



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEŞİTLİ SOLUCAN TÜRLERİNDE VÜCUT SIVISININ
ANTİBAKTERİYEL VE HEMOLİZ AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Elif Özlem ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Ayşın ÇOTUK**

Mayıs, 2005

İSTANBUL



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEŞİTLİ SOLUCAN TÜRLERİNDE VÜCUT SIVISININ
ANTİBAKTERİYEL VE HEMOLİZ AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Elif Özlem ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Ayşın ÇOTUK**

Mayıs, 2005

İSTANBUL

Bu çalışma 21/06/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Adile ÇEVİKBAŞ
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Meral BİRBİR
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Seyhan ALTUN
İstanbul Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM
İstanbul Üniversitesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından T-286/18062003 sayılı proje ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim sırasında mikrobiyolojiyi sevmemi sağlayan, tez konumu seçmemde yardımcı olan ve bilgilerini benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK'a,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM'e ,

Çalışmam sırasında desteğini ve ilgisini ihtiyacım olduğu her an gösteren Doç. Dr. Erdal Matur, Doç. Dr. Ömer ALTUN ve Yrd. Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK'e,

Çalışmam süresince ihtiyacım olduğu her an yardımlarını esirgemeyen ve desteğine daima güveneceğim meslektaşım Sevan GÜRÜN'e,

İhtiyaç duyduğum her konuda fikirlerine ve desteğine güvendiğim Araş. Gör. N. Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ'ye,

Tezim sırasında ellerinden gelen tüm desteği sağlayan Araş. Gör. Cenk KIĞ, Murat PEKMEZ, Araş. Gör. İrfan TÜRETGEN, Deniz SERTER, Sedat ÇAYUKLİ, Seval ÖZKAN, Serkan AYDİLEK, Araş. Gör. Selda GEZGİNCİ, Duygu GÖKSAY'a, Araş. Gör. Nihal DOĞRUÖZ, Halil BİLİN'e, Savaş ÜSTÜNOVA'ya ve ismini sayamadığım diğer tüm dostlarıma,

Verdiğim her kararda koşulsuz destekleri ile kendimi güçlü hissettiğim, hayatım boyunca ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan en değerli varlığım sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. TOPRAK SOLUCANLARININ İMMÜN SİSTEMİ	7
2.1.1. Hücresel İmmün Sistem	8
2.1.2. Humoral İmmün Sistem	9
3.1.2.1. Sitolitik Etki.....	9
3.1.2.2. Mitojenik Etki.....	10
3.1.2.3. Proteolitik Etki	10
3.1.2.4. Aglutinasyon Etkisi.....	10
3.1.2.5. Hemolitik Etki.....	10
2.1.2.6. Antibakteriyel Etki.....	11
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
3.1. DENEY HAYVANLARI	14
3.2. BAKTERİLER.....	14
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu	14
3.2.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	14
3.3. SÖLÖM SIVISININ ELDESİ	15
3.4. ANTİBAKTERİYEL ETKİNİN ARAŞTIRILMASI	15
3.4.1. Koloni Sayım Yöntemi.....	15
3.4.2. Disk Difüzyon Yöntemi	16
3.5. HEMOLİTİK ETKİNİN ARAŞTIRILMASI	17
3.5.1. %2'lik Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması	18
3.5.2. Seri Sulandırma Tekniği ile Hemolitik Aktivitenin Tespiti.....	18
3.5.3. Difüzyon Yöntemi.....	20
3.6. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER.....	21
3.6.1. Mac Conkey Agar Besiyeri	21
3.6.2. Eozin Metilen Mavisini (Eosin Methylene Blue, EMB) Agar Besiyeri.....	21
3.6.3. Nutrient Agar Besiyeri	22
3.6.4. Fizyolojik Tuzlu Su.....	22
3.6.5. Mc Farland'ın 0.5 Numaralı Tüp Çözeltisi.....	22
3.6.6. Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri.....	23
3.6.7. Beyin Kalp İnfüzyon Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	23

3.6.8. %1'lik Eritrosit Agar	23
4.BULGULAR.....	24
4.1. DENEY HAYVANLARI	24
4.2. BAKTERİLER.....	24
4.1. ANTİBAKTERİYEL ETKİNİN ARAŞTIRILMASI	25
4.1.1. Koloni Sayım Yöntemi.....	25
4.1.2. Disk Difüzyon Tekniği.....	40
4.2. SÖLÖM SIVISİNİN HEMOLİTİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ.....	40
4.2.1. Dilüsyon Yöntemi	40
4.2.2. Difüzyon yöntemi ile hemoliz miktarının belirlenmesi.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
KAYNAKÇA.....	50
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	: Koloni sayım yöntemi ile sölom sıvısının antibakteriyal etkisinin incelenmesi.....	16
Şekil 3.2	: Disk difüzyon tekniği kullanılarak sölom sıvısının antibakteriyal etkisinin belirlenmesi.....	17
Şekil 3.3	: %2'lik eritrosit süspansiyonunun hazırlanması.....	19
Şekil 3.4	: Seri sulandırma yöntemiyle sölom sıvısının hemolitik aktivitesinin tespiti.....	20
Şekil 4.1.a-1	: Biyoloji bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, ı: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12).....	28
Şekil 4.2.a-1	: Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, ı: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12).....	32
Şekil 4.3.a-1	: Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, ı: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12).....	36
Şekil 4.4	: Biyoloji bahçesinden toplanan solucan sölom sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi.....	42
Şekil 4.5	: Botanik bahçesinden toplanan solucan sölom sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi.....	42
Şekil 4.6	: Beykoz bölgesinden toplanan solucan sölom sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi.....	42
Şekil 4.7	: %1'lik tavşan eritrositli agar besiyerinde Beykoz bölgesi solucanları sölom sıvısının hemolitik etkisi (A: direkt , B:1/2, C:1/4'lük sölom sıvısı süspansiyonu).....	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 : Denede kullanılan bakteriler	24
Tablo 4.2 : Biyoloji bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi	26
Tablo 4.3 : Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi.....	26
Tablo 4.4 : Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi.....	27
Tablo 4.5 : Üç farklı bölgeden toplanan solucanların sölom sıvısının çeşitli memeli eritrositleri üzerine hemoliz etkisi.....	41

SEMBOL LİSTESİ

FTS	: fizyolojik tuzlu su
EMB	: eosin methylene blue
h/ml	: hücre / mililitre
V	: volt
μ l	:mikrolitre
mm	: milimetre
v/v	: eş hacimde
nm	: nanometre
g	: gram
ml	: mililitre
cm	: santimetre
kob	: koloni oluşturan bakteri
n	: tekrar sayısı

ÖZET

ÇEŞİTLİ SOLUCAN TÜRLERİNDE VÜCUT SIVISININ ANTİBAKTERİYEL VE HEMOLİZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Savunma mekanizmalarının yardımıyla, yaşadıkları ortamlarında her an patojen mikroorganizmaların istilasıyla karşı karşıya olan toprak solucanları, evrimin en eski dönemlerinden bu yana varlıklarını sürdürebilmiştir. İnsanoğlu için ölümcül olan bazı mikroorganizmalar toprak solucanları için yaşamlarını destekleyici özelliktedir.

Toprağı havalandırmada iş gördükleri bilinen bu hayvanlar Venezüella'da, özellikle üst solunum yolu enfeksiyonlarının iyileştirilmesinde doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Yaklaşık 50 yıldır devam eden çalışmalar, toprak solucanlarının humoral ve hücresele bağışıklık mekanizmalar geliştirdiğini göstermektedir.

Omurgasızların immün sistemlerinin anlaşılması, immünolojik evrimin anlaşılmasına da yardımcı olacaktır. Omurgasızlar içinde toprak solucanları, yetiştirme ve çalışma kolaylıkları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Araştırmacılar, genelde bu hayvanların belirli bir türü üzerinde çalışmış, farklı solucan türlerinin immün sistemlerini kıyaslamamışlardır. Bu nedenle çalışmamızda Biyoloji Bölümü bahçesi, Botanik bahçesi ve Beykoz bölgesinden toplanan toprak solucanlarının sölom sıvısının antibakteriyel ve hemolitik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda antibakteriyel etki, aynı toprak örneğinden izole edilen bakterilere karşı koloni sayım ve disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Koloni sayım yöntemi ile elde edilen sonuçlarda üç bölgenin solucanlarının antibakteriyel etki bakımından farklı olduğu gözlenmiştir. Bu deneyde sölom sıvısının bazı bakteri izolatları üzerinde üremeyi destekleyici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile sonuç alınmadığından sölom sıvısının iyi difüze olamadığı düşünülmektedir. Hemolitik etkinin araştırılması için seri sulandırma ve agara difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Seri sulandırma yönteminde toplanan solucanların sölom sıvısının koyun eritrositleri üzerine zayıf, tavşan ve insan eritrositleri üzerine ise güçlü hemolitik etki gösterdiği saptanmıştır. Agara difüzyon yönteminde ise sölom sıvısının disk difüzyon yöntemindeki gibi iyi difüze olamadığı saptanmıştır.

Çalışmanın devamında antibakteriyel ve hemolitik etki bakımından üç bölgeden toplanan solucan sölom sıvılarında görülen farklılıkların sebeplerinin tespiti önem kazanmaktadır. Bunun için solucan türlerinin ve deneyde kullanılan bakterilerin taksonomik olarak tespitine başlanmıştır. Sölom sıvılarının kimyasal analizlerinin yapılması da önemlidir. Böylece tespit edilen farklılığın değişik moleküllerin aktivitesinden mi yoksa aynı molekülün miktarından mı kaynaklandığı açığa çıkarılabilir. Bu sayede, farmakolojik açıdan kullanılabilir ürünlerin üretimi için yeni bir kaynak oluşturulabilir.

SUMMARY

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL AND HAEMOLYTIC ACTIVITY IN DIFFERENT EARTHWORMS' COELOMIC FLUID

Earthworms have been living with the aid of their defense system since early phases of evolution although they always face the invasion of pathogen microorganisms in their environments. When some microorganisms are fatal for human kind some bacteria provide supportive properties for earthworms' life.

These animals are known with their function in ventilation of soil and used especially to treat infections of upper respiratory tract as a natural drug in Venezuela. The studies which have been continued for about 50 years, showed that earthworms had been developed humoral and cellular immunity mechanisms.

Understanding the immun systems of invertebrates will help to understand immunoevolution. Investigators have been studied with a definite species of invertebrates, but they have not been comparing the immun systems of different species of earthworms in generally. For this reason, in our study it was aimed to investigate antibacterial and haemolytic activity of coelomic fluid of earthworms which were collected from Biology Department garden, botanical garden of Istanbul University and Beykoz.

In our study, antibacterial effects were examined using colony counting and disc diffusion methods against bacteria, which were isolated from the same soil samples. As a result of colony counting method, it was observed that three regions were different with regard to antibacterial effect of coelomic fluids. In this examination it was determined that coelomic fluids have stimulatory effect on the growth of the isolates of some bacteria. The reason of it was not be completed with disc diffusion method is thought that the coelomic fluid could not diffuse well. For the investigation of the haemolytic activity, serial dilution and diffusion to agar methods were used. In serial dilution method, it was determined that coelomic fluids of earthworms have weak haemolytic effect on sheep erythrocytes and strong effect on human and rabbit erythrocytes. In agar diffusion method, it was determined that the coelomic fluid could not diffuse well, similar to disc diffusion method.

The evidence of regional difference of the coelomic fluids of earthworms, collected from three different locations, has an importance for our prospective study to investigate the reasons. Therefore, a new study has been started to analyze the earthworms and bacterial isolates taxonomically. The molecular analysis of the coelomic fluids is also needed. Thus, a conclusion could be made about regional difference, whether the effect is due to different molecules or different amounts of same molecule. Here by, this could be a source for pharmacological.

1. GİRİŞ

Genelde omurgalı hayvanlar için varlığından söz edilen immün sistem aslında omurgasız hayvanlarda da bulunmaktadır. Temel işlevi kendine yabancı olanı tanıyıp zararsız hale getirmek olan bu sistemin basit yapıları canlılardan gelişmiş organizasyonlu canlılara kadar nasıl bir gelişim izlediğinin bilinmesi önemlidir. Evrim sırasında sadece fiziksel olarak değil, savunma mekanizmaları ile de güçlü olan canlılar hayatta kalabilmiştir. Bu da patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarının evrimin basamaklarında taşındığı ve daha da geliştirildiği şeklinde yorumlanabilir. Bu noktada omurgasız immünolojisi önem kazanmaktadır. Omurgasız immünolojisinde özellikle toprak solucanları ilgi çekici canlılardır. Bu hayvanların yüksek mikrobiyal kirliliğin hakim olduğu bir ortamda 700 milyon yıldır canlılar alemindeki yerlerini koruyabildikleri düşünülürse, gerçekten etkili bir immün sisteme sahip olduklarına karar vermek hiç de zor değildir (Evans ve diğ., 1973, Cho ve diğ., 1998, Cooper, 2002, Cooper ve Roch, 2003).

Solucanların immün sistemleri humoral ve hücreli bileşenlerden oluşmaktadır. Özellikle sitotoksik etkiye sahip sölom sıvısında yabancı maddeyi tanıyıp sölomositleri aktive eden moleküllerin varlığı önem taşımaktadır. Sölom sıvısı içindeki aktif bileşenler yabancı hücrelerin zar geçirgenliğinde, genetik materyalinde veya diğer metabolik aktivitelerinde bozulmalarına neden olarak etki göstermektedir. Bunun dışında humoral faktörler kendi başlarına yeterli olamadıkları durumlarda sölomositlerin fagositoz, kapsül veya nodül oluşturma gibi hücreli fonksiyonlarına yardım ederek iş görürler (Evans ve diğ., 1973, Çotuk ve Dales, 1984a, Çotuk ve Dales, 1984b, Kalaç, 1997, Kauschke ve diğ. 1997, Lange ve diğ., 1997, Beschin ve diğ., 1998, Eue ve diğ., 1998, Hanusova ve diğ., 1999b, Lange ve diğ., 1999, Bilej ve diğ., 2001, Engelmann ve diğ., 2004a, Engelmann ve diğ., 2004b, Field ve diğ., 2004).

Solucanların sölom sıvısındaki sitolitik faktörlerden bazıları, bakteriler üzerine bazıları da ökaryotik hücreler üzerine etkilidir. Sölom sıvısının omurgalı ve omurgasız gruplarına enjeksiyonundan sonra, omurgalılarda ölüme sebep olduğu, omurgasızlarda ise öldürücü etki göstermediği bulunmuştur. Araştırmacılar bunun sebebini, omurgalı ve

omurgasızların hücre zarlarındaki farklılığa bağlamaktadır (Lange ve diğ., 1997). Ayrıca sölom sıvısının memeli eritrositlerine karşı gösterdiği sitolitik etkinin (hemoliz) tespiti de önemlidir.

Araştırmaların çoğu *Eisenia fetida* üzerine yoğunlaşmakla birlikte *Lumbricus terrestris* ve *Dendrobaena venata* üzerinde de çalışmalar mevcuttur (Suzuki ve Cooper, 1995, Kalaç, 1997, Milochau ve diğ., 1997, Eue ve diğ., 1998, Furlong ve diğ., 2002, Koenig ve diğ., 2003). Bu çalışmalarda kullanılan hayvanlar ve yaşam bölgeleri birbirinden tamamiyle farklıdır. Solucanların farklı türlerinin sölom sıvısının aynı tip bakteriye veya başka yabancı hücre gruplarına nasıl bir etkide bulunacaklarının karşılaştırılması savunma mekanizmalarının anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bundan yola çıkarak çalışmamızda farklı bölgelerden toplanan solucan gruplarının sölom sıvılarının antibakteriyel ve hemolitik etkileri arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Biyoloji Bölümü bahçesinden, Botanik bahçesinden ve Beykoz bölgesinden solucanlar toplanmıştır. Bu hayvanların yaşam alanları oldukça farklılık göstermektedir. Biyoloji Bölümü bahçesindeki yaşam alanı genelde çürümüş yaprak ve topraktan oluşmaktadır. Botanik bahçesinde solucanların toplandığı saksı altları, bitki kökleri ve besince zengin bir ortamdır. Beykoz bölgesinde ise solucanlar sert, taşlık bir toprakta yaşamaktadır.

Çalışmada elektrik şoku ile elde edilen sölom sıvısının bakteri üremesi ve farklı memeli eritrositleri üzerine etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Antibakteriyel etkinin belirlenmesi için koloni sayım ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Koloni sayım yönteminde, sölom sıvısının, bakteri izolatlarının üremelerini nasıl etkilediğinin tespiti , disk difüzyon yönteminde ise sölom sıvısı emdirilmiş disklerin bakteri izolatları üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonlarının ölçümü ile antibakteriyel etkinin tespiti amaçlanmıştır.

Hemoliz aktivitesinin tayini için solucanların sölom sıvısı ile seri sulandırma ve difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Seri sulandırma deneyinde, sölom sıvısının memeli eritrositleri üzerine hemoliz etkisinin spektrofotometrik olarak tespiti amaçlanmıştır. Difüzyon yönteminde ise eritrosit katılmış agar besiyerinde sölom sıvısının oluşturduğu hemolizin, oluşan şeffaf zonlarının ölçülmesi ile tespiti amaçlanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda farklı bölgelerden toplanan solucanların sölom sıvısının antibakteriyel ve hemolitik etkilerinde farkların değerlendirilmesi ve bu farklılıkların sebebinin anlaşılması önem taşımaktadır. Belirtilen farkların oluşumu türler arası farklılıklar kadar yaşam ortamlarına da bağlıdır. Çalışmamızın devamında bu sebeplerin kesin olarak anlaşılması için solucan türlerinin ve kullanılan bakteri izolatlarının sistematik adlarının belirlenmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

Omurgasız hayvanlar içinde yer alan toprak solucanları Annelida subfilumundadır (Tomlin, 2004). Annelid'ler, Polychaeta, Oligochaeta ve Hirunidea olarak adlandırılan üç ordodan oluşur. Polychaeta ilkel deniz kurtlarını Hirunidea ise sülükleri içine alır. Karasal kurtları içeren Oligochaeta sınıfının en bilinen örneği toprak solucanıdır (Kalaç, 1997).

Solucanlar, renkli, setalı, ince kütikül bir dış dokuya sahip, yumuşak vücutlu hayvanlardır. Solucanlar dıştan ve içten segmentli iskeletsiz bir vücuda sahiptirler. İç içe tüp biçiminde bir yapıları vardır. İki tüp arasında uzanan sinir sistemine; su dengesini sağlayan bir boşaltım sistemine; ağızdan anüse uzanan uzun bir sindirim kanalına sahiptirler. İki tüp arasındaki boşluk sölom sıvısıyla doludur (Tomlin, 2004). Sinir şeridi, vücuttaki farklı organlarla iletişimi ve kaslarda kasılma-gevşeme hareketini kontrol eder. Ayrıca kesilen vücut parçalarını yenileyebilme yeteneği de bu hayvanların hayatta kalma başarılarını arttıran önemli bir özelliktir (Tomlin, 2004). Vücut yüzeyi ile solunum yapan solucanlar, solunum pigmenti olarak hemoglobin içerirler (Vinogradov ve diğ., 1986, Fushitani, 1988, Zhu ve diğ., 1996).

Toprak solucanları fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemlerde temel rol oynarlar (Canellas ve diğ., 2002, Borges ve diğ., 2003, Homa ve diğ., 2003, Scullion ve diğ., 2003, Shipitalo ve diğ., 2004). Yapılan çalışmalarda toprak solucanlarının yaşadıkları alandaki hayvan populasyonunun yaklaşık %60'ını oluşturduğu belirlenmiştir (Fischer ve diğ., 2003). Solucanlar toprağı havalandırarak bitkilerin gelişimi için daha ideal bir ortam sağlamanın yanı sıra, toprağın karbon depolarının kullanımına da yardımcı olurlar (Fisk ve diğ., 2004).

Toprak solucanlarına duyulan ilginin bir başka nedeni de çevresel kirleticilere karşı çoğu organizmadan daha dirençli olmalarıdır. Solucanların atık elementleri biriktirmelerine rağmen hayatta kalabildikleri gözlenmiştir (Sauve ve Fournier, 2003). Diğer taraftan organoklorinlerin ya da metal kalıntılarının bulunduğu ortamlardaki yetişkin solucanlarda immün sistemin baskılandığı da belirtilmektedir. Bu nedenle solucanlar çevresel kirliliğin incelenmesinde ve toksikolojik deneylerde model hayvan olarak kullanılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada *Eisenia fetida*'nın çevresel kirlenmede biyolojik indikatör olarak iş görebileceği belirtilmektedir (Zachman ve Molina, 1993). Ağır metale maruz kalma, solucanların fagositoz ve kapsül oluşturma gibi önemli savunma işlemlerinde rol oynayan sölomositlerinin canlılığı ve aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bunun tespiti için Wieczorek-Olchawa ve diğ. (2003) göreceli olarak farklı oranlarda kirlenmiş topraklarda tuttukları solucanların dokularında ağır metal konsantrasyonlarını incelemişlerdir. Çalışmada, ağır metal ile kirlenmiş toprakta tutulan hayvanların sayılarında ve sölomositlerinde belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Endüstrileşme ve şehirleşmeyle ilgili ilerlemeler sonucu kadmiyum, kurşun, çinko ve bakır gibi ağır metallerle çevrenin kirlenmesi artmaktadır. Siekierska (2003) kadmiyum, bitki ve hayvanlarca kolaylıkla emilip vücutlarında tutulduğu için özellikle tehlikeli olduğunu vurgulamıştır. Kadmiyumla kirlenmiş topraklarda yaşayan solucanlar, beslenme sırasında bu ağır metali vücut dokularında depolarlar (Siekierska, 2003, Yu ve diğ., 2004).

Toprak solucanları, patojen mikroorganizmalar bakımından zengin olan çevrelerde yaşarlar. Bu hayvanlar vücutlarında meydana gelen yaralanmalar ve beslenmeleri sırasında yuttukları toprak nedeniyle her an mikroorganizmaların istilasıyla karşı karşıyadırlar. Ancak mikroorganizmalar bu hayvanlar için bazen yarar sağlamaktadır. Solucanlar besinlerini bitki, protozoon, rotifer, nematod, bakteri, mantar ve diğer hayvanların artıkları gibi geniş çeşitlilikteki organik materyallerden sağlayabilir (Neilson ve Boag, 2003). Sindirim işlemi sonunda ortamdaki bitki artıklarıyla birlikte yutulan mikroorganizmaların bir kısmı vücuttan atılırken bir kısmı da sindirim kanalı içine yerleşerek burada yaşayabilmekte ve çoğalmaktadırlar. Özellikle son yıllarda

yapılan çalışmalarda, solucanların pek çok bakteriyi bağırsaklarında yaşatarak sindirim sırasında kullandıkları anlaşılmıştır (Zachman ve Molina, 1993, Dubilier ve diğ., 1995, Matthies ve diğ., 1999, Furlong ve diğ., 2002, Horn ve diğ., 2003, Neilson ve Boag, 2003). Böylece solucanlar mikroorganizmalarca zengin çevrelerde yaklaşık 700 milyon yıldır yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Cho ve diğ., 1998).

Toprak solucanlarının bağırsağında görülen mikroorganizmalar, solucanın beslenme şekline ve yaşadığı ortama göre değişmektedir. Solucanların bağırsağında yerleşmiş bakteriler besinlerin yıkılmasında iş görürler. Selüloz içerikli maddelerin sindirimi için selülaz enzimi salan bakteriler solucanların normal bağırsak florasını oluşturur. Araştırmacılar, solucan bağırsağında yaşadığı toprağa kıyasla çok daha yüksek oranlarda azot ve karbon bulunmasının sebebinin hayvanın bağırsağında bulunan bakteriler olduğunu göstermişlerdir (Zachman ve Molina, 1993, Matthies ve diğ., 1999, Horn ve diğ., 2003, Neilson ve Boag, 2003).

Toprak solucanlarının vücutlarında bulunan bakteriler genellikle klasik bakteriyolojik yöntemler ile araştırılmıştır. Ancak son yıllarda moleküler teknikler de tercih edilmektedir (Dubilier ve diğ., 1995, Furlong ve diğ., 2002, Singleton ve diğ., 2003). Bu sayede toprak solucanında bulunduğu halde kültüre edilemeyen bakteriler de tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda solucanların sadece vücut yüzeylerinin değil sindirim sistemlerinin, söm boşluklarının ve hatta yumurtalarının içinde bile mikroorganizmaların bulunduğu tespit edilmiştir (Zachman ve Molina, 1993, Daane ve Haggblom, 1999, Matthies ve diğ., 1999). Furlong ve diğ. (2002) *Lumbricus rubellus*'da *Proteobacteria*, *Acidobacter*, *Cytophagales*, *Chloroflexi*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Firmicures* ve *Actinobacter* cinsi bakterilere rastlamışlardır. Solucanların aynı ortamı paylaştıkları mikroorganizmalar ile gösterdikleri simbiyotik ve sinerjistik ilişkisinin belirlenmesi, bağışıklık sistemi ile ilgili araştırmalarda önem taşımaktadır (Zachman ve Molina, 1993).

Zachman ve Molina (1993) tarafından, toprak solucanı *E. fetida*'nın yumurtaları içerisinde gelişen embriyolarla *Bradyrhizobium japonicum* ve *Escherichia coli* bakterilerinin bir arada bulunduğunu tespit etmişlerdir. Daane ve Haggblom (1999), *E. fetida* yumurtalarında *Alcaligenes eutrophus* türü bakterilerin simbiyotik olarak

yaşayabildiğini göstermişlerdir. Matthies ve diğ. (1999), toprak solucanlarının oksijensiz olan bağırsak ortamında yaşayan bakterilerin N₂O açığa çıkışında önemli bir role sahip olduğunu belirlemiştir.

Toprak solucanlarında sölom boşluğu, dorsal ve nefridyal porlar aracılığıyla dış ortamla ilişki içindedir. Bu ilişki nedeniyle de sölom sıvısı sıklıkla bakteriler, mantar sporları, protozoon ve nematodları içerebilir. Bu mikroorganizmalardan bazıları solucanlar için patojen olabilmektedir. Evolüsyon sırasında toprak solucanları, bu patojenlere karşı savunma stratejileri geliştirmişlerdir (Cho ve diğ., 1998, Liu ve diğ., 2004).

Toprak solucanlarının savunma stratejileri bir çok araştırmacı tarafından farklı şekilde ele alınmıştır. Bazı araştırmacılara göre solucanların immün sistemleri, doğal bağışık cevabı sergileyen adaptif immüniteden yoksun bir sistemdir (Lin ve diğ., 2001, Schindler ve Wrigley, 2004). Toprak solucanları ile yapılan bazı çalışmalarda ise bu hayvanların yabancı materyali tanıyıp spesifik cevap oluşturdukları belirtilmiştir (Engelmann ve diğ., 2005). Bilej ve diğ. (1990) çalışmalarında, solucanların doğal ve kazanılmış bağışıklık şeklindeki immün sistemleri sayesinde kendilerini mikroorganizmalardan ve diğer yabancı maddelerden koruyabildikleri belirtilmiştir. Doğal bağışıklık sistemi, enfeksiyon ajanlarının büyük bir bölümüne karşı özgün olmayan savunma biçimidir. Bu sistem, mekanik engel, yüzey salgıları, dokuların ve vücut sıvılarının sitotoksik bileşenleri ile doğal flora elemanlarını içerir. Çoğu hastalık yapıcı etkenin, bir organizmada yerleşip zarar vermesinin önlenmesi, organizmanın doğal bağışıklık mekanizmasına ait engellerle sağlanabilir. Kazanılmış bağışıklık ise organizmanın kendisi için hastalık yapıcı mikroorganizma ya da maddelerle karşılaştıktan sonra ortaya çıkan ve bunlara karşı özgün olan bir yanıt şeklidir (Kalaç, 1997).

2.1. TOPRAK SOLUCANLARININ İMMÜN SİSTEMİ

Toprak solucanlarının immün sistemleri, hücresel ve humoral mekanizmalar ile gerçekleşir. Solucan immünitesi, sölomosit olarak adlandırılan hücreler ve bu hücrelerce salınan maddelerin birlikte çalıştığı kompleks bir savunma sistemidir (Roch ve Cooper, 1991).

2.1.1. Hücresel İmmün Sistem

Toprak solucanlarının sölom boşluğunda bulunan ve savunmadan sorumlu hücreler sölomositlerdir. İnsan beyaz kan hücreleri ile benzer şekilde çalışan bu hücreler gerektiğinde solucanın deri yüzeyindeki porlarla dışarı salınabilirler.

Bazı araştırmacılar toprak solucanlarının sölomositlerini, fonksiyonları ve morfolojilerine göre Hiyalin Amöbositler, Granüler Amöbositler ve Eleositler olarak sınıflandırmıştır (Adamowicz ve Wojtaszek, 2001, Engelmann ve diğ., 2004a). Bunlardan farklı olarak Schindler ve Wrigley (2004), solucan sölomositlerini çeşitli boyama teknikleri ile incelemişler ve hücreleri (i) küçük granülsüz, lenfosit benzeri hücreler, (ii) büyük granülsüz, lenfosit benzeri hücreler, (iii) küçük granüllü hücreler, ve (iv) büyük granüllü hücreler olmak üzere dört gruba ayırmışlardır.

Eleositler, genellikle tüm toprak solucanlarında bulunur. Büyük hücreler olup vesiküller ve granüller içeren bu hücreler lipit, lipit benzeri moleküller ve proteinlerden oluşurlar. Eleositler, bağırsaktaki kloragosit dokusundan kökenlenirler. Eleositlerin başlıca görevleri kahverengi içerikli hücre oluşturma, kapsül oluşturma ve bakterisidal maddeleri sentezlemektir (Peeters-Joris, 2000, Adamowicz ve Wojtaszek, 2001, Field ve diğ., 2004). Amöbosit hücreler granülosit ve hiyalin olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Besinlerin taşınması ve saklanmasında, sölom sıvısının koagülasyonu ile yaraların iyileşmesinde, fagositozda, kapsül ve nodül oluşumunda iş gören immün sistem hücreleridir (Adamowicz ve Wojtaszek, 2001).

Sölomositlerin en temel işlevi olarak görülen fagositoz, tanıma, içeri alma ve öldürme şeklinde sıralanan 3 aşamada gerçekleşir. Kemotaksis ile başlayan tanıma işlemi sölomositin yabancı maddeye yapışması ile sonuçlanır. Yabancı madde, çökme (invaginasyon) ya da psödopod ile içeri alındıktan sonra lizozomal enzimler ile sindirilir.

Sölomositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz, çok sayıda bakteri ve diğer küçük yabancı partiküller ile mücadele etmek için yeterli olmamaktadır. Sölom boşluğu, mikroorganizmalar ile işgal edildiğinde mikroorganizmaların etrafında “nodül” olarak adlandırılan hücre kümeleri oluşturulur ve bu sayede mikroorganizma kümeleri yok

edilir. Nodül içindeki mikroorganizmalar oksijen ve besin eksikliğinin getirdiği stres sonucu veya nodülü oluşturan sölomositlerde bulunan lizozomal enzimlerin etkisi ile öldürülürler (Kalaç, 1997).

Omurgasız kan hücreleri, fagositoz, nodül ve kapsül oluşturmanın yanı sıra yabancı hücre ve dokulara karşı doğrudan sitotoksik etki yapma yeteneğindedir. Bu hücrelerin öldürme şekli, memeli immün sistemindeki “Natural Killing (NK)” reaksiyonu ile benzerlik gösterir (Kalaç, 1997). Koenig ve diğ. (2003) solucanların kendilerini patojenlere karşı korumalarının yanı sıra tahrip olmuş dokularını tanıyabildiklerini belirtmişlerdir. Toprak solucanlarında graft reaksiyonları ve antijen tanımda hafıza gözlenir. Bu reaksiyonlar, hücresele immün mekanizmalar olarak tanımlanmıştır. (Engelmann ve diğ., 2004a, Engelmann ve diğ., 2004b, Field ve diğ., 2004).

2.1.2. Humoral İmmün Sistem

Omurgasız hayvanların savunmasının diğere önemli kısmı ise humoral yanıttır. Omurgasız immün sisteminin humoral mekanizmasında sitolitik, mitojenik, proteolitik, aglutinant, hemolitik ve antibakteriyel etkiye sahip 40’den fazla madde gösterilmiştir. Ayrıca antikor ve kompleman benzeri faktörler de bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla sölomositlerin uyarılması sonucu humoral maddelerin miktarının arttığı gösterilmiştir. (Evans ve diğ., 1973, Çotuk ve Dales, 1984a, Çotuk ve Dales, 1984b, Kalaç, 1997, Kauschke ve diğ. 1997, Lange ve diğ., 1997, Beschin ve diğ., 1998, Eue ve diğ., 1998, Hanusova ve diğ., 1999b, Lange ve diğ., 1999, Bilej ve diğ., 2001, Engelmann ve diğ., 2004a).

3.1.2.1. Sitolitik Etki

Yapılan çalışmalarda *E. fetida* türü toprak solucanı sölom sıvısında, 42 kDa molekül ağırlığında “Sölomik Sitolitik Faktör (SSF)” olarak adlandırılan bir protein bulunmuştur (Köhlerova ve diğ., 2004). Bu proteinin sölom sıvısında sitolitik ve hemolitik aktivitelerden ve opsonizasyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Beschin ve diğ., 1998, Hanusova ve diğ., 1999b, Bilej ve diğ., 2001). Font ve diğ. (2002) SSF’nin hiçbir gen homolojisi olmamasına karşın memeli sitokini olan “Tümör Nekroz Faktör (TNF)” ile fonksiyonel analogi gösterdiğini belirlemişlerdir. Hem SSF hem de TNF lektin benzeri aktiviteye sahiptirler. Araştırmacılar, SSF’nin bakteri ve mayaların hücre duvarını tanıyıp yapışmasında iş görerek profenol oksidaz reaksiyonuna yardımcı olduğunu

belirtmektedir. Toprak solucanlarının sölom sıvısının sitolitik bileşenleri, sadece memeli eritrositleri üzerine değil tümör hücreleri üzerine de etkilidir (Suzuki ve Cooper, 1995, Cossariza ve diğ., 1996, Lange ve diğ., 1999).

3.1.2.2. Mitojenik Etki:

Omurgasızlarda, sitokin benzeri moleküllerin özellikleri ve gelişiminin araştırılması daha kompleks olan omurgalı immünolojisinin anlaşılmasını ve bu sistemin gelişiminin ortaya çıkarılmasını amaçlamaktadır. Hanusova ve diğ. (1999a) *Eisenia fetida fetida* alt türü solucanlarda bulunan “Sölomik Mitojenik Faktör”ün, fare lenfositlerinin proliferasyonunu stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Bu faktörün omurgalılarda olduğu gibi, solucanların patojenlerle uyarılması anında immün sistem hücrelerinin hızla üremelerini teşvik ettiğini bulmuşlardır. Grdisa ve diğ. (2001), *E. fetida* türünde glikolipoprotein yapıda antioksidatif etkiye sahip bir maddenin olduğunu bildirmişlerdir.

3.1.2.3. Proteolitik Etki

Kauschke ve diğ. (1997), *Lumbricus terrestris* cinsi toprak solucanının sölom sıvısında proteolitik aktivitenin varlığını saptamışlardır. Araştırmacılar, yabancı bir materyalin (kırmızı kan hücresi) sölom içine enjeksiyonu ile sölom sıvısının proteolitik aktivitesinin arttığını göstermişlerdir.

3.1.2.4. Aglutinasyon Etkisi

Aglütininer omurgasızların humoral bağışıklığında önemli bir yer tutmaktadır. Omurgasız aglütinineri vücuda alınan çeşitli partikülleri aglütine etme yeteneğindedirler. *L. terrestris* hemaglütininerinin 100 °C’de 30 dakika ısıtıldığında etkisinin azalmazken, *E. fetida* aglütininerinin ise etkisinin azaldığının saptanması, farklı türlerde farklı aglütinant moleküllerin bulunduğunu düşündürür (Kalaç, 1997).

3.1.2.5. Hemolitik Etki

Liziner, yabancı maddelere karşı litik özelliklere sahip biyolojik açıdan aktif maddeler olarak bilinirler. Bu aktivite, deneysel olarak omurgalı eritrositlerinin lizisi sonucunda oluşan hemoliz ile belirlenmektedir. Omurgasızlardaki hemolitik özellikler protein yapılı moleküllere bağlıdır (Kalaç, 1997). Yapılan çalışmalarda *E. fetida* türü toprak solucanının sölom sıvısının sıcaklığa duyarlı bir hemolitik faktöre sahip olduğu bildirilmiştir (Çotuk ve Dales, 1984a, Engelmann ve diğ., 2004a). Hemolitik ve aglütine edici proteinler, *E. fetida*’nın *E. f. fetida* ve *E. f. andrei* alt türleri içeren değişik solucan popülasyonlarında tanımlanmıştır.

E. fetida sölom sıvısından veya vücut homojenatından protein saflaştırma yöntemleri ile hemolizinler izole edilmiştir. Hemen hemen tüm araştırmalar, *E. fetida*'da kırmızı kan hücrelerini lizis eden proteinlerin varlığını saptamışlardır. Bu proteinlerin 40-45 kDa, 41 ve 42 kDa ya da 40, 43 ve 46 kDa moleköl ağırlığına sahip oldukları saptanmıştır. Bu moleküllerin hemoliz etkisinin yanı sıra aglütinasyondan da sorumlu oldukları bildirilmiştir (Milochau ve diğ., 1997, Eue ve diğ., 1998, Koenig ve diğ., 2003).

Milochau ve diğ. (1997) *E. fetida andrei*'den izole ettikleri iki hemolitik proteinin 56 °C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil iken 56 °C'de presipite olduğunu belirtmişlerdir. Koenig ve diğ. (2003) moleköl ağırlıkları 40-70 kDa olan fetidin, lizin, Eisenia-fetida-andrei-faktör (EFAF), H₁, H₂, H₃ ve eisenyapor isimli proteinlerin varlığından bahsetmektedirler. Başka bir çalışmada *D. venata* solucanlarının sölom sıvısı kurbağa, tavuk, domuz, at, dana, koyun, tavşan ile insan gibi omurgalı eritrositlerine karşı hemolitik aktivitesi denenmiş ve koyun eritrositlerine karşı zayıf bir aglütinasyon ve litik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Kalaç ve Çotuk, 1992, Kalaç, 1997).

Lange ve diğ. (1999) tarafından *E. fetida* toprak solucanı sölom sıvısında hemoliz ve sitotoksik etkili eisenyapor adlı bir protein saptanmıştır. Bu araştırmacılar eisenyaporun fare, sıçan, tavşan, kedi, insan ve koyun eritrositleri üzerinde hemoliz etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Valembois ve diğ. (1982a) *E. f. andrei* toprak solucanı sölom sıvısının hemolitik aktivitesinin yanı sıra antibakteriyel etkinin de varlığını göstermişlerdir. Bir çok araştırmacı solucanların doku ve embriyolarını bakteri istilasından koruyan yapıların sölom sıvısı ve kokon albumeni olduğunu belirtmişlerdir (Suzuki ve Cooper, 1995, Cossariza ve diğ., 1996, Lange ve diğ., 1999).

2.1.2.6. Antibakteriyel Etki:

Toprak solucanlarındaki antibakteriyel maddelerin varlığının kanıtlanmasına dayalı pek çok çalışma yapılmaktadır. *E. f. andrei* sölom sıvısının, toprak solucanı patojeni olan *A. hydrophila* ve *Bacillus megaterium* bakterilerine karşı etkili bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Valembois ve diğ., 1982a). Milochau ve diğ. (1997) toprak solucanının sölom sıvısından fetidin olarak adlandırılan, 40 ve 45 kDa moleköl

ağırlığındaki iki ayrı proteini diyaliz yöntemiyle saflaştırmışlar ve bu fetidinlerin antibakteriyel etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Bu aktivite, iki solucan patojeni *A. hydrophila* ve *B. megaterium* bakterilerine karşı detaylı olarak gösterilmiştir. *E. fetida* üzerinde yapılan bu çalışmada Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkinin lizozime bağlı olduğu söylenmektedir. Pan ve diğ. (2003) *E. f. andrei* sölom sıvısının *B. megaterium* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Yapılan çalışmaların çoğunda varlığı kanıtlanan antibakteriyel peptitler, immün sistemin spesifik olmayan konak savunma mekanizmasında önemli bir yere sahiptir. Bu peptitler hücre zarında multimerik por oluşumuyla veya hücre içine girmelerini takiben DNA ya da RNA etkileşimiyle antibakteriyel etki gösterirler (Çotuk ve Dales, 1984a, 1984b, Cho ve diğ., 1998, Tasiemski ve diğ., 2004, Engelmann ve diğ., 2004a). Liu ve diğ. (2004) yaptıkları bir çalışmada *E. fetida* toprak solucanı sölom sıvısından yeni bir antibakteriyel peptit saflaştırmışlardır.

Solucanlarda dış salgı olan mukus da antimikrobiyal faktörler içerir, bu da yüzeydeki dokularda bulunan veya zedelenen dokulardan vücuda giren bakterileri tutar ve parçalar. Genellikle Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan N-asetil glukozamin ile N-asetil muramik asit arasındaki 1,4-glikozid bağını kopararak etki eder. Mukus içerisinde bulunan lizozim, düşük pH ve yüksek sıcaklığa dayanıklı, 15 kDa ağırlığında ve genellikle *Micrococcus lysodeikticus*'u liziz etmesiyle tanımlanır (Çotuk ve Dales, 1984b, Kalaç, 1997, Köhlerova ve diğ., 2004).

Milochau ve diğ. (1997) *E. f. andrei* toprak solucanı sölom sıvısının antibakteriyel, hemolitik ve hemaglutinin aktivitesi gösterdiğini ve bu aktivitelerin temel olarak fetidin olarak adlandırılan 40 ve 45 kDa molekül ağırlığındaki iki protein tarafından düzenlendiğini belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Eisenia toprak solucanına patojen bakteri türlerinin yüzey antijenlerinin koyun eritrositleri yüzey antijenleri ile benzer olduğunu göstermiştir (Valembos ve diğ., 1982a). Bu antijenik benzerlik, sölom sıvısının antibakteriyel özelliğinin yanısıra hemolitik aktivitesinin de incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Köhlerova ve diğ. (2004) sölom sıvısında bulunan hemolitik bir faktörün aynı zamanda antibakteriyel etkiye de sahip olduğunu bildirmişlerdir. *E. foetida*'nın sölom sıvısında bulunan hemolitik aktivite, antibakteriyel aktivite ile ilişkilidir. Toprak solucanının sölom sıvısında patojenik toprak bakterilerine karşı antibakteriyel ve aglütinasyon etkileri olan bir çok hemolitik faktör tanımlanmıştır. Buna karşın bazı solucanlarda, sölom sıvısının antibakteriyel aktivitesinin bulunmadığı gösterilmiştir (Kalaç, 1991).

Toprak solucanlarının doğal immün sisteminin incelenmesi için çok sayıda geçerli neden vardır. İlk olarak, immüntenin evrimsel gelişimi ile ilgili bilgiyi bu hayvanlardan elde etmek mümkündür. İkinci olarak, bu canlılar antibakteriyel bileşenlere sahip olmalarına rağmen hastalıkların taşıyıcıları ve bulaştırıcılarıdır. Bazı toplumlarda ilaç olarak veya beslenme amaçlı kullanılan bu organizmaların bakterilerle olan ilişkilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Toprak solucanları ile yapılan antibakteriyel etki çalışmalarının özünde, bu hayvanlarda bulunan aktif maddelerin insanlar için bakteri kaynaklı hastalıklarda iyileştirici olarak kullanılması yatmaktadır. Bu nedenle antibakteriyel etkiye sahip olduğu düşünülen sölom sıvısının sitotoksik ve hemolitik etkisinin incelenmesi zorunludur. Toprak solucanlarının, yaşadıkları ortamdaki mikroorganizmalardan kendilerini korumak için geliştirdikleri mekanizmalar, sadece omurgasız immünolojisinin değil aynı zamanda omurgalılarda görülen bir çok immünolojik reaksiyonun da benzerleridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda genellikle laboratuvar kültürü olarak belirli bir türü yetiştirilen toprak solucanları kullanılmıştır. Doğada bu organizmaların çok fazla çeşitlilik gösterdiği göz önüne alınırsa bu organizmaların benzer antijenik yapılarla gösterebilecekleri immünolojik reaksiyonlar da farklı olabilir. Bu nedenle çalışmamızda farklı bölgelerden toplanan toprak solucanlarının antibakteriyel ve hemolitik açıdan belirgin bir farklılığa sahip olup olmadığının belirlenmesini amaçlamaktayız.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Deneyde kullanılan solucanlar İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü bahçesi, Botanik bahçesi ve Beykoz bölgesinden toplanmıştır. Toplanan hayvanlar laboratuvarında ışık geçirmeyen plastik kaplarda, buğday talaşı ile beslenerek nemli toprak içinde tutulmuştur. Bir deney grubu 20 bireyden oluşmaktadır.

3.2. BAKTERİLER

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Sölmom sıvısının antibakteriyel etkisini araştırdığımız bakteriler Biyoloji Bölümü bahçesindeki topraktan izole edilmiştir. %0.85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde 1:10 oranında sulandırılan topraktan Mac Conkey Agar, Eosin Methylene Blue (EMB) Agar ve Nutrient Agar besiyerlerine 0.1 mililitre ekim yapılmış ve Petri kapları 37 °C'lik etüvde 24 saat bekletilmiştir. Besiyeri üzerinde oluşan ve morfolojik bakımdan farklı kolonilerden Gram boyama yapılmıştır. Saflığından emin olunan kolonilerden eğri Nutrient Agar besiyerine ekim yapılarak saf kültür elde edilmiştir ve bu kültürler saklamak amacıyla +4 °C'de tutulmuştur. Deneyleerde 24 saatlik taze kültür kullanılmıştır.

3.2.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Deneyde 24 saatlik bakteri kültürü steril FTS ile Mc Farland'ın 0.5 numaralı standardına göre turbidimetrik olarak 10^8 bakteri/ml (b/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır. Koloni sayım yöntemi ile antibakteriyel etkinin araştırılacağı deney için bu süspansiyondan 0.1 ml alınarak 9.9 ml Beyin Kalp İnfüzyon sıvı besiyerine karıştırılmış ve 10^7 b/ml bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Difüzyon yöntemi için ise 10^8 b/ml bakteri süspansiyonu kullanılmıştır.

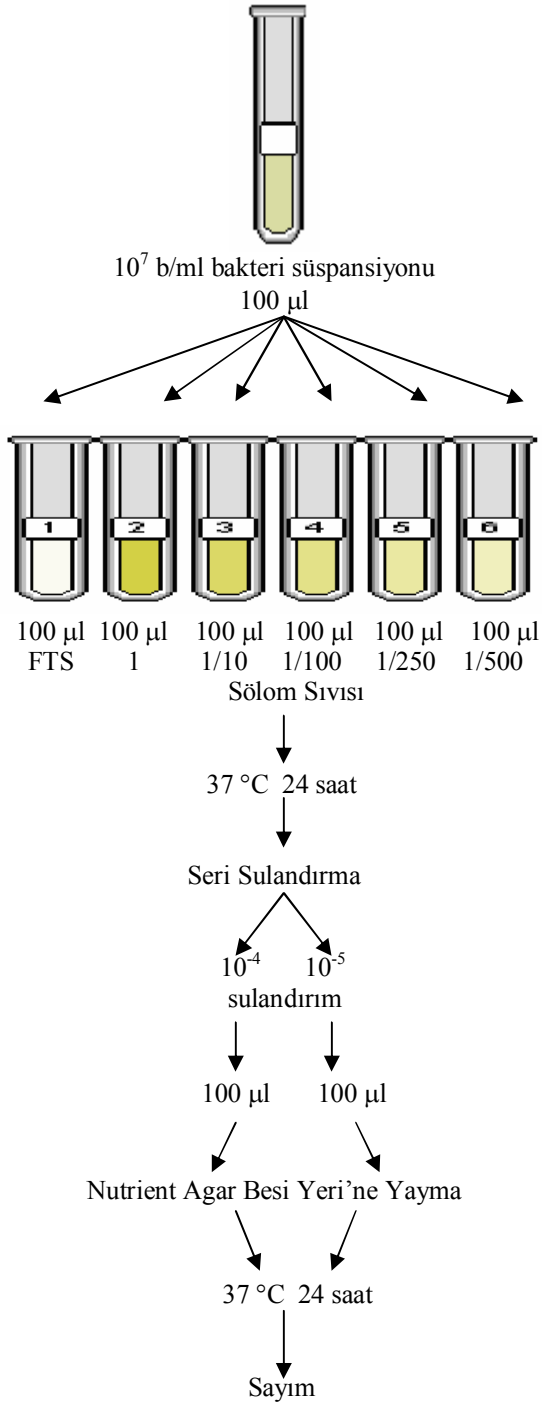
3.3. SÖLÖM SIVISİNİN ELDESİ

Üç bölgeden toplanan toprak solucanları önce çeşme suyuyla sonra %0.85'lik FTS ile üzerlerindeki toprak tamamen uzaklaşana kadar yıkanmıştır. Hayvanlar, filtre kağıdı ile tek tek kurulandıktan sonra 6V elektrik şoku ile uyarılmıştır. Uyarılma sonucu dış ortama salınan sölom sıvısı toplanıp 10.000 devir/dakika hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki hücretsiz süpernatant tabakası toplanıp 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Roch ve Cooper, 1991, Koenig ve diğ. 2003).

3.4. ANTİBAKTERİYEL ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

3.4.1. Koloni Sayım Yöntemi:

Bu yöntem için 96 kuyucuklu U tipi steril mikroplate kullanılmıştır (Çotuk ve Dales, 1984a). Sölom sıvısının %0.85'lik FTS içinde direkt dozu (1) ile 1/10, 1/100, 1/250 ve 1/500 sulandırılmaları kullanılmıştır. 100 µl bakteri süspansiyonu ile farklı oranlarda sulandırılmış sölom sıvısının 100 µl'si karıştırılıp 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuktaki karışım seri olarak 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılıp Nutrient Agar besiyerine 0.1'er ml ekim yapılmıştır. Kontrol olarak her bir deney tekrarında 100 µl steril FTS ile 100 µl bakteri süspansiyonu diğer kuyucuklardaki gibi karıştırılmış ve bir gecelik inkübasyonun ardından 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılıp Nutrient Agar besiyerine 0.1'er ml ekim yapılmıştır. Yayma yöntemi ile ekilmiş besiyerleri 37 °C'de 24 saat tutulmuştur. Bekletme sonrası besiyeri üzerindeki koloniler sayılmış ve bulunan sayı sulandırma faktörü ile çarpılarak ml'deki bakteri sayısı hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Kontrolle kıyaslandığında canlı bakteri sayısında %50 ve daha fazla oranlardaki azalma gözlenen konsantrasyonlar antibakteriyel etki bakımından pozitif sayılmıştır. Deney 4 tekrarlı olarak yapılmıştır (Evans ve diğ., 1973, Cho ve diğ., 1998).

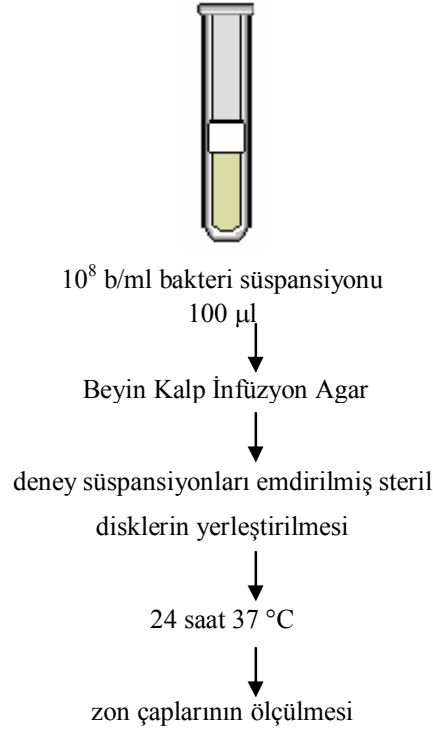


Şekil 3.1: Koloni sayım yöntemi ile söloom sıvısının antibakteriyal etkisinin incelenmesi

3.4.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Deneyde 3.2.2’de anlatılan şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 0.1 ml alınarak Beyin Kalp İnfüzyon Agar besiyerine ekim yapılmıştır. Direkt (1), 1/10, 1/100, 1/250 ve 1/500 söloom sıvısı süspansiyonları 20 µl hacimli, 6 mm çaplı steril disklerle emdirilmiştir. Tüm deneylerde negatif kontrol olarak 20 µl FTS emdirilmiş 6 mm çaplı

steril diskler kullanılmıştır (Kalaç, 1997). Söloom sıvısı emdirilmiş diskler, bakteri yayılmış besiyerlerine eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Disklerin besiyerine yapışması için yarım saat oda ısısında beklendikten sonra, Petriler 37 °C’de 24 saat bekletilmiştir (Şekil 3.2). Bu süre sonunda deney Petri kapları incelenerek disk çevrelerinde üreme görülmeyen bölgelerin çapı ölçülmüştür. Ölçülen inhibisyon zon çapları, disk dahil üreme olmayan alanı kapsamaktadır (Kato, 1995).



Şekil 3.2: Disk difüzyon tekniği kullanılarak söloom sıvısının antibakteriyal etkisinin belirlenmesi

3.5. HEMOLİTİK ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

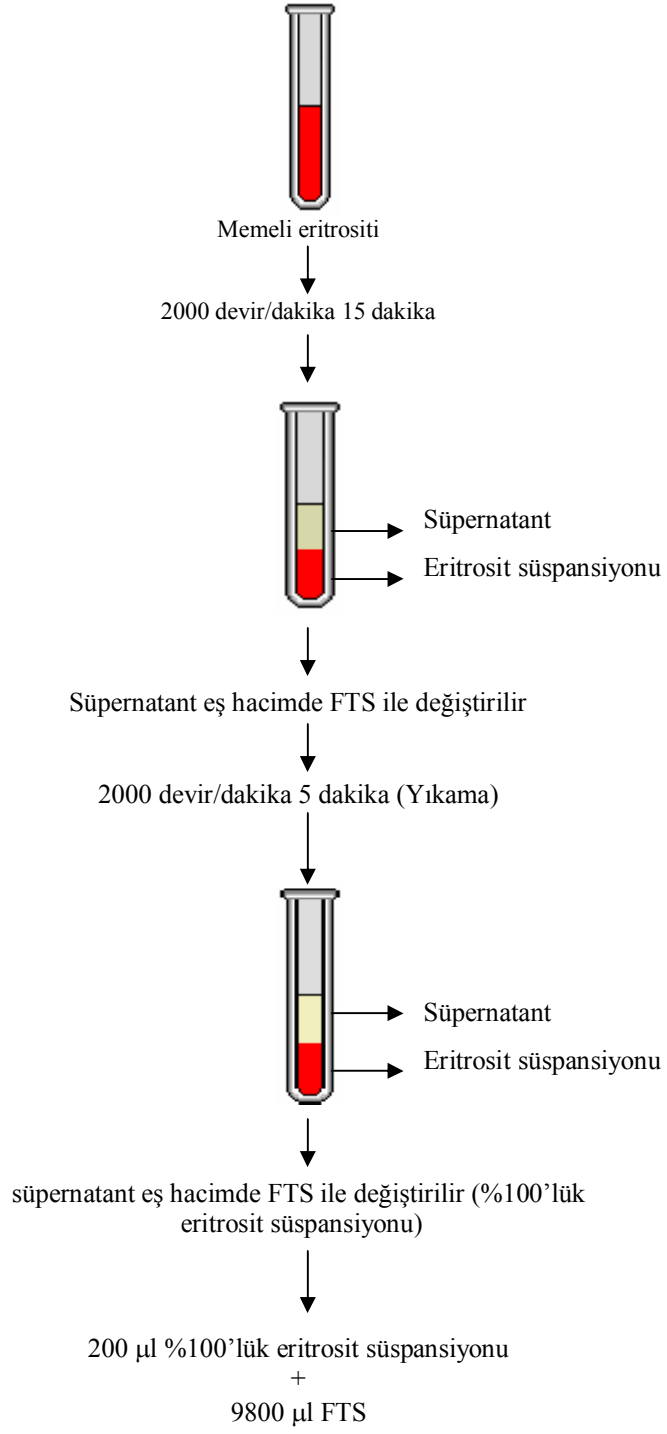
Söloom sıvısının hemolitik aktivitesinin belirlenmesi için, mikroplyette steril FTS ile seri sulandırılmış söloom sıvısının farklı dilüsyonları ile %2’lik koyun, tavşan ve insan eritrositi çözeltileri 1:1 (v/v) hacimde karıştırılıp 2 saat oda ısısında bekletilmiştir (Kalaç, 1997, Lange ve diğ., 1999).

3.5.1. %2'lik Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması

5 ml memeli kanı hemoliz olmaması için antikoagulan madde (sitrat) içeren tüp içerisine alınarak 2000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kanın eritrosit dışındaki şekilli elemanlarını içeren üst sıvı atılarak yerine steril %0.85'lik FTS konup tekrar santrifüj edilmiştir. 2000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilen karışımın üst sıvısı tekrar steril FTS ile değiştirilmiş ve bu işlem santrifüj sonucunda oluşan üst sıvı tamamen berraklaşana kadar tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminde oluşan üst sıvı aynı hacimde FTS ile yer değiştirdikten sonra eritrosit süspansiyonu dikkatlice karıştırılmıştır. Bu karışımdan 0.2 ml alınarak 9.8 ml steril FTS içerisine eklenmiş %2'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmıştır (Şekil 3.3).

3.5.2. Seri Sulandırma Tekniği ile Hemolitik Aktivitenin Tespiti

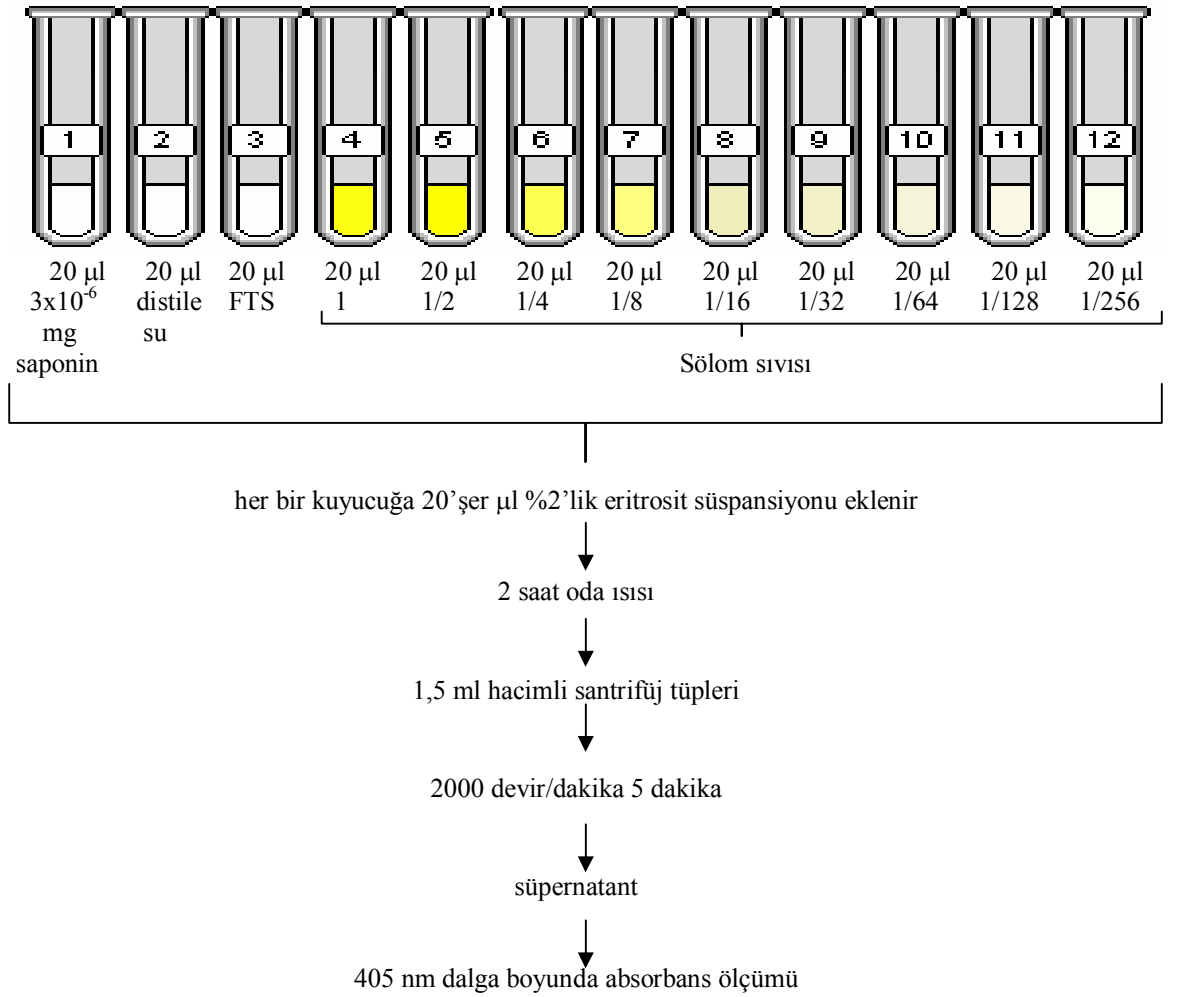
Hemolitik aktivitenin belirlenmesi için 96 kuyucuklu, U tipi mikroyuvar kullanılmıştır. Deneyde negatif kontrol olarak FTS, pozitif kontrol olarak final konsantrasyonu 3×10^{-6} olan saponin çözeltisi kullanılmıştır. Ön denemelerde belirlenen hemoliz değerlerinden yararlanılarak sölom sıvısı 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 ve 1/256 oranlarında sulandırılmıştır. Sölom sıvısı ile %2'lik eritrosit süspansiyonunun 20'şer mikrolitresi karıştırılarak oda ısısında 2 saat bekletilmiştir (Kalaç ve Çotuk, 1992, Kalaç, 1997, Köhlerova ve diğ., 2004). Bu süre sonunda tüm sıvılar 1.5 ml hacimli kapaklı steril santrifüj tüplerine aktarılıp 2000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile hemoliz olmamış eritrositler dibe çökmüş ve bu sayede hemoglobin içeren sıvı faz ayrılmıştır. Üst sıvıların eşit hacimleri toplanmış ve 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Köhlerova ve diğ., 2004). Pozitif ve negatif kontroller göz önüne alınarak %50 ve daha fazla hemoliz yapan konsantrasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3: %2'lik eritrosit süspansiyonunun hazırlanması

3.5.3 Difüzyon Yöntemi

%1 oranında eritrosit içeren agar besiyerlerine steril cam Pastör pipeti ile açılan 6 mm çaplı olukların her birine sölom sıvısının direkt (1), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 ve 1/256 oranındaki sulandırılmalarından 20'şer μl eklenmiştir. 37 °C'de 24 saat bekletilen besiyerlerinde meydana gelen hemoliz zonları ölçülmüştür (Eue ve diğ., 1998).



Şekil 3.4: Seri sulandırma yöntemiyle sölom sıvısının hemolitik aktivitesinin tespiti

3.6. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER

3.6.1. Mac Conkey Agar Besiyeri

Pepton	20 g
Laktoz	10 g
Safra tuzu	5 g
Nötral kırmızı	0.075 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

pH : 7.4 ± 0.2

Tüm maddeleri distile su içerisinde çözülüp pH'sı ayarlanan besiyeri agarının erimesi için düzenli aralıklarla karıştırılarak kaynatılmıştır. Bu işlemden sonra besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika 1 atmosfer basınç uygulanarak steril edilmiştir. Besiyeri, yaklaşık 50 °C sıcaklıkta iken steril Petri kaplarına dökülmüştür. Petri kutuları oda ısısında soğuyup donması beklendikten sonra 37 °C'de bir gece tutularak sterilite kontrolünden geçirilmiş ve deney için kullanılabileceği kadar +4 °C'de saklanmıştır. Saklama süresinin en fazla 30 gün olmasına dikkat edilmiştir.

3.6.2. Eozin Metilen Mavisi (Eosin Methylene Blue, EMB) Agar Besiyeri

Pepton	10 g
Laktoz	10 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Eozin	0.04 g
Metilen mavisi	0.065 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

pH 6.8 ± 0.2

Distile su içerisinde çözülüp pH'sı ayarlanan besiyeri agarının erimesi için düzenli aralıklarla karıştırılarak kaynatılmıştır. Bu işlemden sonra besiyeri otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınç 15 dakika steril edilmiştir. Steril besiyeri Petri kaplarına dökülerek

oda ısısında donması beklendikten sonra 37 °C'de bir gece tutularak sterilite kontrolünden geçirilmiştir. Steril besiyerleri deney için kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır. Saklama süresinin en fazla 30 gün olmasına dikkat edilmiştir.

3.6.3. Nutrient Agar Besiyeri

Et özeti	1 g
Maya özeti	2 g
Pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

pH : 7.4±0.2

pH'sı ayarlanıp agarı eritilen besiyeri otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Steril besiyeri, 50 °C'ye kadar soğutulup Petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri donduktan sonra Petri kutuları 37 °C'de bir gece tutularak sterilite kontrolünden geçirilmiştir. Steril besiyerleri deney için kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır. 30 günden eski besiyerinin kullanılmamasına dikkat edilmiştir.

3.6.4. Fizyolojik Tuzlu Su

Sodyum klorür	8.5 g
Distile su	1000 ml

pH : 7.00±0.2

pH'sı ayarlanan çözelti otoklavda 121 °C'de 15 dakika 1 atmosfer basınç uygulanarak steril edilmiştir.

3.6.5. Mc Farland'ın 0.5 Numaralı Tüp Çözeltisi

BaCl ₂	0.05 ml
H ₂ SO ₄	4.95 ml
Distile su	5 ml

3.6.6. Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri

Dana beyin infüzyon tozu	12.5 g
Sığır kalp infüzyon tozu	5 g
Pepton	10 g
Glukoz	2 g
Sodyum klorür	5 g
Disodyum fosfat	2.5 g
pH : 7.00±0.2	

Besiyeri iyice karıştırılıp pH'sı ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Petri kaplarına dökülüp donması beklenen besiyeri, 37 °C'de bir gece tutularak sterilite kontrolünden geçirilmiştir. Steril besiyerleri deney için kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır. Saklama süresinin en fazla 30 gün olmasına dikkat edilmiştir.

3.6.7. Beyin Kalp İnfüzyon Agar Besiyerinin Hazırlanması

Beyin kalp infüzyon broth besiyerine %1.5 oranında Agar katılarak 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Steril koşullarda Petri kutularına dökülen besiyeri donduktan sonra sterilite kontrolüne tabi tutulmuş ve kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.8. %1'lik Eritrosit Agar

Hemolitik aktivitenin difüzyon yöntemiyle araştırılmasında yumuşak agar içerisine %1 oranında memeli eritrosit süspansiyonu katılmıştır. Bunun için 2 gram agar 200 ml distile su içinde çözülüp otoklavda steril edildikten sonra 50 °C'ye soğutulmuş; içerisine 3.5.A'da anlatılan şekilde yıkanan koyun, tavşan ve insan eritrositlerinden 2'şer ml eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra steril Petri kapları kutularına yaklaşık 3 mm yükseklikte olacak şekilde dökülmüştür (Eue ve diğ., 1998). Petri kaplarındaki besiyeri iyice donduktan sonra sterilite kontrolü için bir gece 37 °C'de tutulmuştur.

4.BULGULAR

4.1. DENEY HAYVANLARI

Deneylerde kullanılan toprak solucanlarının 5-11 cm boyları, koyu pembe-kırmızı deri renkleri ve üreme açıklıkları nedeni ile Lumbricus cinsine ait bireyler oldukları düşünülmektedir. İleride tür tayininin yapılması amacıyla her bölgeden 3 solucan %5'lik formol çözeltisi içerisinde tutulmaktadır. Bu hayvanlar Biyoloji Bölümü bahçesindeki mazgalların altından, Botanik bahçesindeki saksı altlarından ve Beykoz bölgesinde ise toprağın yüzeye yakın kısımlarından çıkarılmıştır.

4.2. BAKTERİLER

Deneyde kullanılmak amacıyla solucanların yaşadıkları biyolojik ortamdan izole edilmiş bakterilerin genel morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Bu 12 bakteri izolatınının 7'si Gram negatif çomak, 3'ü Gram pozitif çomak ve 2'si Gram negatif koktur.

Tablo 4.1: Deneyde kullanılan bakteriler

İzolat	GRAM	MORFOLOJİ	OKSİDAZ	KATALAZ	LAKTOZ
1	Negatif	Çomak	-	+	+
2	Negatif	Çomak	+	-	-
3	Negatif	Çomak	+	-	-
4	Negatif	Çomak	-	+	+
5	Negatif	Çomak	-	+	-
6	Pozitif	Çomak	+	-	-
7	Negatif	Çomak	-	+	-
8	Pozitif	Çomak	-	+	-
9	Pozitif	Çomak	+	+	-
10	Negatif	Kok	-	+	+
11	Negatif	Çomak	-	+	-
12	Negatif	Kok	-	+	+

4.1. ANTİBAKTERİYEL ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

4.1.1. Koloni Sayım Yöntemi

Koloni sayım yöntemi ile antibakteriyel etkinin tespiti deneyinde, sölom sıvısının bakteri süspansiyonu ile karışımı konan kuyucuklardan 24 saat sonra alınan örneklerde koloni sayımı yapılmıştır. Sayım sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla deney grubundaki %50'lik ve daha fazla oranlardaki azalma pozitif olarak kabul edilmiş ve sulandırılmalar sölom sıvısının etkili dozu olarak yorumlanmıştır.

Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının antibakteriyel etkisi Tablo 4.2 ve Şekil 4.1.a-l'de gösterilmiştir. Bu bölge solucanlarının sölom sıvısının tüm sulandırılmalarının izolat 4, 5, 8 ve 10'un üremesini kontrole göre %50 oranında azalttığı Tablo 4.2 ve Şekil 4.1.d,e,h,j'de görülmektedir. Sölom sıvısının izolat 11 ve 12 üzerinde direkt ve 1/10 sulandırılmalarının etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.k,l). İzolat 1, 2, 3, 6, 7 ve 9 üzerine sölom sıvısının direkt dozu dışındaki sulandırılmalarının üremeyi engelleyici etkisinin olmadığı (Şekil 4.1.a,b,c,f,g,i) hata izolat 1, 3 ve 6 üzerine sölom sıvısının üremeyi destekleyici etkisi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.a,c,f).

Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının antibakteriyel etkisi Tablo 4.3 ve Şekil.4.2.a-l'de belirtilmiştir. Tablo 4.3 ve Şekil 4.2.f ve h'de görüldüğü gibi sölom sıvısının tüm sulandırılmalarının izolat 6 ve 8 üzerine etkiliyen, Şekil 4.2.d,g,l'de 4, 7 ve 12 izolatlarına inhibisyon etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. İzolat 1, 3 ve 11 sölom sıvısının sadece direkt ve 1/10 sulandırımından etkilenirken (Şekil 4.2.a,c,k) 2, 5, 9 ve 10 numaralı izolatlar yalnızca sölom sıvısının direkt dozundan etkilenmişlerdir (Şekil 4.2.b,e,i,j). Bu bölgeden elde edilen sölom sıvısının izolat 4 ve 7 üzerine üremeyi destekleyici etkiye sahip olduğu Şekil 4.2.d ve g'de görülmektedir.

Beykoz bölgesinden toplanan solucanlar ile yapılan deneyin sonuçları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Sölom sıvısının tüm sulandırılmaları, Şekil 4.3.a,h,l'de görüldüğü gibi izolat 1, 8 ve 12 üzerinde etki göstermiştir. Şekil 4.3.e'de görüldüğü gibi, izolat 5 sölom sıvısının direkt, 1/10 ve 1/100 oranındaki sulandırılmardan, izolat 6 ve 11 ise direkt ve

1/10 oranındaki sulandırmadan etkilenmiştir (Şekil 4.3.f,k). İzolat 3 ve 4 üzerinde sölom sıvısının sadece direkt dozunun etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3.c,d). Sölom sıvısının izolat 2, 7, 9 ve 10 üzerinde üremeyi durdurucu bir etkiye sahip olmadığı Şekil 4.3.b,g,i,j'de görülmektedir. Aynı zamanda bu izolatlardan 2, 7 ve 10 üzerinde de üremeyi destekleyici etki görülmüştür (Şekil 4.3.b,g,j).

Tablo 4.2: Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi

İzolat	Bakteri Sayısı (kob/ml \pm S.H. $\times 10^7$)					
	Sölom Sıvısı					Kontrol (FTS)
	Direkt	1/10	1/100	1/250	1/500	
1	17 \pm 7	61 \pm 4	60 \pm 8	144 \pm 1	178 \pm 12	34 \pm 2
2	7 \pm 1	20 \pm 3	23 \pm 6	22 \pm 3	16 \pm 1	22 \pm 6
3	1 \pm 0,1	32 \pm 3	30 \pm 6	36 \pm 5	34 \pm 2	16 \pm 0,1
4	6 \pm 0,5	18 \pm 6	21 \pm 6	17 \pm 1	34 \pm 7	42 \pm 1
5	8 \pm 1	25 \pm 6	25 \pm 3	39 \pm 2	61 \pm 2	77 \pm 3
6	0,02 \pm 0,001	1 \pm 0,1	1 \pm 0,2	1 \pm 0,2	1 \pm 0,1	0,42 \pm 0,1
7	33 \pm 4	49 \pm 44	48 \pm 0,2	49 \pm 0,3	56 \pm 0,1	57 \pm 0,1
8	0 \pm 0	0,43 \pm 0,1	0,37 \pm 0,1	1 \pm 0,1	1 \pm 0,1	2 \pm 0,3
9	7 \pm 0,5	19 \pm 1	21 \pm 1	25 \pm 0,02	27 \pm 0,1	32 \pm 1
10	18 \pm 4	19 \pm 3	19 \pm 3	23 \pm 1	30 \pm 2	46 \pm 5
11	0 \pm 0	4 \pm 0,2	53 \pm 1	62 \pm 2	64 \pm 0,1	66 \pm 1
12	2 \pm 1	73 \pm 6	165 \pm 12	168 \pm 4	169 \pm 2	174 \pm 4

Tekrar sayısı (n) : 4
S.H. : Standart Hata
kob : koloni oluşturan bakteri

Tablo 4.3: Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi

İzolat	Bakteri Sayısı (kob/ml \pm S.H. $\times 10^7$)					
	Sölom Sıvısı					Kontrol (FTS)
	Direkt	1/10	1/100	1/250	1/500	
1	2 \pm 0,5	10 \pm 3	41 \pm 1	41 \pm 4	47 \pm 1	52 \pm 3
2	2 \pm 0,3	26 \pm 1	24 \pm 3	25 \pm 4	41 \pm 1	45 \pm 1
3	0,1 \pm 0,07	12 \pm 1	22 \pm 1	23 \pm 1	25 \pm 1	28 \pm 2
4	22 \pm 2	30 \pm 8	35 \pm 7	31 \pm 2	27 \pm 4	24 \pm 2
5	3 \pm 0,3	27 \pm 7	30 \pm 2	29 \pm 2	29 \pm 1	41 \pm 7
6	0,2 \pm 0,03	4 \pm 1	14 \pm 1	16 \pm 5	26 \pm 2	34 \pm 2
7	37 \pm 4	36 \pm 2	54 \pm 3	63 \pm 12	82 \pm 3	51 \pm 12
8	0 \pm 0	0,2 \pm 0,1	7 \pm 0,3	8 \pm 2	8 \pm 1	33 \pm 4
9	1 \pm 0,1	17 \pm 0,6	18 \pm 2	20 \pm 2	19 \pm 2	27 \pm 4
10	19 \pm 2	29 \pm 13	28 \pm 2	33 \pm 3	39 \pm 3	44 \pm 0,2
11	0,1 \pm 0,06	11 \pm 0,3	12 \pm 0,5	19 \pm 1	20 \pm 0,5	22 \pm 1
12	59 \pm 9	79 \pm 14	77 \pm 22	93 \pm 1	94 \pm 2	93 \pm 5

Tekrar sayısı (n) : 4
S.H. : Standart Hata
kob : koloni oluşturan bakteri

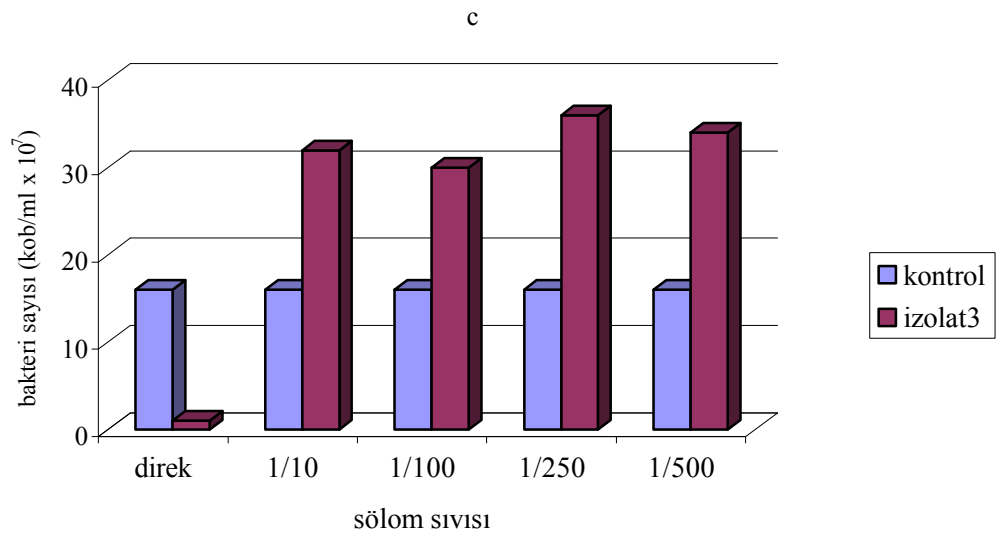
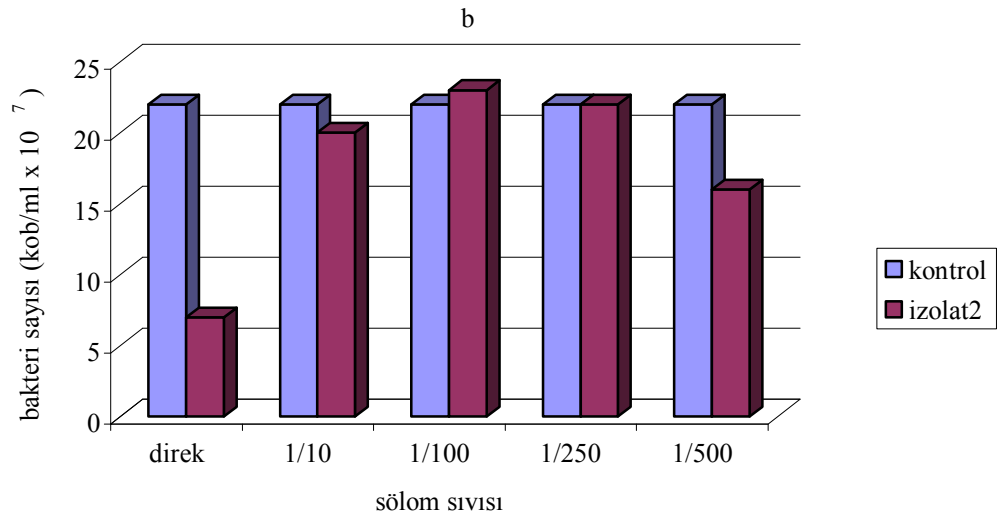
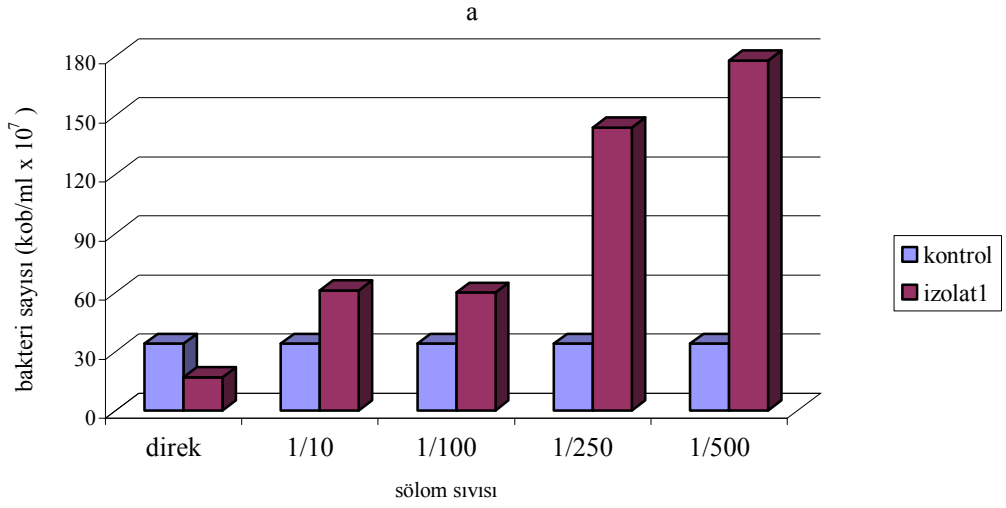
Tablo 4.4: Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının koloni sayım yöntemi ile çeşitli bakteri izolatlarının üremesi üzerine etkisi

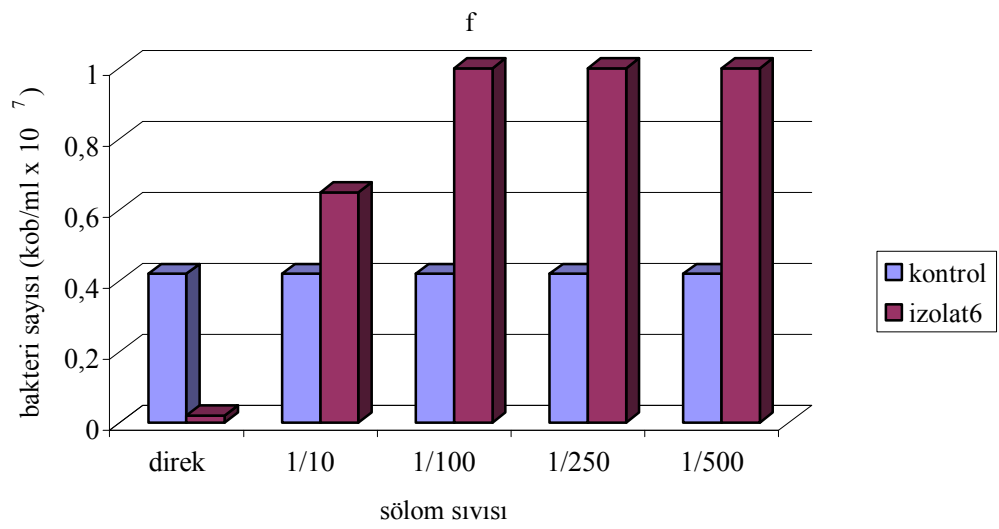
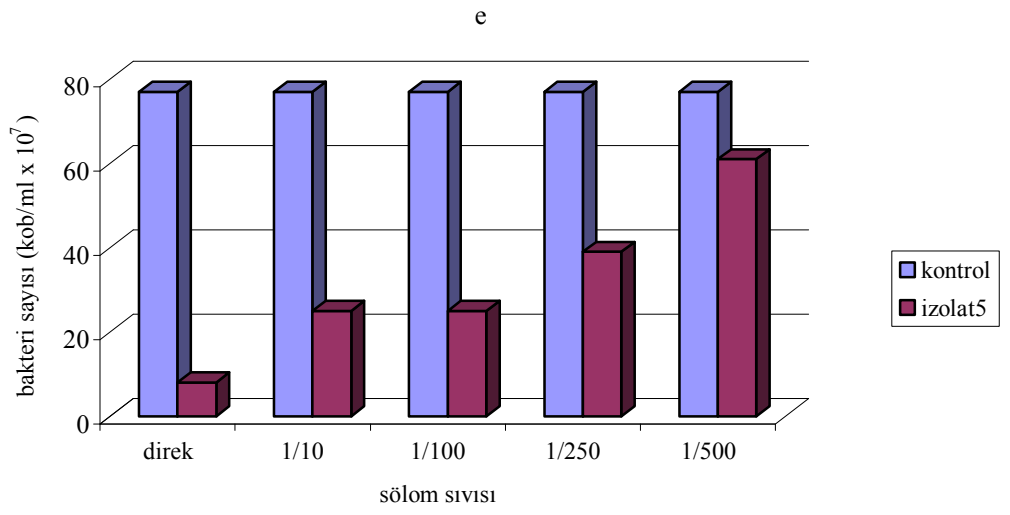
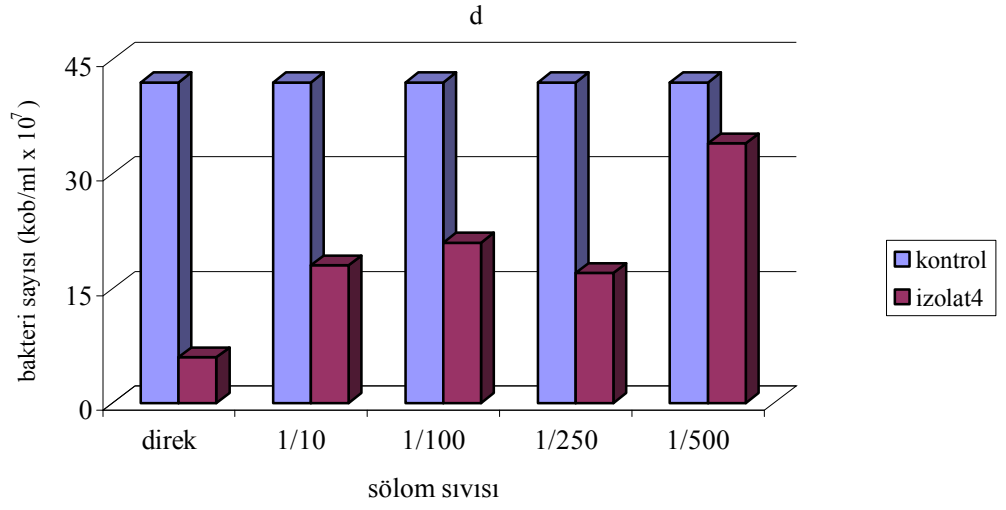
İzolat	Bakteri Sayısı (kob/ml \pm S.H. x 10^7)					
	Sölom Sıvısı					Kontrol (FTS)
	Direkt	1/10	1/100	1/250	1/500	
1	19 \pm 7	129 \pm 3	116 \pm 3	143 \pm 7	153 \pm 6	290 \pm 5
2	6 \pm 0,5	8 \pm 2	7 \pm 0,3	9 \pm 0,2	14 \pm 0,2	7 \pm 0,4
3	13 \pm 0,2	26 \pm 0,5	26 \pm 0,5	26 \pm 0,3	24 \pm 1	29 \pm 5
4	42 \pm 2	99 \pm 3	104 \pm 0,5	107 \pm 2	136 \pm 3	135 \pm 2
5	0,4 \pm 0,01	1 \pm 0,2	8 \pm 0,1	14 \pm 0,1	20 \pm 0,4	22 \pm 0,4
6	0,2 \pm 0,02	0,3 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1 \pm 0,02	1 \pm 0,2
7	24 \pm 2	25 \pm 0,4	27 \pm 0,2	29 \pm 0,2	32 \pm 9	26 \pm 0,2
8	0 \pm 0	0,3 \pm 0,05	0,2 \pm 0,02	1 \pm 0,08	3 \pm 0,06	6 \pm 0,2
9	24 \pm 0,6	25 \pm 0,1	26 \pm 0,1	25 \pm 0,6	26 \pm 0,1	26 \pm 0,2
10	20 \pm 1	21 \pm 0,1	21 \pm 0,1	24 \pm 0,3	25 \pm 1	23 \pm 1
11	1 \pm 0,07	16 \pm 3	30 \pm 2	31 \pm 1	29 \pm 2	32 \pm 0,5
12	87 \pm 5	149 \pm 3	144 \pm 3	161 \pm 3	174 \pm 5	405 \pm 20

Tekrar sayısı (n) : 4

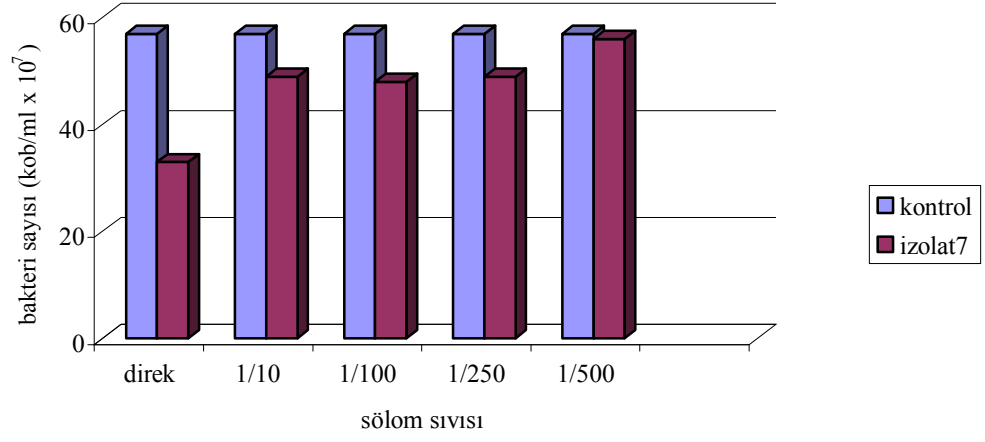
S.H. : Standart Hata

kob : koloni oluşturan bakteri

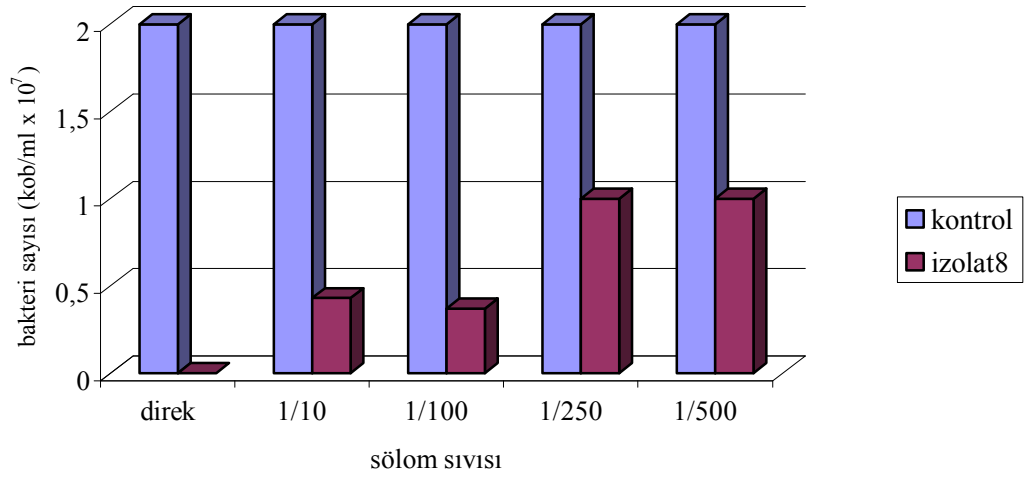




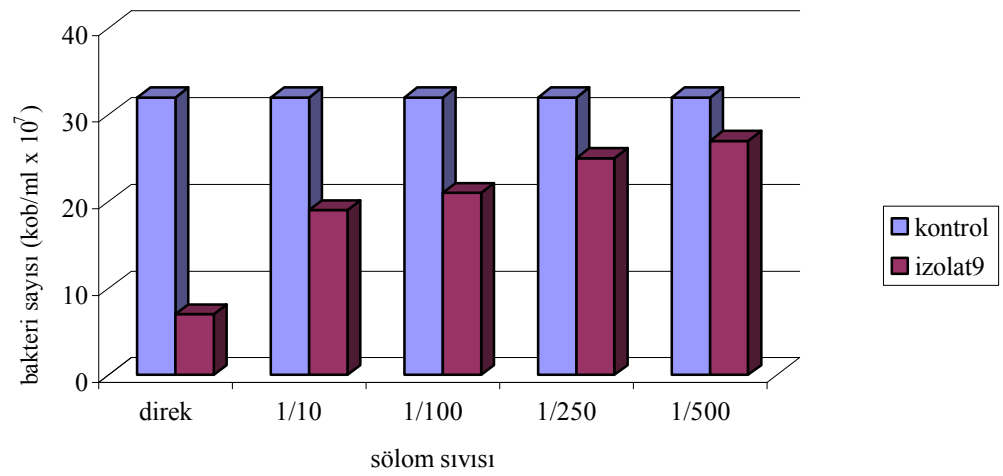
g

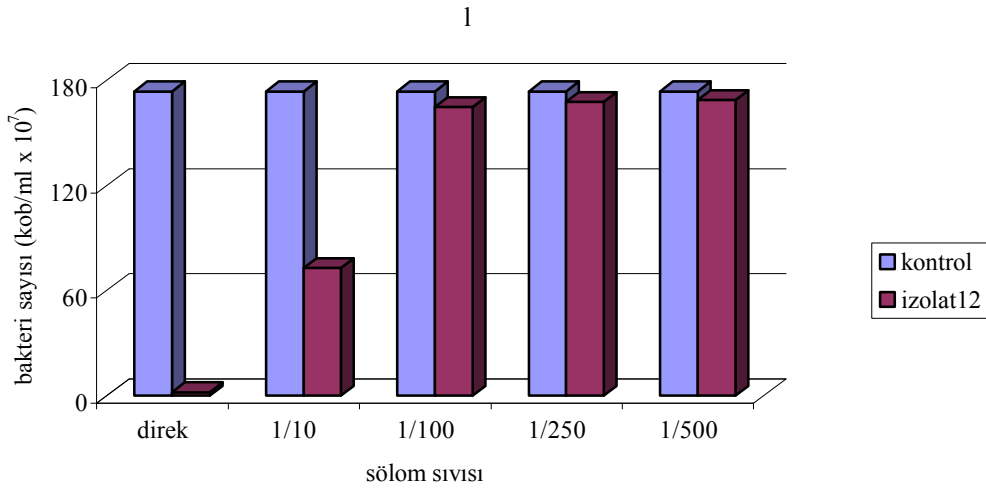
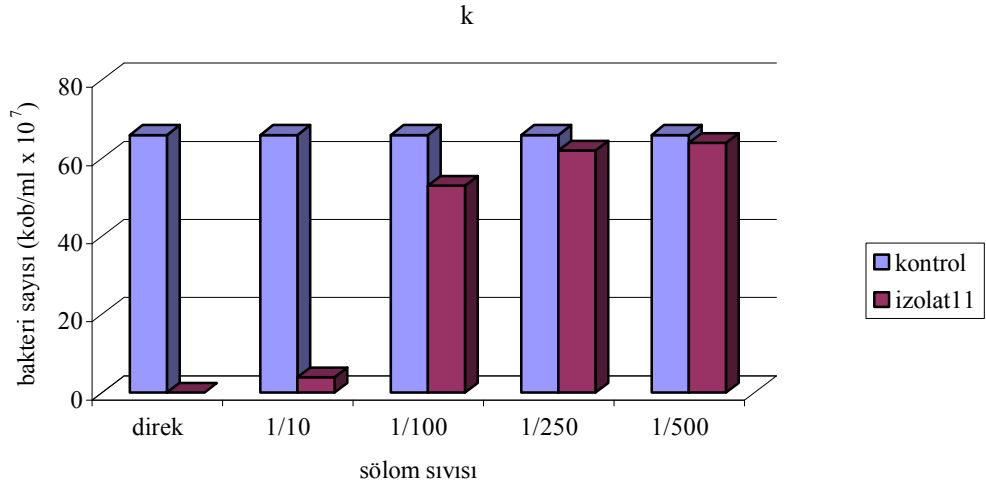
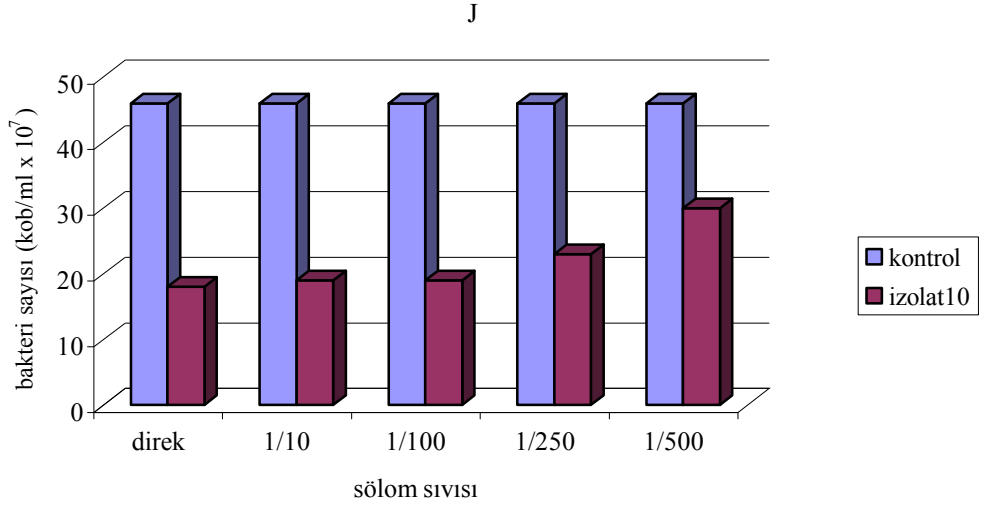


h

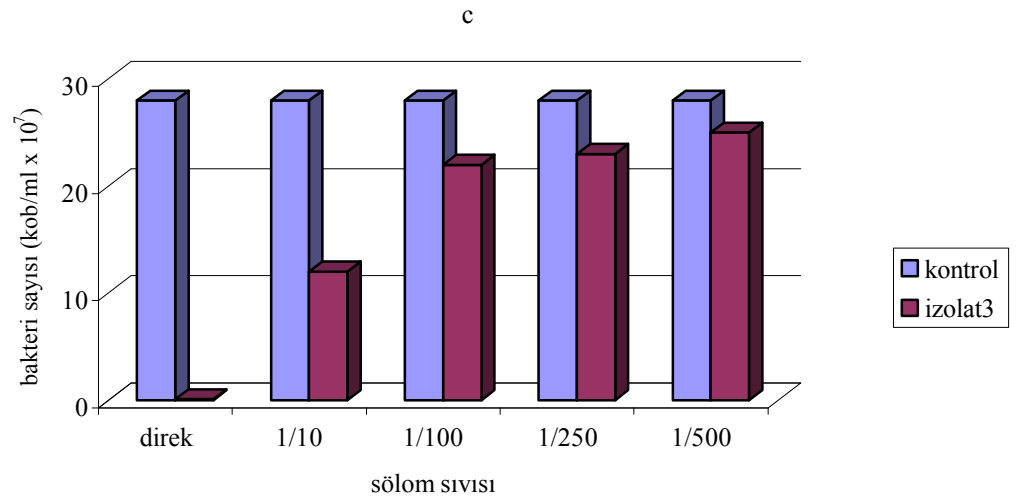
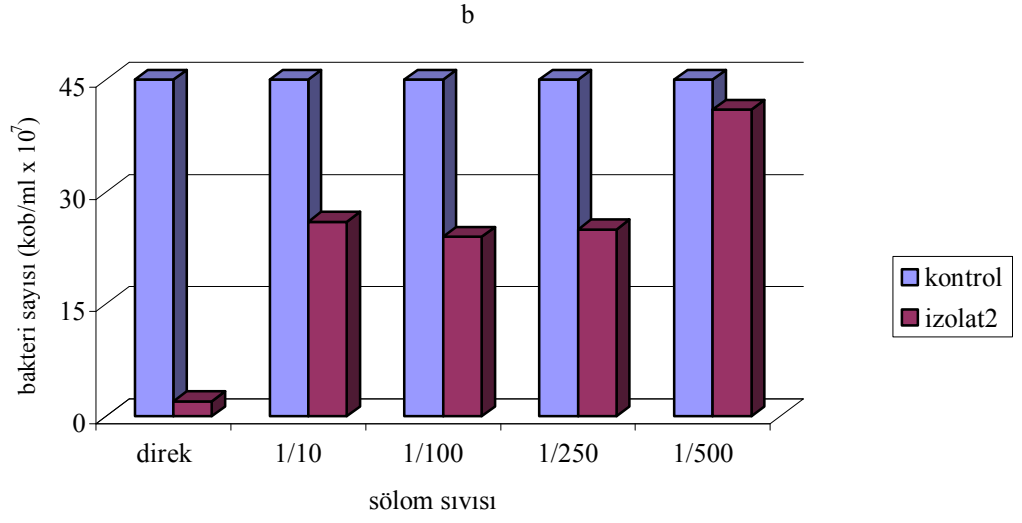
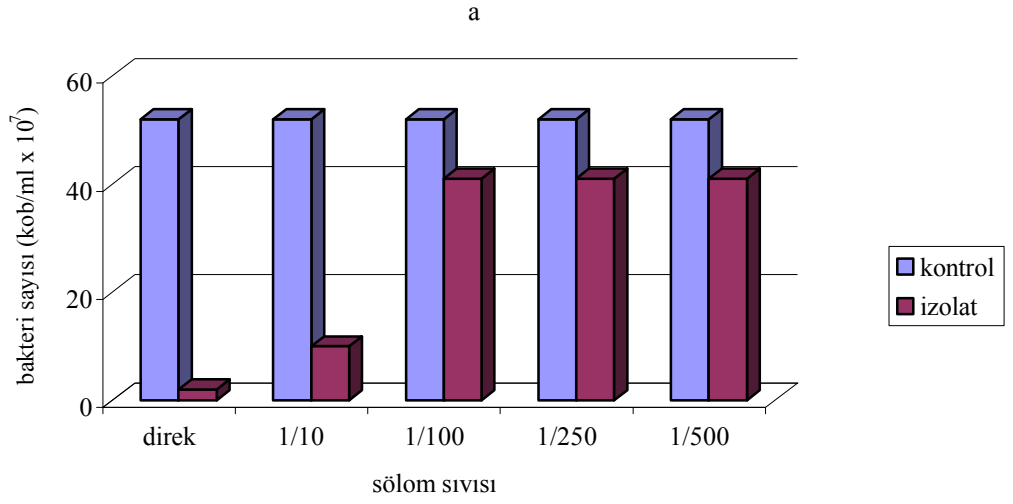


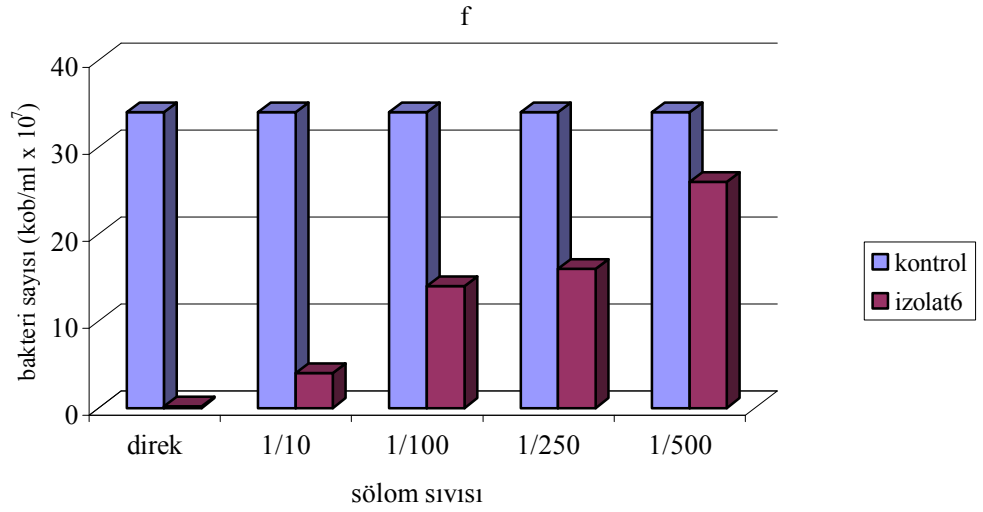
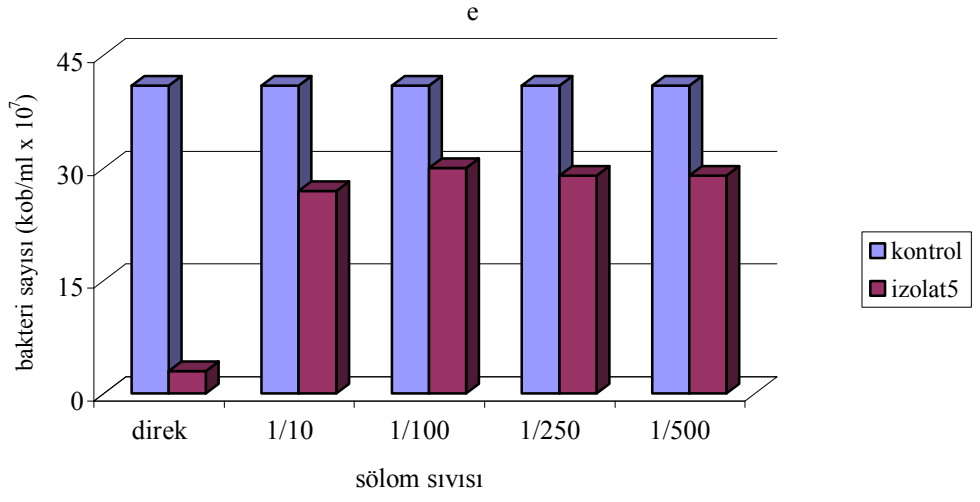
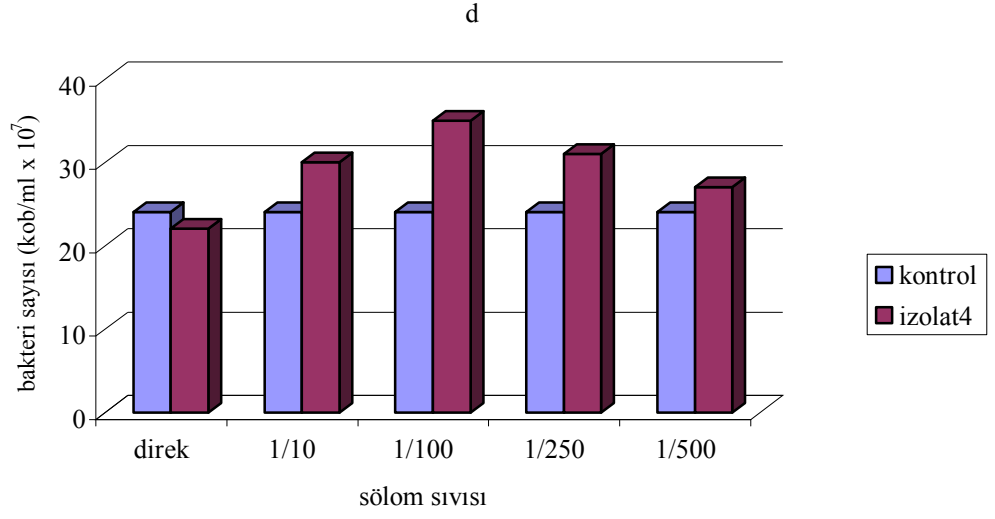
i

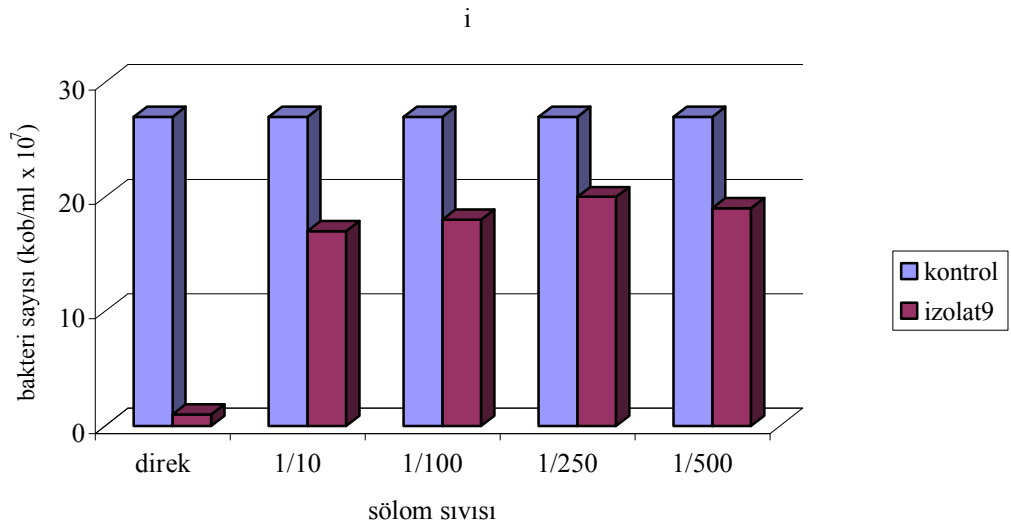
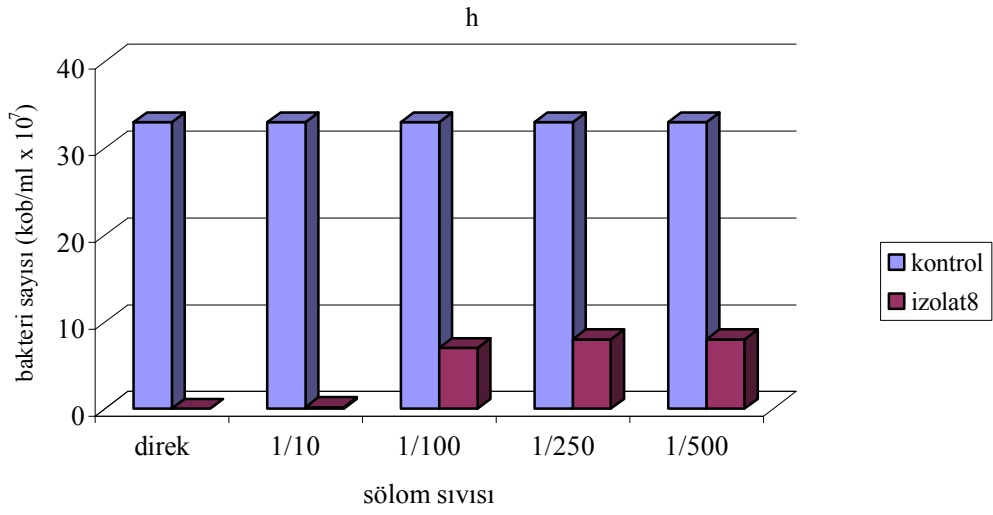
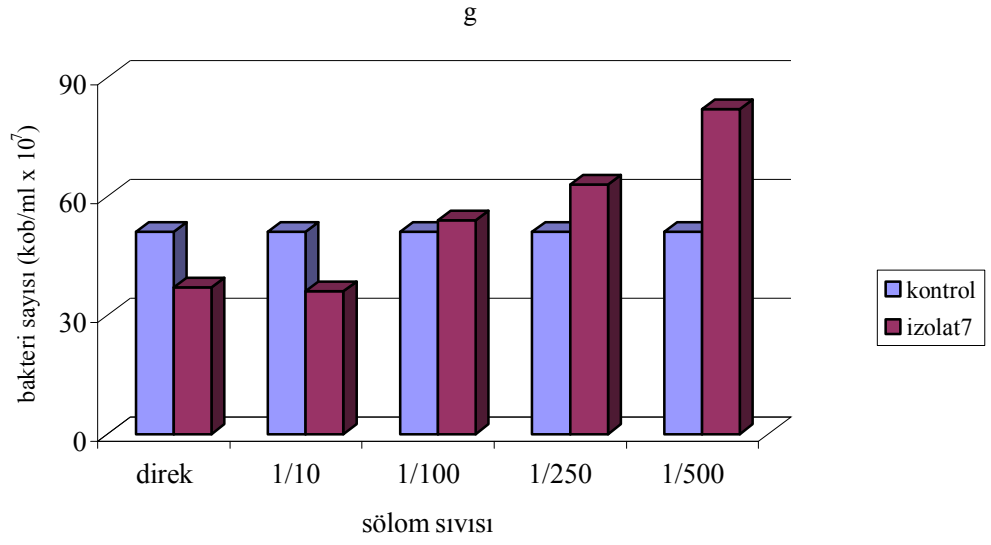


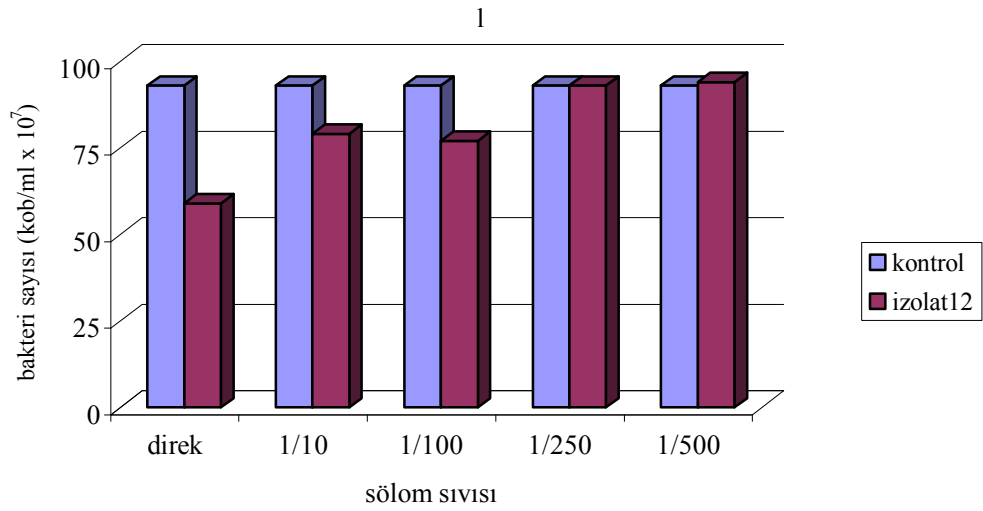
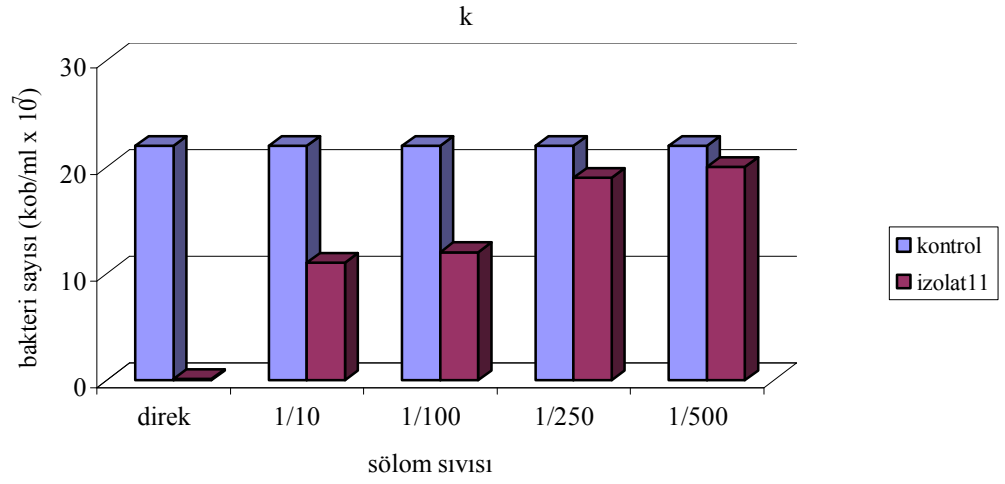
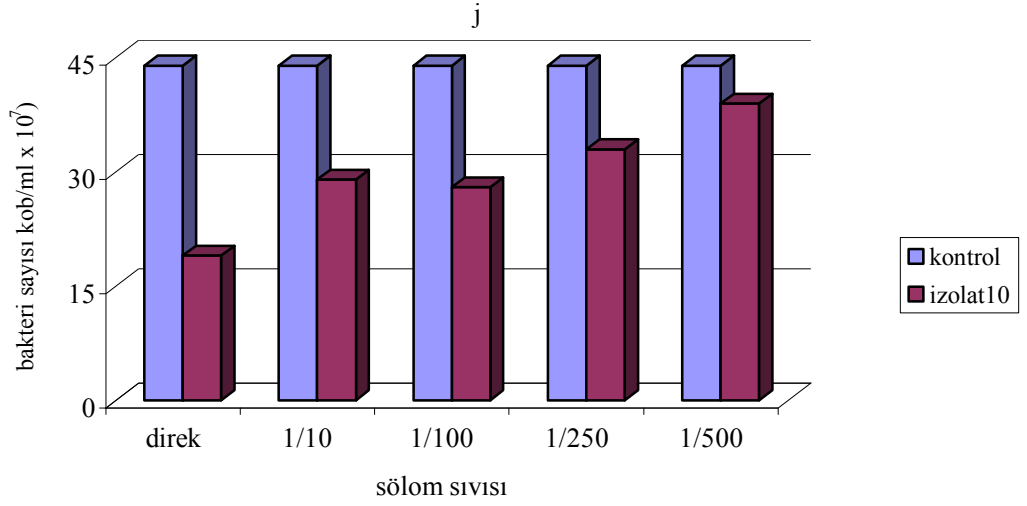


Şekil 4.1.a-l: Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, ı: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12)

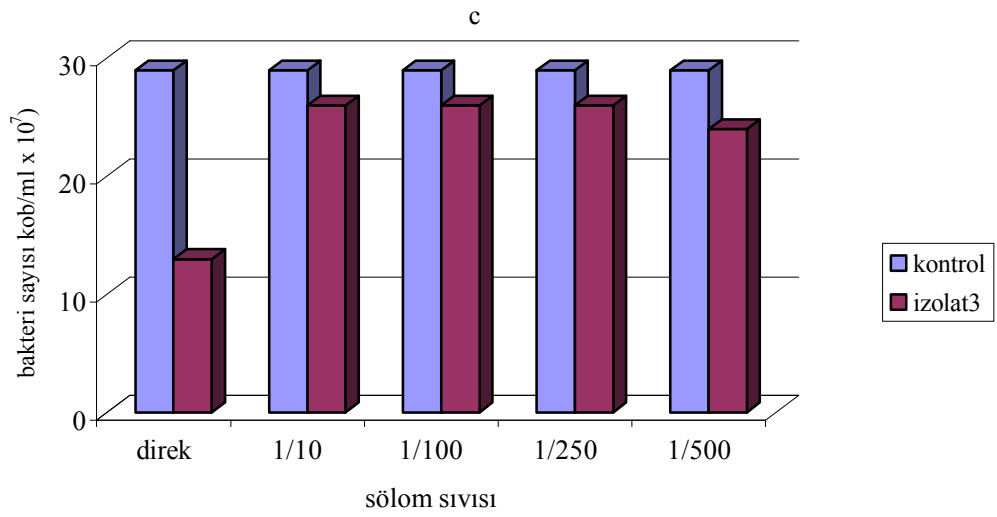
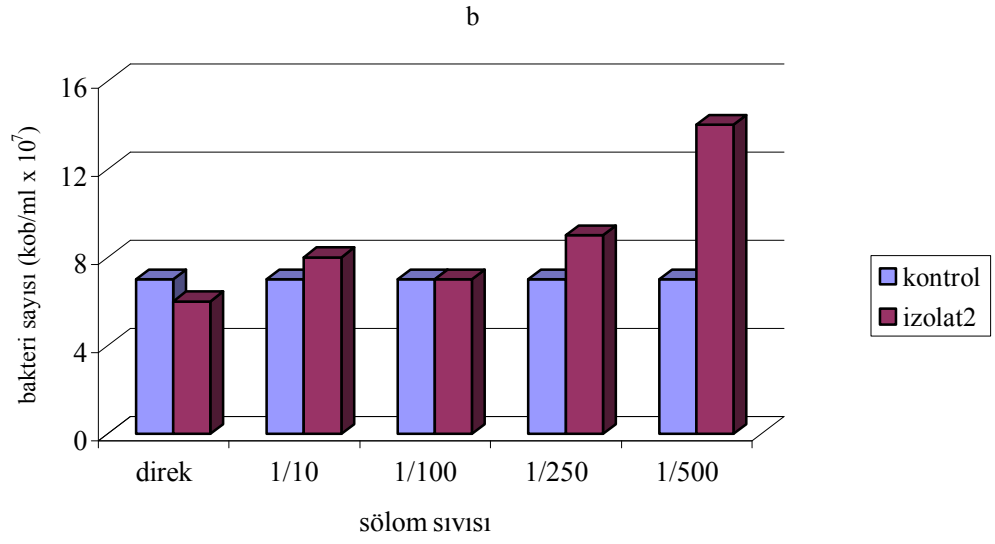
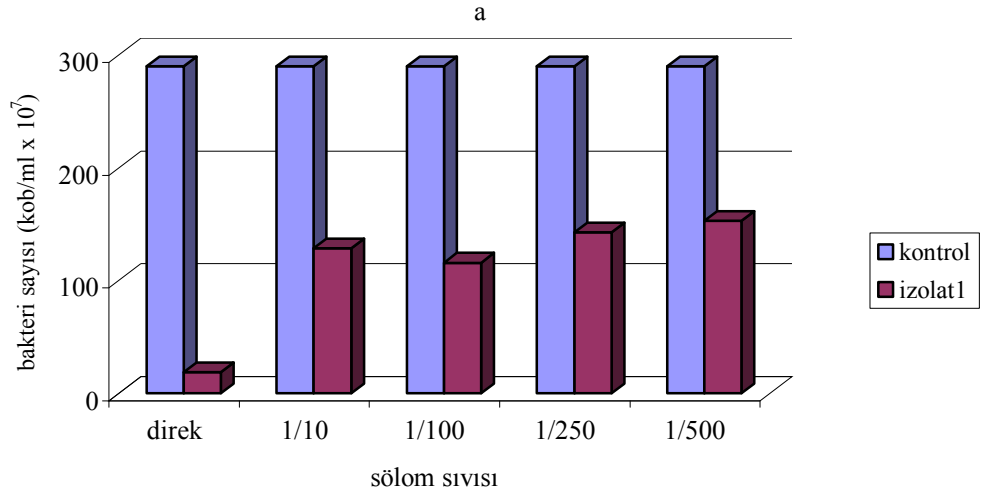


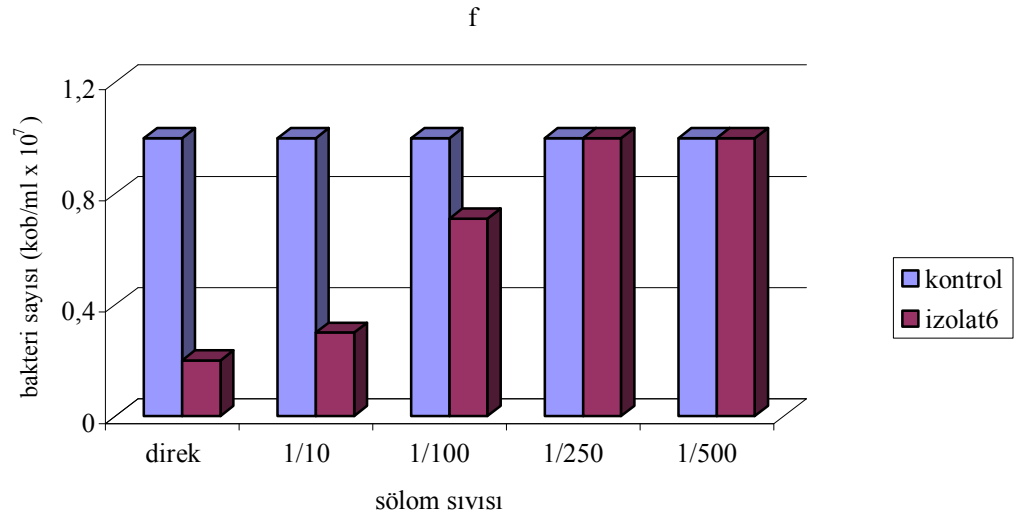
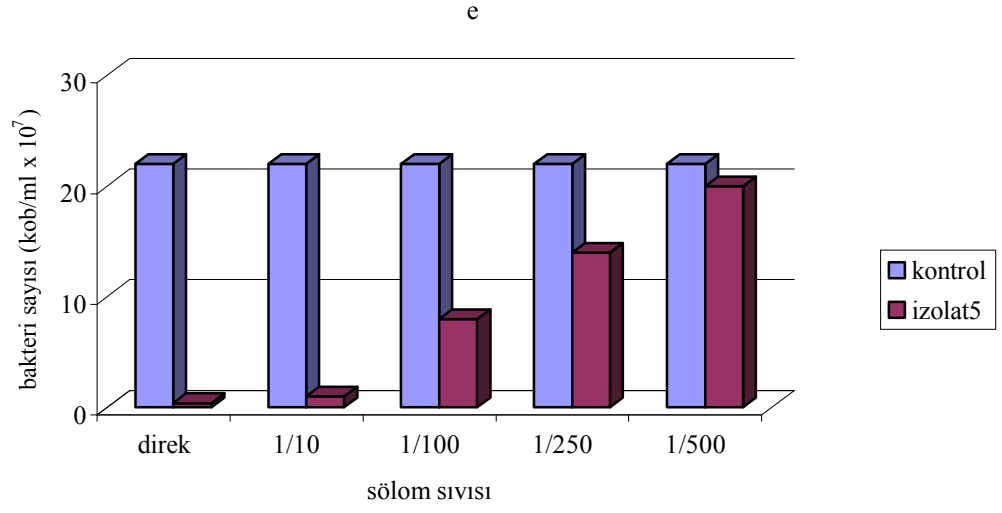
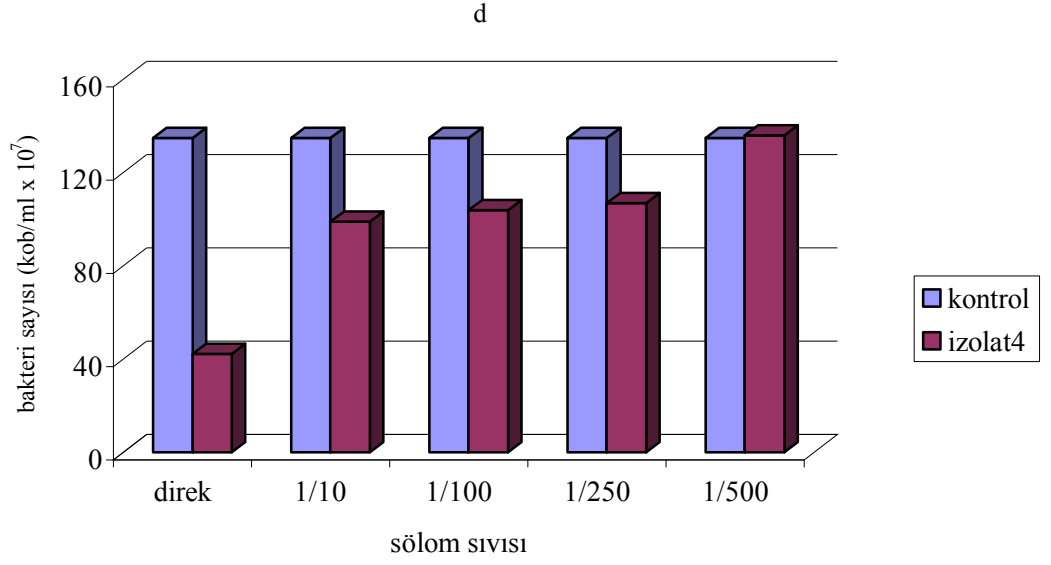


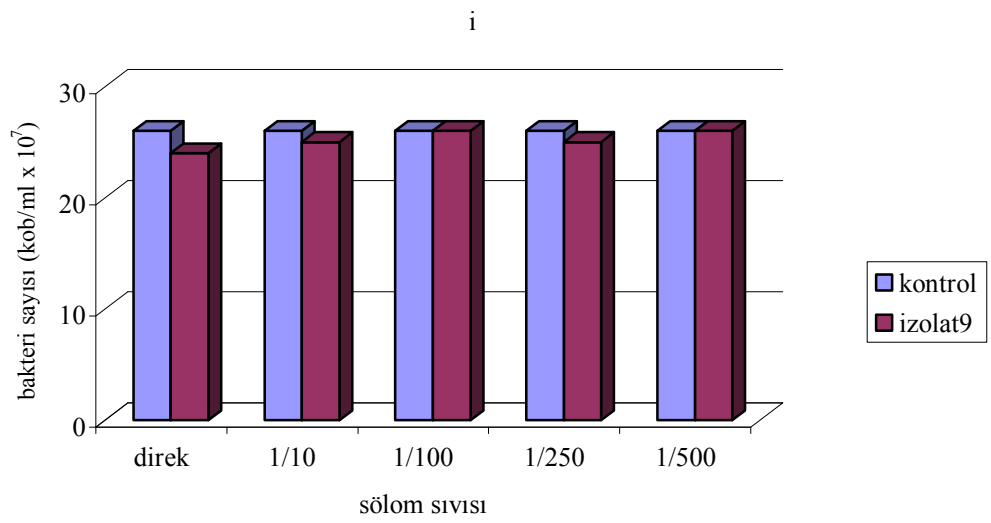
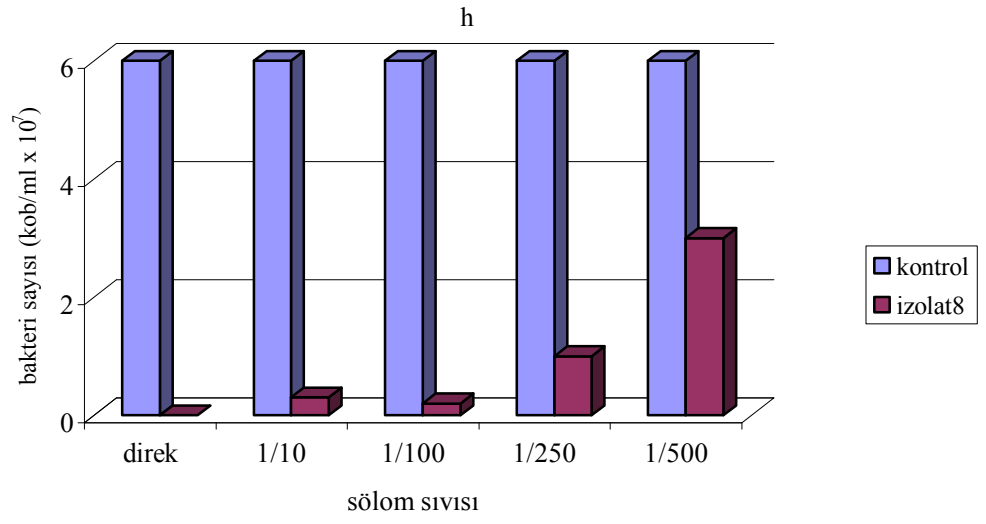
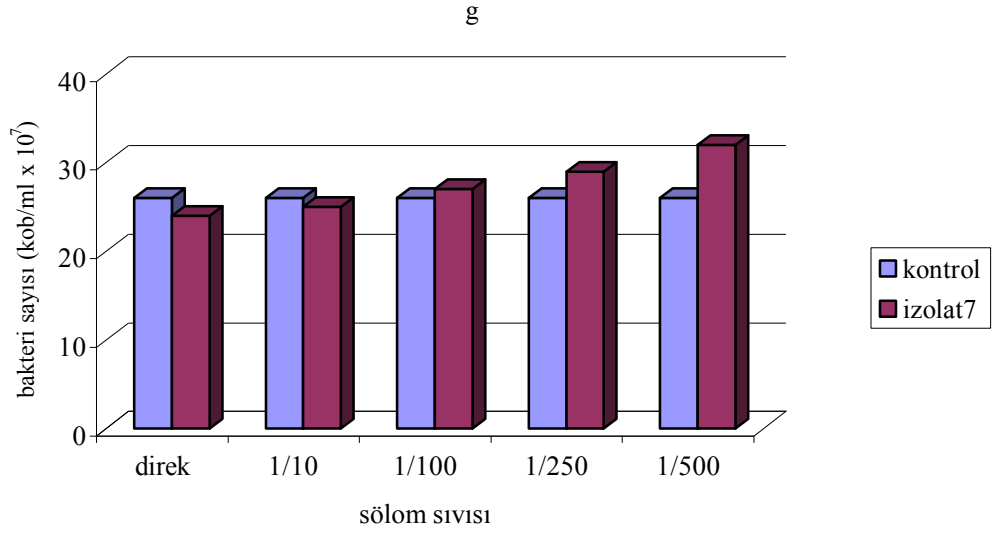


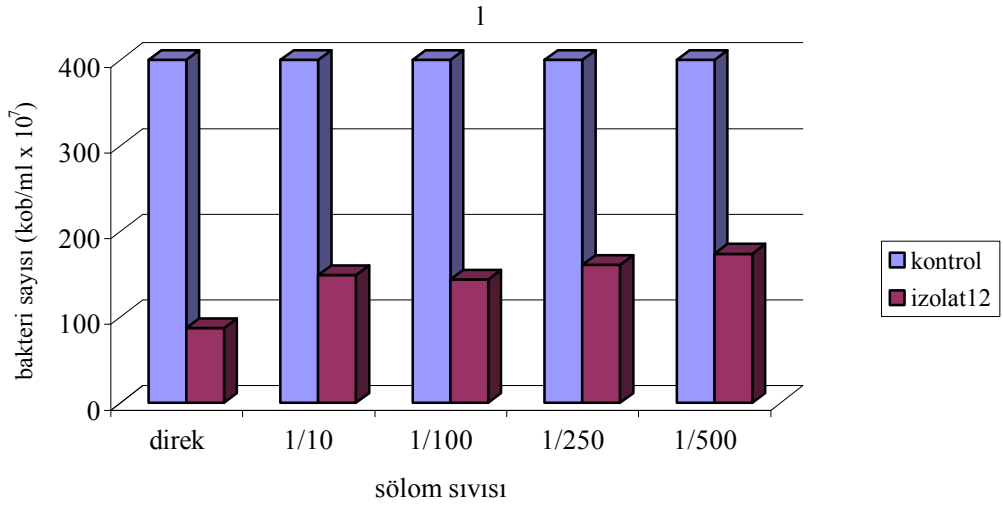
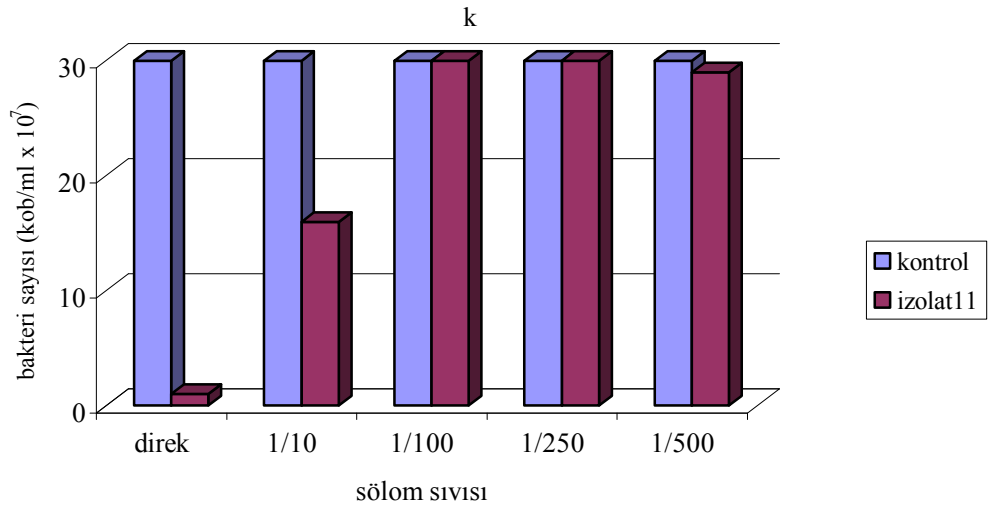
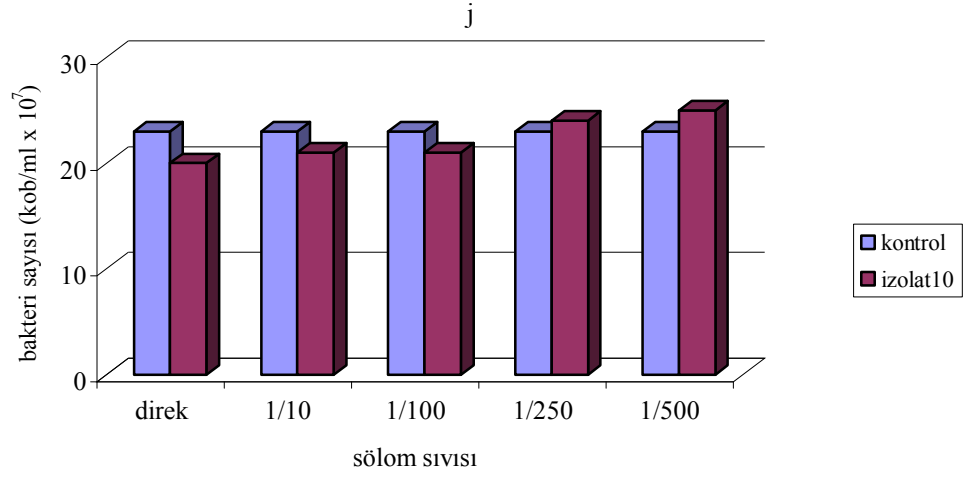


Şekil 4.2.a-l: Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölm sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, i: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12)









Şekil 4.3: a-l Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının denenen bakteri izolatlarının üremesi üzerinde etkisi (a: izolat 1, b: izolat 2, c: izolat 3, d: izolat 4, e: izolat 5, f: izolat 6, g: izolat 7, h: izolat 8, ı: izolat 9, j: izolat 10, k: izolat 11, l: izolat 12)

4.1.2. Disk Difüzyon Tekniği

Söloom sıvısı emdirilmiş diskler bakteri süspansiyonu yayılmış katı besiyerine yerleştirilip 37 °C’de 24 saat beklendikten sonra disklerin etraflarında inhibisyon zonu oluşmadığı saptanmıştır.

4.2. SÖLOM SIVISININ HEMOLİTİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

4.2.1. Dilüsyon Yöntemi

1:1 oranında karıştırılan söloom sıvısı ve %2’lik eritrosit süspansiyonu 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj edilmiş ve üst sıvı 405 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Deneyde koyun, tavşan ve insan eritrositleri kullanılmıştır.

Tablo 4.5’de 405 nm dalga boyunda süpernatantların absorbens değeri standart hataları ile birlikte verilmiştir. Pozitif kontrol olarak %0.0003 saponin kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde pozitif kontrolle kıyaslandığında %50 ve daha fazla oranda hemoliz etkisine sahip söloom sıvısı sulandırımaları pozitif olarak kabul edilmiştir (Lange ve diğ., 1999).

$$\% \text{ hemoliz miktarı} = \frac{\text{Örneğin absorbensı}}{\text{Maksimum hemolizin absorbensı}} \times 100$$

Tabloda görüldüğü gibi Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların söloom sıvısı, koyun ve tavşan eritrositleri üzerinde zayıf bir hemolitik etki göstermiştir. Spektrofotometrik ölçüme göre Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanlardan elde edilen söloom sıvısının sadece direkt dozu koyun eritrositleri üzerinde %52 ve tavşan eritrositleri üzerinde %57 hemoliz etkisi göstermiştir. Nicel olarak mikropleyt incelendiğinde de koyun eritrositlerin söloom sıvısının sadece direkt dozunun ve tavşan eritrositlerini de 1/62 oranındaki sulandırımına kadarki dozlarının etkili olduğu belirlenmiştir. İnsan eritrositleri üzerinde yapılan deneyde bu solucanların söloom sıvısının 1/128’lik sulandırımına kadar pozitif olarak kabul edilen etkisi %59 oranındadır (Şekil 4.4). Mikropleyt incelemesinde de en son etki 1/128 oranındaki sulandırımında tespit edilmiştir.

Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı ise sadece koyun eritrositleri üzerinde direkt dozda %52'lik hemoliz oranı ile zayıf bir etki göstermiştir. Bu hayvanların sölom sıvısının tüm dozları, tavşan ve insan eritrositleri üzerinde etkili bulunmuştur (Şekil 4.5). Mikropleyt incelemesinde ise insan eritrositleri üzerine 1/16 oranındaki sulandırmadan sonra zayıf bir hemoliz etkisi belirlenmiştir. Bu fark spektrofotometrik ölçümün hassas ölçüm sağlaması ve hassas oluşu ile ilgilidir.

Koyun eritrositleri üzerinde Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının 1 ve 1/2 oranındaki sulandırmalarında etki görülmüştür. Tavşan eritrositleri üzerinde ise 1/256 oranındaki sulandırmaya kadar pozitif sonuç alınmış, 1/16 oranındaki sulandırmadan sonra etkili bir hemoliz gözlenmemiştir (Şekil 4.6). Bu sonuçlar mikropleyt incelemesi ile paraleldir.

Tablo 4.5: Üç farklı bölgeden toplanan solucanların sölom sıvısının çeşitli memeli eritrositleri üzerine hemoliz etkisi

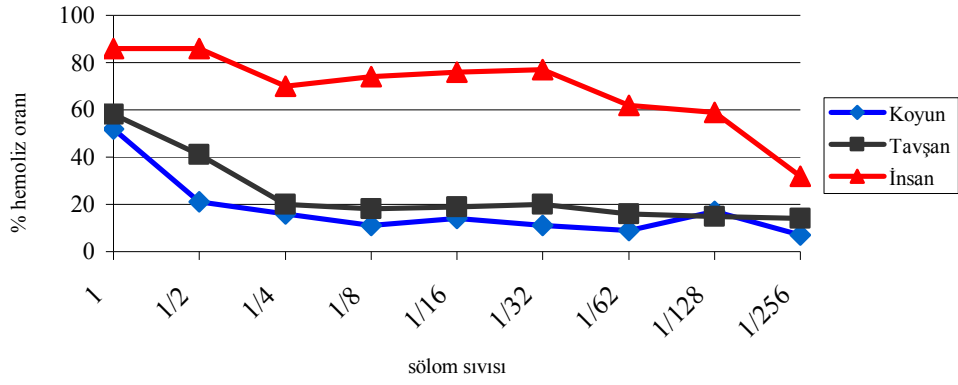
Söloom sıvısı süspanسیونları	Toprak solucanlarının toplandığı bölgeler								
	Biyoloji Bölümü bahçesi			Botanik bahçesi			Beykoz		
	Eritrosit çeşidi			Eritrosit çeşidi			Eritrosit çeşidi		
	Koyun	Tavşan	İnsan	Koyun	Tavşan	İnsan	Koyun	Tavşan	İnsan
+ kontrol	0,265* 0,018**	0,285 0,038	0,307 0,021	0,318 0,024	0,315 0,026	0,334 0,012	0,308 0,017	0,346 0,023	0,340 0,018
- kontrol	0,038 0,006	0,025 0,002	0,025 0,003	0,048 0,015	0,045 0,003	0,068 0,007	0,390 0,005	0,042 0,005	0,058 0,003
Sulandırılmamış	0,139 0,008	0,164 0,016	0,261 0,004	0,173 0,003	0,308 0,007	0,265 0,008	0,283 0,09	0,300 0,016	0,311 0,011
1/2	0,055 0,001	0,118 0,018	0,263 0,020	0,086 0,014	0,235 0,018	0,233 0,003	0,165 0,013	0,211 0,014	0,231 0,008
1/4	0,042 0,009	0,056 0,001	0,216 0,007	0,037 0,007	0,242 0,020	0,192 0,006	0,104 0,004	0,204 0,006	0,230 0,005
1/8	0,029 0,001	0,052 0,002	0,226 0,008	0,045 0,011	0,211 0,007	0,189 0,005	0,064 0,007	0,203 0,005	0,225 0,007
1/16	0,036 0,002	0,054 0,005	0,234 0,006	0,051 0,005	0,231 0,011	0,187 0,005	0,045 0,008	0,200 0,007	0,167 0,011
1/32	0,029 0,007	0,056 0,004	0,236 0,005	0,084 0,003	0,266 0,020	0,185 0,004	0,045 0,004	0,194 0,008	0,117 0,009
1/64	0,023 0,002	0,046 0,002	0,191 0,008	0,056 0,010	0,230 0,008	0,180 0,013	0,044 0,003	0,191 0,011	0,115 0,008
1/128	0,046 0,001	0,043 0,003	0,182 0,005	0,078 0,005	0,259 0,005	0,168 0,005	0,048 0,015	0,185 0,011	0,102 0,004
1/256	0,019 0,001	0,040 0,002	0,102 0,013	0,073 0,003	0,236 0,007	0,168 0,010	0,042 0,005	0,171 0,016	0,091 0,007

*: hemoliz değeri (Absorbans)

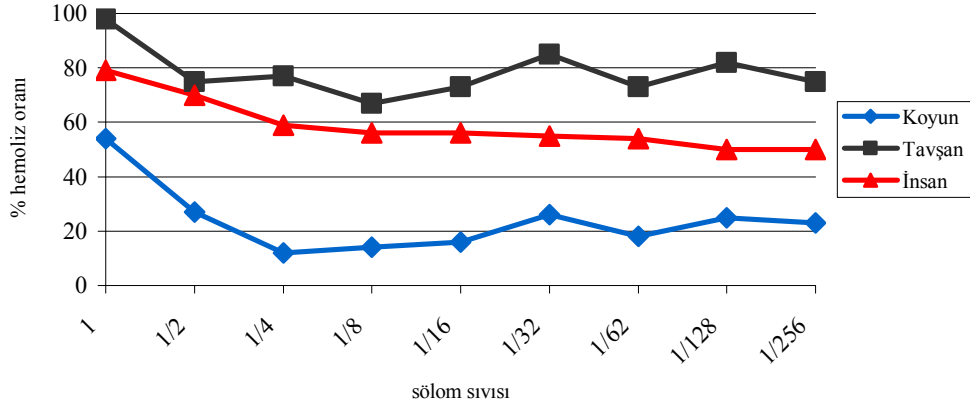
** : Standart Hatası

+ kontrol : %0.0003'lük saponin çözeltisi

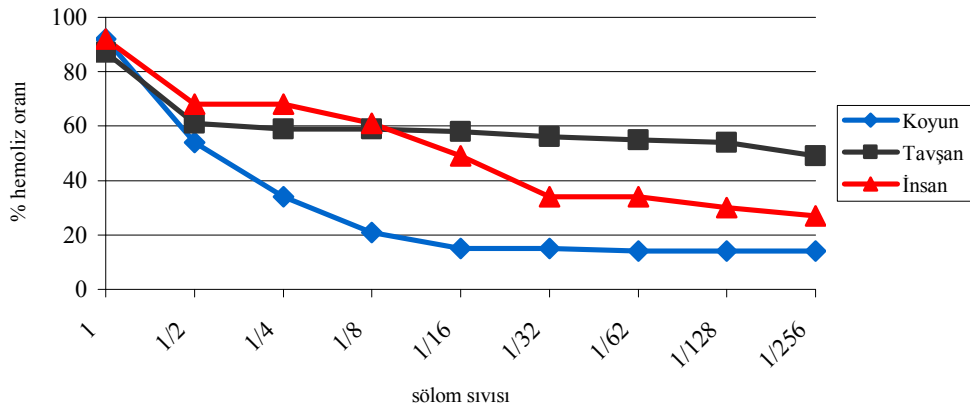
- kontrol : %0.85'lik FTS



Şekil 4.4: Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucan sölm sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi



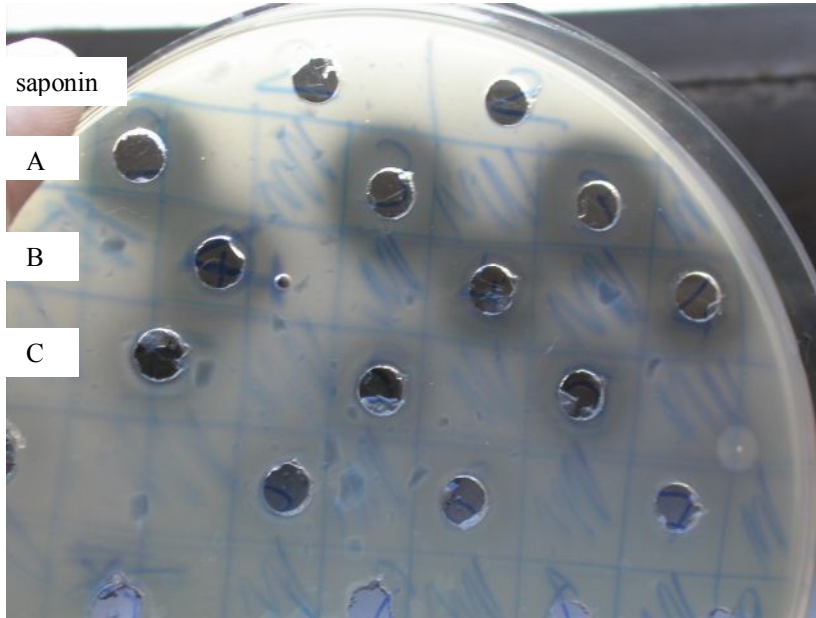
Şekil 4.5: Botanik bahçesinden toplanan solucan sölm sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi



Şekil 4.6: Beykoz bölgesinden toplanan solucan sölm sıvısının eritrositler üzerinde hemolitik aktivitesi

4.2.2. Difüzyon yöntemi ile hemoliz miktarının belirlenmesi

Difüzyon yöntemi ile hemoliz etkisinin araştırılması deneyinde sadece Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısının direkt, 1/2 ve 1/4 sulandırılmaları tavşan eritrositleri üzerinde hemoliz etkisi göstermiştir. Şekil.4.7’de görüldüğü gibi sölom sıvısı konmuş olukların etrafında minimum 8 mm, maksimum 17 mm çaplı hemoliz zonları oluşmuştur. Pozitif kontrol olarak dilüsyon deneyi ile aynı şekilde hazırlanmış 0,00003’lük saponin çözeltisi kullanılmıştır. Dilüsyon yönteminin aksine, bu deneyde saponinin hemoliz oluşturmadığı görülmüştür.



Şekil 4.7 %1’lik tavşan eritrositli agar besiyerinde Beykoz bölgesi solucanları sölom sıvısının hemolitik etkisi (A: direkt , B:1/2, C:1/4’lük sölom sıvısı süspansiyonu)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toprak solucanları, yaşadıkları ortamda bakteriler, protozoonlar, tek hücreli mantarlar ve virüsler gibi mikroorganizmalarla iç içe yaşamaktadırlar. Bu mikroorganizmaların bazılarının insan üzerinde patojen olduğu göz önünde tutulursa, solucanların bu kadar çeşitli mikroorganizmalar arasında nasıl hayatta kalabildikleri ilgi çekicidir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda *E. fetida* cinsi solucanların kokonlarından, sindirim kanalı ve dışkılarından, *Lumbricus rubellus* bağırsağından yüksek miktarlarda bakteri izole edebilmişlerdir. Bu durum solucanların yoğun bakteri istilalarıyla baş etmede yeterli immun sisteme sahip olduğu sonucunu doğurmaktadır (Zachmann ve Molina, 1993, Daane ve Haggblom, 1999, Matthies ve diğ., 1999, Fischer ve diğ., 2003).

İmmun sistemlerinin araştırılmasına 1960'larda doku naklinin ardından ortaya çıkan hücrel ve humoral yanıtların incelenmesi amacıyla başlanılmıştır (Cooper ve Roch, 2003). Birçok araştırmacıya göre kazanılmış bağışıklık sisteminden yoksun olan bu hayvanlar genelde doğal bağışıklık mekanizmaları ve kısa süreli hafıza özellikleri ile kendilerini istilacı organizmalara karşı korumaktadır. Bu immun sistem, hücrel yanıtların yanı sıra, humoral yanıtta da oluşmaktadır. Humoral savunma sistemi, antibakteriyel, hemolitik, aglutinant, proteolitik, sitolitik ve antitümöral özellikleri sağlayan 40'dan fazla molekül tarafından düzenlenmektedir (Çotuk, 1978, Bilej ve diğ., 1990, Tuckova ve Bilej, 1994, Hanusova ve diğ., 1996, Lange ve diğ., 1997, Beschin ve diğ., 1998, Cho ve diğ., 1998, Cooper, 2002, Fontt ve diğ., 2002, Cooper ve Roch, 2003, Engelmann ve diğ., 2004a, Aydilek, 2005).

Çalışmamız, sölom sıvısının humoral yanıtında temel rol oynayan antibakteriyel ve hemolitik etki üzerinedir. Bu konuda çalışan araştırmacılar, genel olarak bu iki etki arasında bir ilişkinin var olduğunu öne sürmektedirler. Valembois ve diğ. (1982a, 1982b), yaptıkları çalışmalarda toprak solucanı sölom sıvısının antibakteriyel etkisinin yanı sıra hemolitik etkisini de incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sölom sıvısının etkili

olduğu bakterilerin yzeye antijenlerinin koyun eritrositleri yzeye antijenleri ile benzer olduklarını ortaya çıkarmışlardır. Floresan boya ile işaretlenmiş anti-KE (koyun eritrositi için özgün antikor) kullanan araştırmacılar çalıştıkları 23 bakteriden sadece 6'sının bu antikorla işaretlendiğini ve bu bakterilere karşı sölom sıvısının üremeyi durdurucu etkisinin olduğunu bulmuşlardır.

Milochau ve diğ. (1997), *E. fetida andrei* sölom sıvısı üzerinde yaptıkları çalışmada, antibakteriyel ve hemolitik etkinin fetidin grubuna ait iki farklı protein tarafından oluşturulduğunu göstermişlerdir. Köhlerova ve diğ. (2004) *E. fetida* sölom sıvısının antibakteriyel ve hemolitik etkisinin birbiriyle ilişkili olduğunu belirtmektedirler. Hemolizde lizozim benzeri moleküllerin yanı sıra slomik sitolitik faktör olarak adlandırılan bir molekülün de iş gördüğünü belirten araştırmacılar, bu faktörün, sölom sıvısını bakteri istilalarına karşı savunmada temel rol oynayan profenol oksidaz kaskadın aktive edilmesinde de görev aldığını göstermişlerdir (Köhlerova ve diğ., 2004).

Yapılan alışmalar, toprak solucanlarının türleri arasında hatta aynı türün bireyleri arasında hümoral savunma sistemi aktivitesi açısından farklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hayvanların beslenmeleri, maruz kaldıkları kimyasal madde çeşidi, yaşları ve buldukları bölge iklimleri immun sistemleri üzerinde etkili olmaktadır (Aydilek, 2005).

Bu araştırmalardan yola çıkarak alışmamızda Biyoloji Bölümü bahçesi, Botanik bahçesi ve Beykoz bölgelerinden toplanan toprak solucanı sölom sıvılarının antibakteriyel ve hemoliz etkisi incelenmiştir.

Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı 12 bakteri türünden sadece 4' üzerinde üremeyi engelleyici etki göstermiştir. Başka bir deyişle bu bölgeden elde edilen sölom sıvısı, denenen bakterilerin %33.3'nde üremeyi durdurucu etki göstermiştir. Sölom sıvısının 3 bakteri türünün üremesini teşvik ettiği belirlenmiştir. Botanik bahçesi solucanları sölom sıvısı, denendiği bakterilerin %50'sinde üremeyi engelleyici bir etki oluşturmuştur. Bu bölge hayvanlarının sölom sıvısının da bazı bakteri türleri üzerinde üremeyi destekleyici etkisi saptanmıştır. Beykoz bölgesinden

toplanan solucanların sölom sıvısı, denenen bakterilerin üremesi üzerinde diğer iki bölge hayvanlarının sölom sıvısından daha zayıf bir etki sergilemiştir. Sadece 3 izolat üzerinde üremeyi engelleyici bir etki görülmüştür (%25). Üremesi engellenen bakterilerin yanı sıra bu bölge solucanlarının sölom sıvısının 3 bakteri suşunun üremesini teşvik ettiği de gözlenmiştir.

Koloni sayım tekniği sonuçları incelendiğinde bölgeler arasında her bakteri için farklı sonuçlar gözlenmektedir. İzolat 8 dışında her üç bölgeden toplanan solucanların sölom sıvıları denenen bakteriler üzerine farklı etkiler göstermiştir. Bu durum sölom sıvısının üremeyi teşvik edici etkisi için de geçerlidir. Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı tarafından üremesi desteklenen suşun, Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısı tarafından üremesi engellenmiştir.

Üç bölgeden toplanan solucanların sölom sıvılarının etkileri arasındaki bu farklılığın bir nedeni hayvanların doğal yaşam ortamlarının farklılığı olabilir. Biyoloji Bölümü bahçesindeki mazgallardan toplanan hayvanlar ölü yaprak katmanı arasında ve otoparktan kaynaklanan araç yakıtlarından kaynaklanan kirliliğe maruz kalarak yaşamaktadırlar. Aslında antibakteriyel etki deneyleri için elde edilen izolatların bu hayvanların yaşadığı bölgeden toplandığı göz önünde bulundurulursa en yüksek etkinin bu bölge solucanlarının sölom sıvısında gözlenmesi beklenirdi. Ancak deney sonuçlarından Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısının antibakteriyel etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu etkide solucanların Botanik bahçesindeki saksı altlarındaki besince zengin ve kimyasal kirlilikten uzak yaşam alanlarından toplanmalarının rolü olduğu düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili olarak çalışan araştırmacılar, solucanların doğal ortamlarından izole ettikleri bakterilerle çalışmışlardır (Çotuk ve Dales, 1982a,b, Valembois ve diğ., 1982a). Sölom sıvısının bakteriler üzerine etkisi farklılık gösterdiğinden izole ettiğimiz bakterilerin tanısını yaparak bu farklılığın bakteri türüne göre değişip değişmediği anlaşılacaktır. Sonbaharda toplanan bu iki bölge solucanlarının aksine Beykoz bölgesinden toplanan solucanlar kısmın toprağın 20 cm'lik derinliğinden çıkarılmışlardır. Besin açısından fakir olan sert ve taşlı toprakta yaşayan bu solucanların en zayıf antibakteriyel etkiye sahip oluşlarının sebebi yaşam ortamları olabilir.

Koloni sayım yöntemi ile sölom sıvısının denendiği bakteri izolatlarının üremesini değişik oranlarda etkilemesi bakterisidal ve bakteriyostatik etkiyi düşündürmektedir. Valembois ve diğ. (1982a,b) *E. fetida* sölom sıvısının güçlü hemolitik aktivitesinin yanı sıra bakteriyostatik, bakterisidal, proteolitik, aglutine edici ve sitotoksik etkisinin olduğunu da belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Engelmann ve diğ. (2004b) çalışmalarında sölom sıvısının, bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin hayvanların sölomositlerince salındığını belirtmişlerdir.

Kalaç (1991), yaptığı çalışmada *Dendrobaena venata* cinsi toprak solucanı sölom sıvısının güçlü bir antibakteriyel etkisinin olmadığını bulmuştur. Kalaç (1997), başka bir çalışmada ise sölom sıvısının direkt dozunun *Aeromonas hydrophila* ATCC7966'nin üremesini teşvik ettiğini, *Serratia marcescens* bakterisinin üremesini engellediğini saptamıştır.

Yapılan çalışmalarda sölom sıvısının antioksidan ve mitojenik etki göstererek çeşitli doku hücrelerinin üremelerini teşvik ettiğini bulmuşlardır (Hanusova ve diğ., 1999a, Grdisa ve diğ., 2001).

Bu sonuçlar çalışmamızda ortaya çıkan sonuçları destekleyici özelliktedir. Genellikle denenen bakterilerin bazıları üzerine antibakteriyel etkiye sahip olan sölom sıvısı, bazen de bu bakterilerin üremesini teşvik etmektedir. Bu etkinin sebeplerini, antibakteriyel etkinin yetersiz kaldığı durumlarda sölom sıvısının bakteriye besin sağlaması veya sölom sıvısı içinde bulunan üremeyi destekleyici ajanların, bazı bakteriler üzerinde de etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Koloni sayım yönteminin yanı sıra antibakteriyel etki disk difüzyon yöntemi ile de araştırılmıştır. Ancak bu yöntemde başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Sölom sıvısının agar difüze olmadığını bu nedenle antibakteriyel etkinin difüzyon yöntemiyle saptanmasının mümkün olmadığını düşünmekteyiz. Ayrıca yöntemde kullanılan sölom sıvısı miktarının (20 µl) da azlığı, sonucun başarısızlığında rol oynamış olabilir. Benzer şekilde Kalaç (1997) çalışmada disk difüzyon yöntemi ile sonuç alınamayınca deney daha hassas olan spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile tekrarlamıştır. Bunu destekleyen

biçimde araştışıcıların çoğu antibakteriyel etkinin tespitine yönelik çalışmalarında koloni sayım tekniğini tercih etmektedirler.

Antibakteriyel etkinin solucanların antijenik uyarımının ardından arttığına dair yayınlar mevcuttur (Evans ve diğ., 1973, Bilej ve diğ., 1990, Tuckova ve Bilej, 1994). Antijenik maddelerin enjeksiyonun ardından bu hayvanlarda bulunan interlökin benzeri moleküllerin immün sistemi aktive ettiği kanıtlanmıştır. Bu sistemin en önemli elemanı profenol oksidaz enzim mekanizmasıdır. Bu mekanizma ile yabancı hücrelerin zar yapıları bozulmaktadır (Kalaç, 1997, Beschin ve diğ., 1998).

Toprak solucanı immün sistemine ait yapılan çalışmaların bir diğer grubunu ise hemolitik etki araştışmaları oluşturmaktadır. Aslında bu çalışmalar sölom sıvısının toksisitesini açığa çıkarmaya yönelik çalışmalardır. Bu amaçla Kobayashi ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmada sölom sıvısının omurgalı ve omurgasız türleri üzerine sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını araştışmışlardır. Araştışıcılar, bu etkinin omurgalıların dokularında mevcut olan sfingomiyelinin sölom sıvısındaki lizinlerce sindirilebilmesi sonucu ortaya çıktığını göstermektedir. Omurgasızlar üzerinde sölom sıvısının toksik olmamasının sebebi olarak da sfingomiyelin yapının bulunmaması gösterilmektedir (Lange ve diğ., 1997).

Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı ile yapılan hemoliz deneyinde %2'lik koyun eritrositi üzerinde sadece sölom sıvısının direkt dozunda hemoliz gözlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümde de benzer sonuçlar görölmektedir. Sölom sıvısının 1/32 oranındaki sulandırımına kadar tavşan eritrositlerini mikropleytte hemoliz ettiği saptanmasına rağmen spektrofotometrik olarak sadece direkt ve 1/2 dozunda hemoliz görölmektedir. İnsan eritrositleri ile yapılan deneyde ise hem mikropleytte hem de spektrofotometrede sölom sıvısının 1/128'e kadar güçlü hemolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Botanik bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı ile aynı yöntem ile hemoliz deneyi tekrarlanmıştır. Bu bölgeden toplanan solucanların sölom sıvısının en zayıf hemolitik etkiyi koyun eritrositleri üzerinde oluşturduğu saptanmıştır. Bu sonuç mikropleytte ve spektrofotometrede birbirini doğrulamaktadır. Botanik bahçesinden

toplanan solucanların sölom sıvısı en yüksek hemolitik etkiyi tavşan eritrositleri üzerinde göstermiştir. İnsan eritrositleri üzerinde ise sölom sıvısının 1/16 oranındaki sulandırımından sonra mikropleytte iyi bir hemoliz saptanamazken spektrofotometrik ölçümde tüm sulandırmalarda %50'nin üzerinde sonuçlar elde edilebilmiştir.

Beykoz bölgesinden toplanan solucanların sölom sıvısı ise koyun eritrositleri üzerinde zayıf bir hemolitik etki göstermiştir. Bu bölgeden toplanan hayvanların sölom sıvılarının tüm sulandırmalarının tavşan eritrositlerini hemoliz ettiği saptanmıştır. İnsan eritrositleri üzerine ise 1/16 oranındaki sulandırımından sonra zayıf bir etki görülmektedir. Bu sonuçlar hem mikropleytte hem de spektrofotometrede gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, üç bölgeden toplanan solucanların sölom sıvısı en fazla tavşan ve en az koyun eritrositleri üzerinde hemolitik etkiye sahiptirler. İnsan eritrositleri üzerine ise Biyoloji Bölümü bahçesinden toplanan solucanların sölom sıvısı güçlü etkisi dışında genelde orta düzeyde bir etki görülmektedir. Kalaç (1992) yaptığı çalışmada benzer şekilde *D. venata* cinsi solucanların sölom sıvısının insan ve tavşan eritrositleri üzerine etkiliyken koyun eritrositleri üzerinde zayıf bir etki gösterdiğini belirtmiştir.

Difüzyon yöntemi ile üç bölgeden toplanan solucanların sölom sıvısının hemoliz etkisinin araştırılmasında kullandığımız yöntem, antibakteriyel etkinin araştırması için kullandığımız difüzyon yöntemi gibi başarısız olmuştur. Bu sonuçlar sölom sıvısının katı besiyerine difüze olmakta zorlandığı düşüncemizi desteklemektedir. Hemolitik etkinin tespiti deneylerinde kullanılan ve memeli kan hücreleri üzerine parçalıyıcı etkiye sahip olan saponinin de agara difüze olamadığı görülmüştür (Şekil 4.7). Bu durum bazı maddelerin agara difüze olmakta zorlandığı düşüncemizi desteklemektedir.

Bu çalışma ile toprak solucanlarının sölom sıvısında çeşitli bakteri türleri üzerinde antibakteriyel ve hemolitik etkili maddelerin var olduğunu görmekteyiz. Çalışmamızın sonucunda, toprak solucanlarının humoral savunma mekanizmalarında muhtemelen türsel ve yaşama alanları bakımından ciddi farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan üç bölgeden toplanan solucanların tür tayinini ile bu farklılığın kesin nedeni anlaşılacaktır.

KAYNAKÇA

- ADAMOWICZ, A., WOJTASZEK, J., 2001, Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena venata* (Lumbricidae), *Zoologica Poloniae* 46 (1 - 4), 91 -104
- AYDİLEK, S., 2005, *Toprak solucanlarından elde edilen sölom sıvılarının çeşitli hücreler üzerine etkisi*, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
- BAKTI, I.R., SURI, F.D., AGOES, A., 2003, The antibacterial potency of *Pontoscolex corethrurus* fr mull earth worm extract on *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli* growth, *The Journal of The Indonesian Medical Association (JIMA)*, 4(1), 444-454
- BESCHIN, A., BILEJ, M., FILIP, H., RAYMAKERS, J., DYCK, E., REVETS, H., BRYNS, L., GOMEZ, J., BAETSELIER, P., TIMMERMANS, M., 1998, Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (38), 24948-24954
- BILEJ, M., TUCKOVA, L., REJNEK, J., VETVÍCKA, V., 1990, In vitro antigen-binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida), *Immunology Letters*, 26, 183-188
- BILEJ, M., BAETSELIER, P.D., DIJCK, E.V., STIJLEMANS, B., COLIGE, A., BESCHIN, A., 2001, Distinct carbohydrate recognition domains of invertebrate defense molecule recognize Gram negative and Gram positive bacteria, *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45840 - 45847
- BORGES, S., HUBERS, H., BAYRON, R., 2003, In search for an appropriate species vermicomposting in Puerto Rico, *Coribbean Journals of Science*, 39 (2), 248-250
- CANELLAS, L.P., OLIVERAS, F.L., OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L., FAÇANHA, A.R., 2002, Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize root, *Plant Physiology*, 130, 1951-1957
- CHO, J.H., PARK, C.B., YOON, Y.G., KIM, S.C., 1998, Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 67-76

- COOPER, E.L., 2002, Comparative immunology, *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110
- COOPER, E.L., ROCH, P., 2003, Earthworm immune competence, *Pedobiologia*, 47, 1-13
- COSSARIZZA, A., COOPER, E. L., SUZUKI, M. M., SALVIOLI, S., CAPRI, M., GRI, G., QUAGLINO, D., FRANCESCHI, C., 1996, Earthworm leukocytes that are not phagocytic and crossreact with several human epitopes can kill human tumor cell lines, *Experimental Cell Research* 224, 174–182
- ÇOTUK, A, 1978, *Solucan ekstraktının sıçanda sarkoma tipi tümör üzerine etkisi*, İ. Ü. Fen Fakültesi
- ÇOTUK, A, DALES, P.R., 1984a, The effect of the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* sav. on certain bacteria and the role of the coelomocytes in internal defence , *Comparative Biochemical Physiology*, 78A (2), 271 - 275
- ÇOTUK, A., DALES, R.P., 1984b, Lysozyme activity in the coelomic fluid and coelomocytes of the earthworm *Eisenia foetida* sav. in relation to bacterial infection, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78A(3), 469 – 474
- DAANE, L. L., HAGGBLOM, M. M., 1999, Earthworm egg capsules as vectors for the environmental introduction of biodegradative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6), 2376–2381
- DUBILIER, N ., GIÈRE, O . , DISTEL , D . L . , CAVANAUGH , C . M . , 1995, Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta, Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (6), 2346-2350
- ENGELMANN, P., KISS, J., CSONGEI, V., COOPER, E.L., NEMETH, P., 2004a, Earthworm leukocytes kill HeLa, Hep-2, PC-12 and PA-317 cells in vitro, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61, 215-227
- ENGELMANN, P., MOLNAR, L., PALINKAS, L., COOPER, E.L., 2004b, Earthworm leukocyte populations specifically harbor enzymes that may respond to bacterial challenges, *Cell Tissue Researches*, 316, 391-401
- ENGELMANN, P., PALINKAS, L., COOPER, E.L., NEMETH, P., 2005, Monoclonal antibodies identify four distinct Annelid (Invertebrate) leukocyte marker, *Development Comparative Immunology*, 29 (7), 577-614
- EVANS, E.E., CUSHING, J.E., EVANS, M.L., 1973, Comparative immunology sipunculid bactericidal responses, *Infection and Immunity*, 8(3), 355 - 359

- EUE, I., KAUSCHKE, E., MOHRIG, W., COOPER, E. L., 1998, Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins, *Developmental and Comparative Immunology*, 22 (1), 13-25
- FIELD, S.G., KURTZ, J., COOPER, E.L., MICHIELS, N.K., 2004, Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms, *Journal of Invertebrate Pathology*, 86, 45-49
- FISCHER, O.A., MATLOVA, L., BARTL, J., DVORSKA, L., SVASTOVA, P., MAINE, R., MELICHAREK, I., BARTOS, M., PAVLIK, I., 2003, Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria, *Veterinary Microbiology*, 91, 325-338
- FISK, M.C., FAHEY, T.J., GRAFFMAN, P.M., BOHLEN, P.J., 2004, Earthworm invasion fine-root distribution and soil respiration in North temperate forest, *Ecosystems*, 7, 55-62
- FONTT, E.O., BESCHÏN, A., DIJCK, E.V., VERCRUYSSSE, V., BILEJ, M., LUCAS, R., BAETSELIER, P.D., VRAY, B., 2002, *Trypanosoma cruzi* is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Eisenia foetida foetida*, *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 27-34
- FURLONG, M. A., SINGLETON, D. S., COLEMAN, D. C., WHITMAN, W. B., 2002, Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1265–1279
- FUSHITANI, K., RIGGS, A.F., 1988, Non- heme protein in the giant extracellular hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry*, 85, 9461 - 9463
- GRĐISA, M., POPOVIC, M, HRZENJAK, T., 2001, Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 128, 821-825
- HANUSOVA, R., BILEJ, M., BRYŠ, L., BAETSELIER, P.D., BESCHÏN, A., 1999a, Identification of a ceolomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm, *Immunology Letters*, 65, 203-211
- HANUSOVA, R., TUCKOVA, L., HALADA, P., BEZOUSKA, K., BILEJ, M., 1999b, Peptide fragments induce a more rapid immune response than intact proteins in earthworms, *Developmental and Comparative Immunology*, 23, 113-121
- HOMA, J.O., NIKLINSKA, M., PLYTYCZ, B., 2003, Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allophora chlorotica*, *Pedobiologia*, 47, 1 – 6

- HORN, M.A., SCHRAMM, A, DRAKE, H.L., 2003, The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1662-1669
- KALAÇ, Y., 1991, *Dendrobaena venata* ve *Eisenia foetida* (Oligochaeta Lumbricidae) türlerinde bakteri infeksiyonuna yanıt, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
- KALAÇ, Y, ÇOTUK, A., 1992, Haemagglutinins and haemolysins in the coelomic fluid of *Dendrobaena venata* (Oligochaeta Lumbricidae), *Turk J., Med Biol. Res.*, 3, 315 - 320
- KALAÇ, Y., 1997, *Dendrobaena venata* (Oligochaeta Lumbricidae)'da bakteri infeksiyonuna hücre sel ve humoral yanıt, Doktora Tezi , İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
- KATO, Y., 1995, Humoral defense of the nematode *Ascaris suum*: Antibacterial, bacteriolytic and agglutinating activities in the body fluid, *Zoological Science*, 12, 225-230
- KAUSCHKE, E., PAGLIARA, P., STABILI, L., COOPER, E.L., 1997, Characterization of proteolytic activity in coelomic fluid of *Lumbricus terrestris* L. (Annelida, Lumbricidae), *Comparative biochemical physiology*, 116B (2) , 235 - 245
- KOBAYASHI, H., OHTOMI, M., SEKIZAWA, Y., OHTA, N., 2001, Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates; probable role of sphingomyelin, *Comparative Biochemistry and Physiology*, C128 , 401 - 411
- KOENIG, S., WAGNER, F., KAUSCHKE, E., KATALINIC, J.P., COOPER, E.L., EUE, I, 2003, Mass spectrometric analyses of CL₃₉, CL₄₁ and H₁, H₂, H₃ confirm identity with fetidin and lysenin produced by earthworm leukocytes, *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 513 - 520
- KOHLEROVA, P., BESCHIN, A., SILEROVA, M., BAETSELIER, P.D., BILEJ, M., 2004, Effect of experimental microbial challenge on the expression of defense molecules in *Eisenia foetida* earthworm, *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 701-711
- LANGE, S., NUBLER, F., KAUSCHKE, E., LUTSCH, G., COOPER, E.L., HERRMANN, A., 1997, Interaction of earthworm hemolysin with lipid membranes requires sphingolipids, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20884-20892
- LANGE, S., KAUSCHKE, E., MOHRING, W., COOPER, E.L., 1999, Biochemical characteristics of eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms, *Eur. J. Biochem.* , 262, 547-556

- LIN, W., ZHANG, H., BECK, G. 2001, Phylogeny of natural cytotoxicity: cytotoxic activity of coelomocytes of the purple sea urchin, *Arbacia punctulata*, *Journal of Experimental Zoology*, 290, 741-750
- LIU, Y.Q., SUN, Z.J., WANG, C., LI, S.J., LIU, Y.Z., 2004, Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(4), 297-302
- MATTHIES, C., GRIEBHAMMER, A., SCHMITTROTH, M., DRAKE, H. L., 1999, Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms obtained from garden and forest soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8), 3599–3604
- MILOCHAU, A., LASSEGUES, M., VALEMBOIS, P., 1997, Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337, 123 - 132
- NEILSON, R., BOAG, B., 2003, Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland, *Pedobiologia*, 47, 1-8
- PAN, W., LIU, X., G.E. F., ZHENG, T., 2003, Reconfirmation of antimicrobial activity in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida andrei* by colorimetric assay, *J. Biosci.*, 28 (6), 723 - 731
- PEETERS-JORIIS, C., 2000, The lysosomes of earthworm chloragocytes: biochemical and morphological characterization, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 126, 323-340
- ROCH, P., COOPER, E.L., 1991, Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by aroclor 1254, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22, 283 - 290
- SAUVE, S., FOURNIER, M., 2003, Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, , 1-6
- SCHINDLER, A., 2004, The innate immune response in *Eisenia fetida* to microbial challenges, *Journal of Undergraduate Research*, 1-11
- SCULLION, J., GOODACRE, R., ELLIOTT, G., HUANG, W., HILARY, W., GWYNN-JONES, D., GRIFFITH, G., DARBY, R., BAILEY, M., CLEGG, C., DRAPER, J., 2003, Food quality and microbial succession in ageing earthworm casts: standard microbial indices and metabolic fingerprinting, *Pedobiology*, 47, 1-7
- SHIPITALO, M. S., NUUTINEN, V., BUTT, K.R., 2004, Interaction of earthworm burrows and cracks in a clayey, subsurface – drained soil, *Applied Soil Ecology*, 26, 209 - 217

- SIEKIERSKA, E., 2003, Cadmium effect on the structure of supra- and subpharyngeal ganglia and the neurosecretory processes in earthworm *Dendrobaena venata* (Rosa), *Environmental Pollution*, 126, 21-28
- SINGLETON, D.R., HENDRIX, P.F., COLEMAN, D.C., WHITMAN, W.B., 2003, Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta), *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 1547-1555
- SUZUKI, M.M., COOPER, E.L., 1995, Spontaneous cytotoxic earthworm leukocytes kill K562 tumor cells, *Zool. Sci.*, 12, 443-451.
- TASIEWSKI, A., VANDENBULCKE, F., MITTA, G., LEMOINE, J., LEFEBVRE, C., SAUTIERE, P.E., SALZET, M., 2004, Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an Annelid the Leech *Theromyzon telesutatum*, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 30973-30982
- TOMLIN, A.D., 2004, *Earthworm biology* [Online], Pest Management Research Center, http://res2.agr.ca/london/faq/tomlin02_e.htm [Ziyaret Tarihi : 18 Ekim 2004]
- TUCKOVA, L., BILEJ, M., 1994, Antigen processing in earthworms, *Immunology Letters*, 41, 273-277
- VALEMBOIS, P., PHILIPPE, R., LASSEGUES, M., CASSAND, P., 1982a, Antibacterial activity of the hemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 40, 21-27
- VALEMBOIS, P., ROCH, P., LASSEQUES, M., DAVANT, N., 1982b, Bacteriostatic activity of a chloragogen cell secretion, *Pedobiologia*, 24, 191-194
- VINOGRADOV, S.N., LUGO, S.D., MAINWARING, M.G., KAPD, O.H., CREWE, A.V., 1986, Bracelet protein: A quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry*, 83, 8034 – 8038
- WIECZOREK-OLCHAWA, E., NIKLINSKA, M., MIEDZOBRODZKI, J., PLYTYCZ, B., 2003, Effect of temperature and soil pollution on the presence of bacteria, coelomocutes and brown bodies in coelomic fluid of *Dendrobaena venata*, *Pedobiologia*, 47, 1-8
- YU, X., CHENG, J., WONG, M., 2004, Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass, *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (2), 195-201
- ZACHMANN, J.E., MOLINA, J.A.E., 1993, Presence of culturable bacteria in cocoons of the earthworm *Eisenia fetida*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1904-1910

ZHU, H., OWNBY, D.W., RIGGS, C.K., NOLASCO, N.J., STOOPS, J.K., 1996,
Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*, *The
Journal of Biological Chemistry*, 271 (47), 30007-30021

ÖZGEÇMİŞ

01.04.1981 tarihinde Karabük’de doğdum. İlköğrenimimi 1986-1991 yılları arasında Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu’nda tamamladım. 1991-1994 yılları arasında Kazım Karabekir İlköğretim Okulu’nda orta öğretimimi, 1994-1997 yılları arasında Bakırköy Sabri Çalışkan Lisesi’nde ortaöğrenimim tamamladım. 1997-2001 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimimi tamamladım. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Genel Biyoloji Programı’na başladım.

BİLİMSEL ETKİNLİKLER:

2001-2002 Yılları arasında İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenen “Çeşitli Stres Koşullarının *Schizosaccharomyces pombe*’de İnvertaz Aktivitesine Etkileri” isimli öğrenci projesi yürütücülüğü

Elif Özlem ARSLAN, 2001, Çeşitli Stres Koşullarının *Schizosaccharomyces pombe*’de İnvertaz Aktivitesine Etkileri , Poster Bildiri, 10-13 Ekim 2001, 8. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi , Ankara