth Edition. The Williams and Wilkins Company / Baltimore. p. 529 - 541. (1974).

9. Chipley , R.J. U.S Tobacco Company , Nashville , Tennessee. USA Adv. Appl. Microbiol. 26 , 129-130. 1980.
10. Ingram , M. , and Page , L.J Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 16, 69. (1953).
11. Brown , G.H. , and Morrison , W.C. Food Technol. 8, 361. (1954).
12. Delaney , E.K. , Van Zonte , H.J. , and Hartman , P.A. Microwave Energy Appl. Newsl. I, 11. (1968).
13. Lechowich , R.V. , Beuchat , L.R. , Fox , K.I , and Webster , F.H. Appl. Microbiol. 17,106. (1969).
14. Roberts. P.C.B., J.Sci. Food. Agric. 23,554. (1972).
15. Correlli , J.C. , Gutmann , R.J. , Kahzi , S. , and Levy, J.J. Microwave Power 12, 141. (1977).
16. Hamrick , P.E. , and Buttler , B.T , J. Microwave power 8, 227. (1973).
17. Webb , S.J. , and Booth , A.D. Nature(London) 222 , 1199. (1969).
18. Webb , S.J. , Ann , N.Y Acad , Sci. 247 , 327. (1975).
19. Berteaud , A.J. , Dardalhon , M. , Rebeyrotte , N. , and Averbach , D.C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 281, 843. (1975).
20. Grezz , N. , Walker , A.A. , and Anellis , A. Bacteriol. Proc. P.145. (1964).
21. Dreyfuss , M.S. , Thesis. Ohio State University , Columbus. (1978).
22. Webb , S.J. , and Dodds , D.D. Nature(London) 218,374. (1968).

23. Dreyfuss , M.S. , Chipley , J.R. , and Kolodziej , B.J. Appl. Environ. Microbiol. (submitted for publication). (1980).
24. Chipley , J.R. , Rohlf s , L.A. , and Ford , C.L. Microbios (submitted) . (1980).
25. Yeagers , E.K. , Langley , J.B. , Sheppard , A.P., and Huddleston, G.K., Ann. N.Y. Acad. Sci. 247 . 301 . (1975).
26. Tungler , P. , Keilmann , F., and Genzel , L. Z.Naturforsch. Tell C 34, 60. (1979).
27. Belkhode , M.L., Johnson, D.L. , and Muc, A.M: Health Phys. 26,45. (1975).
28. Belkhode . M.L., Muc, A.M. , and Johnson, D.L. J, Microwave Power 9, 23. (1975).
29. Clary , S.F. Crit. Rev. Environ. Control 7, 121 . (1977).
30. Milroy, W.C. , and Michaelson, S.M. Health Phys. 20, 567.(1971).
31. Lystov , V.N. , Frank-Kamenetskii , D.A. , and Shchedrina , M.V. Biyofizika 10,114. (1965).
32. Luczuk ,M., Szmigielski, S. , Janiak , M. , Kobus , M. , and deClerg. E. J. Microwave Power 11,173. (1976).
33. Vela , G.R. , and Wu , J.F. Appl. Environ. Microbiol. 37,550. (1979).
34. Kalant , H. Can. Med. Assoc. J. 81, 571. (1959).
35. Dreyfuss , M.S. and Chipley , J.R. Appl. Environ. Microbiol. 39, 13. (1980).

36. Barnes , F.S. , and Hu , C.L. J. IEEE Trans. Microwave Theory Tech. 25, 742. (1977).
37. Straub , K.D. , and Carver , P. Ann. N.Y. Acad. Sci. 247, 292. (1975).
38. Crabtree , K.T. , Hinsdill , R.D. : Fundamental Experiments in Microbiology, W.G. Saunders Company. USA.(1974).
39. O'Tairo , I. Kazutomo ; International Journal of Systematic Bacteriology. 24(1) :102-112. (1974).
40. Lowry , O.H. , Rosebrough , N.Y. , Farr , A.L. and Randall , R.J. J.Biol. Chem. 193: 265-275. (1951).
41. Telefoncu , A.:Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya. 1.Baskı , Sermet Matbaası , Kırklareli , Vize. Sayfa 56-61. (1988).
42. Gözü kara , E.M.: Biyokimya , Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara, sayfa 184-186. (1989).
43. Weber , K.and Osborn , M.J. , Biol , Chem , 244 ;4406-4412. (1962).
44. D'Ans -Lax : Taschenbuch für Chemiker und Physiker. 3. Aufl., Springer - Verlag, Berlin (1967).