

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**SU VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN BİYOTEKNOLOJİK
POTANSİYELE SAHİP *BDELLOVİBRIO* VE BENZERİ
ORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE FİLOGENETİK OLARAK
TANIMLANMASI**

Dilek ŞEKER

**Danışman
Prof. Dr. A. Üsame TAMER**



MANİSA-2019

Diiek ŞEKER

SU VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYELE SAHİP *BDELLORIBRIO* VE
BENZERİ ORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE FİLOGENETİK OLARAK TANIMLANMASI

2019

TEZ ONAYI

Dilek ŞEKER tarafından hazırlanan "**Su ve Toprak Örneklerinden Biyoteknolojik Potansiyele Sahip *Bdellovibrio* ve Benzeri Organizmaların İzolasyonu ve Filogenetik Olarak Tanımlanması**" adlı tez çalışması **15/11/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuş ve oybirliği ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman **Prof. Dr. A. Üsame TAMER**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. İhsan YAŞA**

Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Mustafa OSKAY**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Evrim ÖZKALE**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN**

Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Dilek ŞEKER

15.11.2019



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. BALO (<i>Bdellovibrio</i> ve Benzeri Organizmalar) Genel Özellikleri.....	4
2.2. Taksonomi.....	6
2.2.1. <i>Bdellovibrionaceae</i>	7
2.2.2. <i>Bacteriovoracaceae</i>	9
2.2.3. <i>Halobacteriovoraceae</i>	9
2.2.4. <i>Micavibrio</i>	10
2.3. Yaşam Döngüsü.....	11
2.3.1. Hareketlilik ve Konak Hücreyi Bulma.....	12
2.3.1.1. Kemataksis.....	12
2.3.2. Konak Hücreye Bağlanma.....	13
2.3.3. Konak Hücre İnvazyonu ve Bdelloplast Oluşumu.....	14
2.3.4. Büyüme ve Bölünme.....	15
2.3.5. Bdellokist.....	16
2.4. Konak Hücreden Bağımsız BALO.....	16
2.5. Hücre Döngüsünün Genetiği.....	18
2.5.1. Faz Geçişi.....	18
2.5.2. Genetik, Genomiks ve Post Genomiks.....	18
2.6. Taşıma.....	19
2.7. Litik Enzim Aktiviteleri.....	20
2.8. Enerji Metabolizması.....	21
2.9. Habitat ve Ekoloji.....	22
2.10. Uygulamalar.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Su ve Toprak Numuneleri.....	31
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar.....	32
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	40
3.1.4. Bakteri Kültürleri.....	40
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Atık Su Numunelerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametrelerinin Eldesi... ..	42
3.2.2. <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşlarının Aktive Edilmesi.....	42
3.2.3. Konak Bakterilerin Aktive Edilmesi.....	43
3.2.3.1. Konak Bakterilerin Stok Kültürlerinin Hazırlanması.....	44
3.2.3.2. Konak Bakterilerin Absorbans Değerlerinin Belirlenmesi.....	44
3.2.3.3. BALO İzolasyonu için Konak Bakterilerin Hazırlanması.....	44

3.2.4. Diferansiyel Santrifüjleme ve Filtrasyon ile BALO İzolasyonu (Çift Katmanlı Agar Plaka Deneyi).....	45
3.2.4.1. Saflaştırma Deneyi.....	45
3.2.4.2. Lizat Deneyi.....	46
3.2.4.3. Litik Plaklar ile Biyokontrol Deneyi.....	46
3.2.4.4. Litik Plakların Sayımı.....	46
3.2.4.5. BALO'ın Gliserol Stoklarının Hazırlanması.....	46
3.2.5. Litik Plakların Faj Kaynaklı Olup-Olmadığının Belirlenmesi.....	47
3.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	47
3.2.7. Moleküler Sistemik Çalışmalar.....	47
3.2.7.1. BALO Genomik DNA'larının İzolasyonu.....	47
3.2.7.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi.....	48
3.2.7.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu.....	49
3.2.7.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	52
4.1. Araştırma Bulguları.....	52
4.1.1. Atık Su Numunelerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreleri.....	52
4.1.2. <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşlarının Aktive Edilmesi.....	52
4.1.3. Konak Bakterilerin Aktive Edilmesi.....	54
4.1.3.1. Konak Bakterilerin Absorbans Değerleri.....	55
4.1.4. Diferansiyel Santrifüjleme ve Filtrasyon ile BALOs İzolasyonu (Çift Katmanlı Agar Plaka Deneyi).....	56
4.1.4.1. Saflaştırma Deneyi.....	60
4.1.4.2. Lizat Deneyi.....	61
4.1.4.3. Litik Plaklar ile Biyokontrol Deneyi.....	62
4.1.4.4. Litik Plakların Sayımı.....	63
4.1.5. Litik Plakların Faj Kaynaklı Olup-Olmadığının Belirlenmesi.....	63
4.1.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	64
4.1.7. Moleküler Sistemik Çalışmalar.....	65
4.1.7.1. BALO Genomik DNA'larının İzolasyonu.....	65
4.1.7.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi.....	66
4.1.7.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu.....	67
4.1.7.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramın Oluşması.....	68
4.2. Tartışma.....	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrad derece
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
ATP	Adenozintrifosfat
BALO	<i>Bdellovibrio</i> ve benzeri organizmalar
EPS	Ekzopolisakkarit
DAP	Diaminopimelik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
g/L	Gram/litre
gr	Gram
kob/g	Koloni oluşturan birim/gram
kob/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
L	Litre
LPS	Lipopolisakkarit tabakası
M	Molarite
mL	Mililitre
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
PHA	Polihidroksialkanoatlar
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
rpm	Dakikada dönüş hızı (round per minute)

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> 100 Elektron Mikroskopi Görüntüsü.....	4
Şekil 2.2. BALO'nun Predatör Stratejileri.....	11
Şekil 2.3. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> 'un Yaşam Döngüsü.....	12
Şekil 3.1. Manisa Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisinin Genel Görünümü.....	31
Şekil 3.2. Toprak Örneklerinin Alındığı Balıkesir Burhaniye/Ören Mevkisinin Görünümü.....	32
Şekil 3.3. Toprak Örneklerinin Alındığı Diğer Lokaliteler	32
Şekil 4.1. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşu ve Konak Hücrelerin Sayılarının Belirlenmesi (1).....	53
Şekil 4.2. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşu ve Konak Hücrelerin Sayılarının Belirlenmesi (2).....	53
Şekil 4.3. Aktifleştirilen <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşu ve Konak <i>E.coli</i> ML35.....	54
Şekil 4.4. <i>Bdellovibrio</i> sp. Suşunun ve Konak Bakterilerin Bulunduğu Tüplerden Yapılan Preparatların Işık Mikroskobisi Görüntüsü.....	54
Şekil 4.5. Eozin Metilen Blue Agarda <i>E.coli</i> (ATCC 29998) (A) ve <i>E.coli</i> ML35 (B), Ceftrimide Agarda <i>Pseudomonas aureginosa</i> (C) ve King B Agarda <i>Erwinia amylovora</i> (D) Suşları.....	55
Şekil 4.6. Konak Bakterilerin Işık Mikroskobunda 100x Büyütmede Görüntüsü....	55
Şekil 4.7. İzolasyonda Litik Plakların Çaplarının Artışı.....	56
Şekil 4.8. İzolasyonda Kullanılan Katı Besiyerleri.....	57
Şekil 4.9. Toprak Numunesi ile İzolasyon Sonuçları.....	57
Şekil 4.10. Atık Su Numuneleri ile İzolasyon Sonuçları (1).....	58
Şekil 4.11. Atık Su Numuneleri ile İzolasyon Sonuçları (2).....	58
Şekil 4.12. Atık Su Numunesinden Yapılan İzolasyonlarda Elde Edilen Seyreltme Oranları	59
Şekil 4.13. Atık Su Numunelerinden İzole Edilen Litik Plaklar (1).....	60
Şekil 4.14. Atık Su Numunelerinden İzole Edilen Litik Plaklar (2).....	60
Şekil 4.15. İzolasyon ve Safılaştırma Sonucu Elde Edilen Litik Plakların Karşılaştırması.....	61
Şekil 4.16. HM Ortamında Elde Edilen Lizatlar.....	61
Şekil 4.17. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak Konak-Predatör Bakterilerin Litik Aktivite İlişkisi.....	62
Şekil 4.18. Litik Plakların Farklı Konak Bakterilere Karşı Biyokontrol Deney Sonuçları.....	63
Şekil 4.19. Atık Su Numunelerinden İzolasyonlar Sonucu Litik Plakların Mevsimsel Olarak Dağılımı.....	63
Şekil 4.20. Atık Su Numunelerinden İzolasyon Sonucu Oluşan Muhtemel Faj Litik Plakları.....	64
Şekil 4.21. Konak ve Predatör Bakterinin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Görüntüsü.....	65
Şekil 4.22. Bazı BALO İzolatlarından Elde Edilen DNA Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.....	66
Şekil 4.23. Bazı BALO İzolatlarından Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.....	68
Şekil 4.24. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin <i>Bdellovibrio</i> sp., <i>Bacteriovorax</i> sp. ve <i>Peredibacter</i> sp. Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri.....	71
Şekil 4.25. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Kendi Aralarındaki Evrimsel İlişkileri	72

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. BALO Türlerinin Bazı Karakteristik Özellikleri.....	8
Tablo 3.1. Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Markaları.....	40
Tablo 3.2. DNA Bölgesinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primerler.....	49
Tablo 3.3. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları.....	50
Tablo 3.4. PCR ile Ürün Eldesi İçin Belirlenen Koşullar.....	50
Tablo 4.1. 2018-2019 Yılları Arasında Örnekleme Yapılan İstasyonla İlgili Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreler.....	52
Tablo 4.2. Konak Bakterilerin Absorbans Değerlerine Karşılık Gelen Hücre Sayıları.....	56
Tablo 4.3. İzolatların Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflık Oranı.....	67
Tablo 4.4. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası Verileri ile Karşılaştırılması.....	69
Tablo 4.5. Strainlerin Nükleotit Frekansları ve Toplam Nükleotit Sayıları.....	73



TEŞEKKÜR

Araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü yardım ve desteğini esirgemeyerek, pratik ve teorik olarak tüm bilgi birikimlerini aktaran, kıymetli Danışman hocam Prof. Dr. A. Üsame TAMER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni araştırmaya teşvik eden, laboratuvar çalışmalarına ilgi göstererek yönlendiren ve gözlemleyerek çeşitli önerilerde bulunan Sayın hocam Prof. Dr. Mustafa OSKAY'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca beni araştırma konusunda sürekli bilgilendiren, yönlendiren ve her daim ilgilenen Sayın hocam Prof. Dr. İhsan YAŞA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, ömür boyu ihtiyaç duyacağım desteklerini her an hissettiğim aileme çok teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi tarafından, Bilimsel Araştırma Projeleri BAP (2015-102) ve BAP (2017-230) kapsamında desteklenmiştir. Teşekkür ederim.

Dilek ŞEKER
Manisa, 2019

ÖZET

Doktora Tezi

Su ve Toprak Örneklerinden Biyoteknolojik Potansiyele Sahip *Bdellovibrio* ve Benzeri Organizmaların İzolasyonu ve Filogenetik Olarak Tanımlanması

Dilek ŞEKER

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Üsâme TAMER

BALO (*Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar) genellikle gram negatif ve bazı durumlarda gram pozitif bakterileri avlayarak hayatta kalabilen zorunlu predatörlerdir. Bu predatör mikroorganizmalar, her konak bakteriyi başarılı şekilde avlayamadıkları için, habitatlarından alınan örneklerden yapılan izolasyonlarda tüm popülasyon üyeleri belirlenmemektedir. Ancak farklı ortamlarda birçok patojen bakteriye karşı predasyon sergiledikleri bilinmektedir. Bu çalışma, BALO'nun su ve toprak numunelerinden izolasyonunu ve tanımlanmasını kapsamaktadır.

Belli zaman aralıklarında topraktan ve Manisa Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisinin farklı kısımlarından (ön çökeltim çıkış suyu, atık su arıtma tesisi giriş suyu ve geri devir pompa suyu) atık su örneklemeleri yapılarak, bu örneklerden diferansiyel santrifüjleme ve filtrasyon işlemlerinin uygulanması ile çift katmanlı agar plaka yöntemiyle BALO izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Toprak numunelerinden yapılan tüm izolasyonlarda predatör bakteri varlığı tespit edilememiştir. İzolasyonlar için kullanılan 8 farklı konak bakteriler; *E.coli* ML35, *E.coli* S17, *E.coli* ATCC 29998, *E.coli* DH5 α , *E.coli* Stb13, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Erwinia amylovora* olup, en verimli litik plak oluşumu *E.coli* ML35'e karşı gözlemlenmiştir (*Pseudomonas aureginosa* hariç). Seyreltme plaka yöntemiyle mevsimsel olarak litik plakların sayısının, sırasıyla en çok yazın (4.5×10^3 pfu/mL), en az ise kışın (1.4×10^2 pfu/mL) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *E.coli* ML35'e karşı litik plak oluşturan predatör bakterilerin diğer konak bakterilerle ilişkisi belirlenmiştir. Katı ve sıvı ortamda yapılan denemelerde predatör bakteri üyeleri (*Bdellovibrio* sp., *Bacteriovorax* sp., ve *Peredibacter* sp.)'nden sadece *Bdellovibrio* sp. ve *Bdellovibrio bacteriovorus* bazı konak bakterilere karşı litik plak oluşturabilmiştir. Aynı zamanda predatör bakteri-konak ilişkisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile görüntülenerek doğrulanmıştır.

Farklı litik plaklardan alınan örneklerden predatör bakterilerin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, spesifik 4 farklı primer seti (BbsF216, BbsR707, Bac676F, Bac1442R, Per676F, Per1443R, Mic431F, Mic996R) kullanarak PCR ile 16S rRNA ürünleri elde edilmiştir. PCR ürünlerinin sekans analizleri yapıldıktan ve elde edilen verilerin düzenlenmesinden sonra gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Toplamda 25 predatör bakterinin sekans verilerinin karşılaştırılmasıyla, %56'sının *Peredibacter* sp., %28'inin *Bdellovibrio bacteriovorus*, %8'inin *Bdellovibrio* sp. ve %8'i ise *Bacteriovorax* sp. olarak tanımlanmış ve filogenetik dendogramları oluşturulmuştur.

Sonuç olarak BALO izolasyonu ve tanımlanmasıyla ülkemizin predatör bakteri çeşitliliğine katkıda bulunulmuştur. Bu predatör bakterilerin ilerde yapılacak olan farklı biyoteknolojik araştırmalarda ve özellikle de patojen bakterilerin biyokontrolünde kullanılabileceği varsayılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Atık su, BALO, *Bdellovibrio* sp., filogenetik ağaç, predasyon, predatör bakteri.

2019, 110 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

Isolation and Phylogenetic Identification of *Bdellovibrio* and Like Organisms with Biotechnological Potential from Water and Soil Samples

ŞEKER Dilek

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. TAMER A. Üsâme

BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms) are obligate predators that are usually able to survive by preying on gram-negative and in some cases gram-positive bacteria. Because these predator microorganisms can't successfully hunt every host bacteria, all population members cannot be identified in isolation from samples taken from their habitats. However, it is known that they exhibit predation against many pathogenic bacteria in different environments. This study include the isolation and identification of BALOs from water and soil samples.

At certain time intervals samples from soil and wastewater of different parts of Manisa Saruhanlı Wastewater Treatment Plant (pre-sedimentation effluent, wastewater treatment plant influent, return pump water), BALOs isolations from these samples were performed by applying differential centrifugation and filtration processes with double layer agar plate method. The presence of predatory bacteria could not be detected in all isolations from soil samples. The eight different host bacteria used for isolations were; *E.coli* ML35, *E.coli* S17, *E.coli* ATCC 29998, *E.coli* DH5a, *E.coli* Stbl3, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *Erwinia amylovora*, and the most efficient lytic plaque formation observed against *E. coli* ML35 (except *Pseudomonas aureginosa*). As a result of counting the lytic plaques seasonally by dilution plate method, it was determined that they most occurred in summer (4.5×10^3 pfu/mL) and at least in winter (1.4×10^2 pfu/mL). Furthermore, the interactions of predator bacteria formed lytic plaque against *E. coli* ML35 have been determined against other host bacteria. In agar and broth experiments, from predator bacteria members (*Bdellovibrio* sp., *Bacteriovorax* sp. and *Peredibacter* sp.) only *Bdellovibrio* sp and *Bdellovibrio bacteriovorus* were able to form lytic plaque against some host bacteria. At the same time, the predator bacteria-host relationship has been confirmed by imaging them with scanning electron microscopy (SEM).

DNA isolation of predator bacteria was performed from samples taken from different lytic plaques and 16S rRNA products were obtained by PCR using 4 different primer sets (BbsF216, BbsR707, Bac676F, Bac1442R, Per676F, Per1443R, Mic431F, Mic996R). After sequence analysis of the PCR products and editing of the obtained data that compared with the data in the gene bank was performed. Comparing sequence data of a total of 25 predator bacteria were identified as *Peredibacter* sp. (56%), *Bdellovibrio bacteriovorus* (28%), *Bdellovibrio* sp. (8%) and *Bacteriovorax* sp. (8%) and constructed the theirs phylogenetic dendograms.

As a result of the study, by isolation and identification of BALOs contributed to the predator bacterial diversity of our country. It is assumed that these predator bacteria may be used for future different biotechnological research and in particular biocontrol of pathogenic bacteria.

Keywords: BALOs, *Bdellovibrio* sp., phylogenetic tree, predation, predator bacteria, wastewater.

2019, 110 pages.

1. GİRİŞ

Predasyon, ekosistemde bir predatörün enerji ve biyosentetik materyallerini bir konaktan alarak, onun ölümü pahasına yaşamını sürdürdüğü eşsiz bir etkileşimdir [1]. Konak-predatör ilişkileri doğanın en eski ve en önemli ilişkisidir [2]. Yaşamın hemen her seviyesinde gözlenmektedir. Yaşam alanı ölçekleri boyunca organizmalar arasındaki ortak bir ilişki şeklindedir [3]. Ayrıca popülasyonun yapısını şekillendiren, yaşamın çeşitliliği ile gelişimini yönlendiren önemli ekolojik bir güçtür [4] ve ekolojik araştırmalar için merkezi bir konudur. Bir konak-predatör etkileşiminin gelişimini anlamak, bir veya her iki türün zaman içinde birden fazla özelliğinin potansiyel dinamiklerine ilişkin tanımlamaya olanak sağlar [5].

Predasyon, konağın kaçma stratejilerinin seçilmesi ve predatörün etkinliğinin artırılması ile birlikte önemli bir evrimsel güçtür [6]. Bakteriye predasyonun evrimsel geçişlerde oynadığı kritik rolün önemli bir örneği, mitokondriyenin endosimbiyozla evrimidir [7]. Mitokondriyenin atalarının α -proteobakteri olduğu kabul edilir [8]. Günümüz ileri teknolojik bilgilerine göre, *Rickettsiales* bu organelin en yakın akrabalarıdır [9] ve bilinen tüm üyeleri, ökaryotların zorunlu hücre içi paraziti veya simbiyontlarıdır [10]. Bununla beraber, *Ixodes* keneleri yumurtalık dokularında bir mitokondri predatörü (*Bdellovibrio* ve benzeri organizmaları (BALO) taşımaktadır ve bu bakteriler *Rickettsiales* ile yakından ilişkilidir [11]. Böylece predatör bakterilerin mitokondriyal endosimbiyozun kökeni olabileceği hipotezinin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır [3].

Predatörler genellikle doğal ekosistemin kilit taşı olan türlerdir [2]. Bu mikroorganizmalar bakteriyofajlar da dahil edilirse, yaklaşık sekiz ordo altında toplanır. Bu grubun en altında virüsler ile predatör bakteriler bulunur ve bu mikroorganizmalar genellikle konaktan daha küçüktürler. Halbuki diğer seviyelerde bulunan predatörlerde bu durumun tersi görülmektedir. Örneğin; protozoalar, bakteri olan konaklarından daha büyüktür. Ökaryot ve prokaryot predatör mikroorganizmalar arasındaki farklılığın altında yatan temel neden fagositozdur. Predatör ökaryotlar gibi fagositoz yapabilen hücreler, kendilerinden daha küçük hücreleri avlarlar. Halbuki, prokaryotlar gibi fagositoz yapamayan hücreler için predasyon, küçük bir predatör hücrenin büyük bir konağın yüzeyine etkili bir şekilde yapışması ile gerçekleşir. Bazı prokaryot predatörlerin bir başka özelliği ise yüksek motilitesidir. Büyük organizmalar genellikle küçük olanlardan daha hızlıdır, fakat

Bdellovibrio ve benzeri organizmalar (BALO) gibi paradoksal olarak küçük bakteriyel predatörler en hızlı yüzücülerdir [12]. Küçük bir hücre boyutunun, hızlı ve çok aktif hareketliliğe olanak sağlayacağı düşünülmektedir [13].

Predasyon bakteriler arasında uzun zamandır bilinmekte ise de tanımlanan etkileşimler fakültatif şeklindedir [14]. Çoğunlukla, mikrobakteriyel sistemler bu tür bir etkileşim için “rol model” olarak görülmektedir. Bununla birlikte, bu bakterilerin sergilediği tuhaf ve büyüleyici davranış nedeniyle, predasyon genellikle bu sistemlerde araştırılmıştır [6]. Bakteriyel predasyon üç temel stratejiye ayrılmaktadır: predatörlerin iki yavru hücreye bölünmeden önce, konağını tüketirken konak hücresi çeperine bağlı kaldıkları epibiyotik predasyon; bir bireysel predatör hücrenin, periplazmik boşluğa (periplazmik predasyon) veya sitoplazmaya (direkt invazyon) girebilmek için, konak hücresi çeperini delen ve modifiye eden hidrolitik enzimleri salgıladığı endobiyotik predasyon ve konak hücrelerini parçalamak için hidrolitik enzimler ile ikincil metabolitleri üretmek için bir predatör çekirdeğine ihtiyaç duyulan saldırı veya grup predasyonudur [15].

Predatörler, predasyon sırasında konağı öldürürler, bu yüzden predasyonda önemli bir mortaliteye neden olur [6]. Mikroorganizmalar arasındaki predatör etkileşimleri, birçok ekosistemde en büyük bakteriyel mortalite faktörü olarak görülmektedir [16]. Ekosistemde bakteriler; bakteriyofajlar, protistler ve predatör prokaryotların predasyonuna maruz kalırlar. Predatör prokaryotlardan bakteriler; virüsler ve fajların aksine canlı bir organizma olmaları ve protistlerin aksine avlarından daha küçük olmaları ile ayırt edilirler [1].

Predatör bakteriler, filogenetik olarak çok çeşitlidir; karasal ve sucul ortamlarda, her yerde bulunurlar ve mikrobiyal yapının bir parçasını oluşturdukları gözlenir [17]. Örneğin; arsenit oksitleyici biyofilmlerde, sıcak buhar travertenleri, arktik denizel tortularda, hiper-tuzlu sularda, anaerobik tabakalarda, sülfürlü göllerde obligat predatör bakteri olan *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalara (BALO) ilişkin 16S rDNA dizileri bulunmuştur [18].

Predatör bakterilerin en çok çalışılan grubu, δ -proteobakteri sınıfında yer alan *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar (BALO), 1962 yılında Stolp ve Petzold tarafından, toprak süspansiyonlarından fitopatojen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* organizmasının fajlarını izole etmeye çalışırken tesadüfen keşfedilmiştir

[19]. Bunu, 1960'larda, 1970'lerde ve 1980'lerdeki bu mikroorganizmaların fizyolojisi, ekolojisi, taksonomisi, konağı ile olan etkileşimleri ve hücre döngüsü hakkında yapılan çalışmalar takip etmiş, son zamanlarda ise modern moleküler biyoloji araştırmalarıyla genetik yapılarının aydınlatılması yönünde çalışılmaktadır.

Bdellovibrio ve benzeri organizmalar (BALO) küçük, çubuk ya da virgül şekilli, tek bir kılıflı flagellum ile yüksek hızda hareket edebilen, gram-negatif bakterilerdir. Bu bakteriyel cinsi benzersiz kılan predatör davranışlarıdır. Bu mikroorganizmalar genellikle gram negatif bakterilerin zorunlu predatörleridir. Genellikle diğer gram negatif hücrelere saldırarak, periplazmalarına nüfuz eder, sitoplazmalarında çoğalır ve sonunda hücre duvarlarını yeni bir başlangıç için patlatırlar. Saldırı fazı ile büyüme ve bölünme fazından oluşan dimorfik bir yaşam döngüsüne sahiptirler. Ayrıca konak hücreye bağımlı suşlarının haricinde, laboratuvar koşullarında konak hücreden bağımsız mutant suşları da izole edilebilir.

Bu çalışmada, Manisa ili içinde BALO (*Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar) suşlarının su ve toprak örneklerinden izole edilmesi, bu izolatların tanısı, bazı patojen bakterilere karşı biyokontrolde kullanılacak ve yeni gelişmeler ışığı altında ortaya çıkan biyoteknolojik potansiyelinin laboratuvar çapında ortaya konması amaçlanmıştır. Ülkemizde henüz izole edilmediği dikkate alındığında, mikrobiyoloji bilimi açısından önemli olan bu mikroorganizmaların izolasyonu ve bu grup bakteri türlerinin moleküler yöntemlerle tanısı, ülkemiz adına oldukça önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BALO (*Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar) Genel Özellikleri

Bdellovibrio ve benzeri organizmalar (BALO) olarak tanımlanan zorunlu predatörler, farklı familyalardan oluşurken, sadece δ -proteobakteriler sınıfında yer almaktadırlar. *Bdellovibrio* spp., *Bacteriovorax* spp., *Peredibacter* spp. ve *Halobacteriovorax* spp. hepsi δ -proteobakterilere aittir. Bununla birlikte, yeni bulgular, zorunlu predatörleri farklı proteobakteriyel sınıflarda bulunabileceğini göstermektedir. Bir α -proteobakteri olan *Micavibrio* son zamanlarda BALO olarak karakterize edilmiştir [3].

En fazla çalışılan predatör bakteri grubu olan *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar (BALO), 1962'de Stolp ve Petzold tarafından, toprak bakteriyofajlarının izole edilmesi sırasında tesadüfen keşfedilmiştir [20].



Şekil 2.1. *Bdellovibrio bacteriovorus* 100 Elektron Mikroskopi Görüntüsü (14,000 \times) [19].

Serbest yaşayan fazlarında BALO (0.25-0.5 \times 0.75-2 μ m); gram negatif, çubuk şekilli, tek bir kılıflı flagellum ile yüksek hızda hareket edebilen, küçük vibroid'dir. Bu flagellum tipik bir sönümlene dalga deseni sergiler [21]. Predatör mikroorganizmalardan *Bdellovibrio bacteriovorus*'un (Şekil 2.1.), tahmin edilen hızı, saniyede yaklaşık 100 hücre uzunluğundadır ki, bu da *E. coli* hücrelerinin hızının yaklaşık 10 katıdır [22]. Bu mikroorganizmalar aerobik ve mezofilik bakteriler olup, enerjisini amino asitlerin ve asetatların oksidasyonundan sağlamasının yanı sıra nükleotidleri, yağ asitlerini, peptidleri ve hatta bütün haldeki proteinleri parçalamaksızın doğrudan konak hücreden özümseyebilirler. Optimum büyüme sıcaklığı 28-30 $^{\circ}$ C'dir [23]. BALO aktivitesi, yüksek konsantrasyonlarda glukoz

veya gliserol gibi bazı kimyasalların varlığında ve ayrıca düşük pH'da da önemli ölçüde azalır [24]. Bununla birlikte, yabancı predatörlerin büyümesi ve çoğalması sadece konak hücrelerin varlığında gerçekleşebilir. Genellikle gram negatif bakterileri konak hücre olarak kullanırlar. Bu nedenle BALO zorunlu predatör prokaryotlardır [25]. Genelde saldırı fazı ile büyüme ve bölünme fazı olmak üzere iki evreli bir yaşam döngüsü gösterirler. Akselik döngü; konak hücre olmadığı zaman predatör hücrelerinin büyümesi ve bölünmesini ifade ederken, hücre içi döngü; predatör hücrelerin, konak hücre ile predasyonunu ifade eder [26]. Laboratuvar koşullarında, büyüme için zengin bir ortam gerektiren konak hücreden bağımsız mutantlar, yabancı tip suşlardan izole edilebilir [25]. Hem konak hücrede hem de besiyerlerinde gelişebilen fakültatif türleri de bulunur. [26].

BALO'nun izole edildikleri önemli habitatlar; kök toprağı [19], rizosfer [27], çeltik tarlası [28], deniz [29], körfez [30], tatlı ve tuzlu su göletleri [31], nehir ağzları [32], haliçler [33], deniz canlıları [34], kanalizasyon [35], insan ve hayvanların barsağı [36] ile yengeç solungaçlarıdır [34].

BALO suşlarının izolasyonlarında genellikle çeşitli gram negatif bakteriler konak hücre olarak kullanılmıştır [19]. Bu mikroorganizmaları izole etmek ve karakterize etmek için kullanılan konak hücreler neredeyse sadece *Proteobacteria* filumundandır. Yapılan çalışmalarda, predatör bakteri izolasyonu yapılan habitatın özelliğine göre konak hücrenin de değiştiği görülmektedir. Örneğin; rizosferden izolasyonda *Xanthomonas oryzae* [28], *Pseudomonas glycinea* [37], *Pseudomonas fluorescens* [27], *Rhizobium* spp. ve *Agrobacterium* spp. [38]; tatlı-tuzlu su göletlerinden ve su canlılarından izolasyonda *Aeromonas hydrophila* [36], *Vibrio parahaemolyticus* [30] ve *Legionella* spp. [31]; kanalizasyondan yapılan izolasyonda ise *Achromobacter* spp. [35], *E. coli*, *Salmonella* spp. [39], *Caulobacter crescentus* [40] kullanıldığı belirtilmiştir.

Stolp ve Starr (1963) tarafından yapılan çalışmada; bu predatör mikroorganizma grubundan *Bdellovibrio bacteriovorus*'un konak hücre olarak; *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Corynebacterium insidiosum*, *Corynebacterium poinsettiae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas polycolor*, *Acetobacter acetii*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Caulobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter*

atrocyaneus, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Bacterium stewartii*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Aeromonas* sp., *Rhizobium leguminosarum*, *Corynebacterium michiganense*, *Protaminobacter rubrum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Aerobacter cloacae*, *Pseudomonas caryophylli*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas phaseolicola*, *Pseudomonas tabaci*, *Pseudomonas fluorescens* gibi insan, hayvan ve bitkilerde patojen olabilen veya bazı ortamlarda saprofitik olarak yaşayan türleri kullandığı gösterilmiştir [19].

Araştırılması ve izolasyonu için yapılan çalışmalarda, bakteriyel virüs çalışmalarında kullanılan yöntemlere benzer yöntemler kullanılmaktadır [23]. Standart çift katmanlı izolasyon prosedürü kullanılarak çevresel örneklerden saptanan BALO sayısı, gram veya mililitre örnek başına onlarca ila on binlerce plak oluşturan birim olarak genellikle düşüktür. Buna göre, çevresel araştırmalardan kaynaklanan ve veri tabanlarında bulunan BALO ile ilişkili 16S rRNA sekanslarının sayısı da düşüktür (şu ana kadar 100'den az). Veritabanlarındaki bu sekansların azlığının sebebi, predatör bakterilerin dominant popülasyona sahip olmamasıyla beraber, DNA'larını çoğaltmak için kullanılan genel 16S rDNA primerleridir [18].

2.2. Taksonomi

Stolp ve Petzold (1962) tarafından izole edilen benzersiz bakteri kısa sürede yeni cins *Bdellovibrio*, tür *bacteriovorus* olarak tanımlanmıştır [19]. Bütün genom DNA-DNA hibridizasyon testlerine, G+C içeriklerine, rRNA homolojisine, enzim göç şekillerine ve genom tahmini boyutlarına dayanarak, cins üç türe ayrılmıştır: *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bdellovibrio stolpii* ve *Bdellovibrio starrii*. BALO; G+C oranlarında yüksek değişkenlik gösterse de, yağ asidi profilleri, serolojik reaksiyonlar, kısmi 16S rRNA dizileri ve DNA-DNA hibridizasyonları ile bazı suşlar arasında çok düşük değerler verdiği görülmüştür [41]. 16S rRNA analizlerine dayanılarak sınıflandırma değişmiştir: *Bdellovibrio stolpii* ve *Bdellovibrio starrii*, yeni cins olarak, *Bacteriovorax stolpii* [14], *Peredibacter starrii* [42] ve *Bacteriolyticum stolpii* [43] olarak sınıflandırılmıştır. Bu sıralarda yapılan çalışmalarda iki yeni tür daha, *Bacteriovorax marinus* ve *Bacteriovorax litoralis* tanımlanmıştır [44]. 16S rRNA gen sekanslarına dayanan filogenetik analize göre, *Bdellovibrio exovorus* tanımlanmıştır [40]. Son olarak *Bacteriovorax marinus* ve

Bacteriovorax litoralis, *Halobacteriovorax marinus* ve *Halobacteriovorax litoralis* olarak yeniden sınıflandırılmıştır [45]. *Micavibrio* sp. ise başta iki tür olarak tanımlanmıştır: *Micavibrio admirantus* ve *Micavibrio aeruginosavorus*'tur [46]. Daha sonra yapılan çalışmalarda 16S rRNA gen sekanslarına göre sadece *Micavibrio aeruginosavorus* olarak tanımlanmıştır [47].

BALO, *Micavibrio* cinsini oluşturan α -proteobakteri sınıfı ve üç familyayı oluşturan δ -proteobakteri sınıfı içerisinde bulunur: *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoracaceae* ve *Halobacteriovoraceae* (Tablo 2.1.).

2.2.1. *Bdellovibrionaceae*

Bdellovibrionaceae, *Bdellovibrionales* ordosu içerisinde yer almaktadır. Bu familyada iki tanımlanmış tür, *Bdellovibrio bacteriovorus* ve *Bdellovibrio exovor*us bulunur. *B. bacteriovorus* HD100T ve *B. exovor*us JSST, 16S rRNA gen diziliminde G+C içeriği % mol (sırasıyla %50.6 ve %41.9) bakımından farklılık gösterir ve %7 oranında ayrışır (yani %93 benzerdir) [40]. *Bdellovibrio* sp. hücrelerinin küçük boyutlarına rağmen, genomu tek bir dairesel kromozomda 3.782.950 baz çifti (bp) içerir ve 3584 proteini kodlar [48].

Bdellovibrionaceae'nin izolatları ve klonları; topraktan, köklerden, tatlı sudan, kanalizasyondan ve omurgalı dışkılarından kaynaklanmaktadır. Bu aynı soydan gelen organizma içerisinde on bir sabit monofilik kümelenme vardır. Ayrıca, *B. bacteriovorus* 100T ve 109J suşları, en fazla çalışılan türlerdir [3]. *Bdellovibrio bacteriovorus* ve *Bdellovibrio exovor*us arasındaki en büyük fark predasyon stratejisindedir: *B. bacteriovorus*, periplazmik bir predatördür, yani gram negatif konağın periplazmik alanına nüfuz eder ve yerleşir; ancak *B. exovor*us, epibiyotiktir; konak hücre duvarı ile bağlantılıdır. Bdelloplast oluşturmaması ve konak hücre olarak *E.coli* kullanmaması iki tür arasındaki diğer önemli farklardır. Yapılan bir çalışmada, *B. exovor*us'un kanalizasyondan izole edilmesi ve konak hücre olarak *Caulobacter crescentus* kullandığı gösterilmiştir [40]. Ayrıca *Bdellovibrio* sp. W suşu da bir bdellokist dinlenme evresi meydana getirdiği bilinen tek BALO izolatıdır [3].

Tablo 2.1. BALO Türlerinin Bazı Karakteristik Özellikleri [45].

Familyalar						
<i>Bdellovibrionaceae</i>		<i>Bacteriovoraceae</i>			<i>Halobacteriovoraceae</i>	
Türler	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	<i>Bdellovibrio exovorus</i> JSST	<i>Bacteriovorax stolpii</i> UKi2T	<i>Peredibacter starrii</i> A3.12T	<i>Halobacteriovorax marinus</i> SJT	<i>Halobacteriovorax litoralis</i> JS5T
İzole Edilen Yer	Toprak	Atık Su	Toprak	Toprak	Tuzlu su	Tuzlu su
Büyüme İçin Gerekli NaCl (\geq % 0.5)	-	-	-	-	+	+
Konak bakteriler	<i>E. coli</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
DNA GC içeriği (% mol)	50.6	41.9	40.9	43.5	36.7	37.8
Valin amino peptidaz	-	Bilinmiyor	+	+	+	Bilinmiyor
Sistin amino peptidaz	-	Bilinmiyor	+	+	+	Bilinmiyor
Kimotripsin	+	Bilinmiyor	-	-	-	Bilinmiyor
Polimiksin B duyarlılığı (300 U)	-	Bilinmiyor	-	-	+	Bilinmiyor
C _{16:1} ^{e9c} yağ asidi	-	Bilinmiyor	+	+	+	Bilinmiyor
iso-C _{13:1} 3-OH yağ asidi	+	Bilinmiyor	-	-	-	Bilinmiyor
C _{17:1} ^{e6c} yağ asidi	-	Bilinmiyor	+	+	-	Bilinmiyor

*(-) Negatif, (+) Pozitif sonuç olarak verilmiştir.

Çevresel örneklerin büyük ölçekli dizilişinin ortaya çıkması, *Bdellovibrionaceae* ağacının iki kümeye ayrıldığını ortaya koymuştur: biri kültürlenmiş suşların tüm dizilerini, ayrıca kültürlenmemiş bakterilerin dizilerini ve diğeri herhangi bir kültür temsilcisi olmayan bir başka kümeyi kapsamaktadır. Bu son grup, predatörleri izole etmek için konak hücre gibi canlıları kullanamamaları nedeniyle, klasik *Bdellovibrio* sp.'den farklı organizmaları temsil etmektedir [40].

2.2.2. *Bacteriovoracaceae*

Bacteriovoracaceae, *Bacteriovoracales* ordosu içerisinde yer alır. Bu familyada iki tanımlanmış tür, *Bacteriovorax stolpii* ve *Peredibacter starii* bulunur. Çevresel izolatların 16S rRNA gen dizilimindeki %96.5 gen benzerliğine dayanan 10 filogenetik kümeden oluşur [49]. Bu kümeler sağlamdır, zira daha hassas bölünmeleri mümkün kılan ancak aynı kümeleri koruyan *rpoB* geninin daha fazla analizi ile gösterilmiştir [43]. G+C içeriği %41 ila %43.5 arasında değişmektedir. *Peredibacter starii*'nin G+C oranı %43.5'dir. 16S rRNA gen dizisi analizi, *Bacteriovorax* ve *Peredibacter* cinsi üyelerinin (maksimum sapma <%17), *Bdellovibrionaceae* (minimum sapma >%20) daha çok birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. *Bacteriovorax stolpii* ve *Peredibacter starii* için toplam genomik kısıtlama sindirim modelleri (PFGE), *Bdellovibrionaceae* üyeleri tarafından üretilen modellere göre çok az benzerlik göstermektedir. Optimal büyüme sıcaklıkları 20-30 °C'dir. Zorunlu aerobiktirler. Oksidaz ve katalaz aktivitesi pozitifdir. Konak hücreden bağımsız mutantlar, zengin besleyici ortamlarda saprofitik olarak büyüyebilirler. *Peredibacter starii* penisilin, streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisin, metisilin ve vankomisin gibi antibiyotiklere duyarlılık gösterir. Ayrıca *Bacteriovorax stolpii*'nin aksine *Peredibacter starii*, pteridin 0/129 ve nalidiksik asitlere karşı dirençlidir. *Bacteriovorax stolpii* izolatları tatlı su, kanalizasyon, toprak, rizosfer ve uranyum madenciliği atıklarından; *Peredibacter starii* izolatları ise topraktan izole edilmiştir. Ayrıca *Bacteriovorax stolpii* ve *Peredibacter starii*, lipidlerin büyük bir kısmını oluşturan sfingolipidlere sahiptir [42].

2.2.3. *Halobacteriovoracaceae*

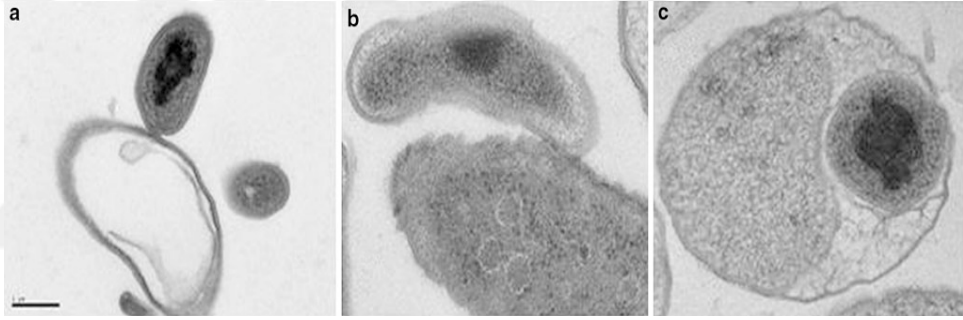
Halobacteriovoracaceae, *Bacteriovoracales* ordosu içerisinde yer almaktadır. Bu familyada iki tanımlanmış tür, *Halobacteriovorax marinus* ve *Halobacteriovorax litoralis* bulunur [42]. Bu familya tuzlu su habitatlarında bulunan tek familyadır ve izolatlar büyümek için NaCl gereksinimine ihtiyaç duymaktadır. Genellikle bu

izolatlar deniz, nehir ağız ve hipersalin göl ortamlarında bulunmaktadır. Optimal büyüme sıcaklıkları 25-30 °C'dir. Genellikle konak hücre olarak *Vibrio parahaemolyticus* kullanırlar [45]. *Halobacteriovorax marinus* metisilin, nalidiksik asit, kolistin sülfat ve vankomisin gibi antibiyotiklere dirençli; kanamisin, karbenisilin, ampisilin/sublaktam, gentamisin ve polimiksin B gibi antibiyotiklere ise duyarlılık gösterir [50]. Bu familyada ki G+C içeriği (<%38 mol) diğer BALO'nun en düşük değeridir. *Halobacteriovorax* cinsini, tatlı su ve karasal BALO'dan ayıran düşük DNA G+C içeriği iken, *Bdellovibrio bacteriovorus* suşları için, %47 ile 51 mol arasında değişen oranlarda iken, *Bacteriovorax stolpii* ve *Peredibacter starrii* suşları için bu değer %41 ila 44 mol arasında değişmektedir. Üç uzun zincirli yağ asitlerinin varlığı veya yokluğu, hem *Halobacteriovoraceae* hem de *Bdellovibrionaceae* ayırt edici bir özelliktir. Filogenetik ağaçları hesaplamak için kullanılan yöntemlerden bağımsız olarak, *Bdellovibrio* sp. ve *Halobacteriovorax* sp.'nin, *Peredibacter* sp. ve *Bacteriovorax* sp. ile uzak taksonlar olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır [45].

2.2.4. *Micavibrio*

Micavibrio sp., α -proteobakteri sınıfı içerisinde yer almaktadır. İlk olarak 1982 yılında *Micavibrio admirantus* (G+C içeriği %57.1 mol) [46] ve *Micavibrio aeruginosavorus* (%54.7 mol G+C içeriği) [51] olarak tanımlanmıştır. Her iki türde kanalizasyondan izole edilmiştir [3]. Bu predatör mikroorganizmalardan *Micavibrio admirantus* konak olarak *Stenotrophomonas maltophilia*'yı kullanırken, *Micavibrio aeruginosavorus* ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ve *Klebsiella pneumoniae*'i kullanarak izole edilmiştir [46]. Konak hücreden bağımsız *Micavibrio* sp. türleri ise izole edilememiştir [6]. Daha sonra morfolojiye, enzimatik aktiviteye ve diğer metabolik özelliklere dayanarak, *Micavibrio* sp.'nin *Bdellovibrio* sp. ile ilişkili olduğu ve *Bdellovibrionaceae* içine geçici olarak yerleştirildiği öne sürülmüştür [52]. 16S rRNA gen sekanslarına ve *Micavibrio aeruginosavorus* suşu ARL-13'e dayanan bir filogenetik analiz, *Micavibrio* sp.'nin α -proteobakteri sınıfında kümelenmiş olduğunu, bu kolda derin bir dal oluşturduğunu göstermiştir. *Micavibrio* sp. grubu, maksimum %1.4 sekans farklılığına sahip üç alt gruptan oluşmuştur. *Micavibrio* sp.'nin 16S rRNA dizileri ve diğer kültürlenmiş bakteri dizileri arasındaki minimal sapma yaklaşık %14'tür. *Rhodospirillales* ve *Rickettsiales* [53], *Micavibrio* sp.'nin en yakın kültür gruplarını temsil etmektedir. *Micavibrio* sp. ve

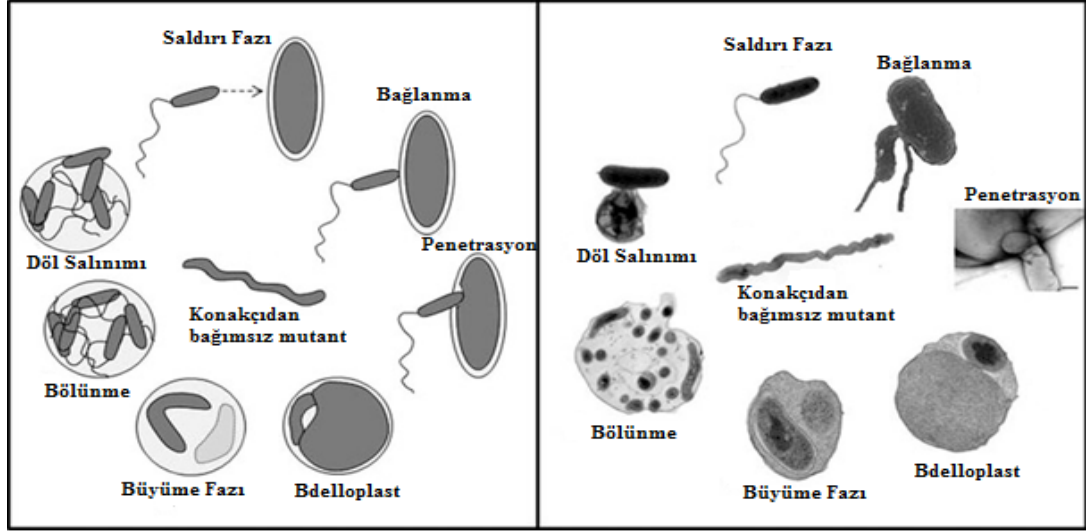
diğer BALO aynı proteobakteri sınıfına ait olmamakla birlikte, bazı morfolojik özellikleri de farklı olmasına rağmen, biyokimyasal seviyede bazı ilginç benzerlikler göstermektedirler: örneğin; konak bakteriden kaynaklanan, etkileşimin ilk aşamalarında her iki predatörde 260 ve 280 nm dalga boylarında materyal artışı absorbe etmektedir. Dahası, glikolitik yolların enzimleri ve trikarboksilik asit döngüsü enzimleri mevcut olsa da, zayıf bir şekilde aktiftir [54]. Bu predatörlerin diğer BALO'dan farkı ise epibiyotiktir, konak hücrenin dış zarına bağlanan bu predatör bakteriler, çoğu BALO'dan farklı olarak periplazmik boşluğa girmeden, ikili füzyon ile bölünürler. Böylelikle BALO hem α -proteobakteri hem δ -proteobakteri sınıflarında derin dallar oluşturdukları görülmekte olup, böylelikle bu iki sınıf diğer bakterileri dışlayan uzak bir atayı paylaşmış olmaktadır [47]. *Micavibrio* sp.'nin, diğer BALO'dan bir diğer farkı, düzenli bir dalga boyuna sahip, çapı 15 nm olan tek bir kılıfsız flagelluma sahip olmasıdır [3].



Şekil 2.2. BALO'nun Predatör Stratejileri a) Epibiyotik Predatör (*Bdellovibrio exovorus*) b) Epibiyotik Predatör (*Micavibrio aeruginosavorus*) c) Periplazmik Predatör (*Bdellovibrio bacteriovorus*) [55].

2.3. Yaşam Döngüsü

BALO'nun yaşam döngüsü hücre döngüsüne eşlik eder ve iki ana ve farklı aşama, yani bir saldırı fazı ile bir büyüme ve bölünme fazından oluşur (Şekil 2.3.). Bu fazların daha alt bölümleri ise periplazmik veya epibiyotik predatörlerin yaşam evreleridir. BALO, *Bdellovibrio exovorus* ve *Micavibrio aeruginosavourus* gibi epibiyotik predatörler, konak hücrelerine bağlanır ve içeriklerini sindirerek hücre dışında kalırlar, binary füzyon şeklinde bölünürler. Genellikle BALO'nun periplazmik predatör olması ile BALO yaşam döngüsünün tanımlanması, periplazmik aşamalı predatör stratejileri göz önüne alınarak yapılmıştır (Şekil 2.2.) [55].



Şekil 2.3. *Bdellovibrio bacteriovorus*'un Yaşam Döngüsü [55].

2.3.1. Hareketlilik ve Konak Hücreyi Bulma

Saldırı fazı hücreleri; küçük, ($0.7-1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$), çoğunlukla vibroid, yüksek derecede hareketli, yinelenmeyen hücrelerdir. Hücre şekli, muhtemelen bir iskelet olarak hareket eden sarmal-bobin-tekrar proteini CcrP ile hücre iskeleti proteini MreB₂ tarafından korunur. Çekirdek sıkı bir şekilde paketlenmiş ve sitoplazmada fosfor, kalsiyum ve oksijen bakımından zenginleştirilmiş asidokalizomları andıran elektron yoğun granülleri bulunabilir.

Saldırı fazı hücrelerine, altı farklı flagellin proteininden (FliC1-6) oluşan ve $160 \mu\text{m s}^{-1}$ 'lik yüksek hızlara sahip tek bir kılıflı flagellum eklenmiştir. Süspansiyon kültürlerinde predasyon için gerekli olan fliC3 haricinde flagellin genlerinin hiçbiri önemli görünmemektedir. Benzer şekilde, üç çift MotAB flagellar motor proteini, flagellar rotasyona eşit olmayan şekilde katkıda bulunur. Flagellar hareket konak hücre ile karşılaşmak için çok önemlidir, fakat hem konağın penetrasyonu için hem de yavaş yüzeyle ilişkili kayma hareketi ($15-20 \mu\text{m h}^{-1}$) için gerekli değildir. Kayma hareketi, biyofilmlerin predasyonunda ve düşük nemli ortamlarda avantajlı görünmektedir [55].

2.3.1.1. Kemotaksis

BALO'da; potansiyel konak hücrelere, akıntılarına veya lizatlarına karşı kemotaktik yanıt saptanmamıştır [56]. Bununla birlikte, çoklu metil-kabul eden kemotaksis proteinleri (MCP), çeşitli ligandları algılayıp, inorganik iyonlara, organik asitlere, aminoasitlere ve oksijene karşı pozitif ve negatif kemotaksisler ölçülmüş, fakat farklı BALO suşları ile çok farklı tepkiler elde edilmiştir [57]. Test edilen tüm

suşlar aerotaksis göstermiştir. Çünkü halofilik ve halofilik olmayan BALO, sırasıyla mikroaerobik koşullarda büyümediği veya daha az büyüdüğü gösterilmiş [58], aerotaksis ile hücrelerin optimal nişler bulması sağlanmıştır [59].

Benzer şekilde, kemotaktik yanıtlar predatörü, konak hücre ile zengin ekolojik nişlere yönlendirebilir [60] veya konak hücrelerin hücre dışı ortamda açlığı hafifleten bileşikler bulmasına yardımcı olabilir [61]. Organik bileşiklere yönelik kemotaksis, konak bakteri bakımından zengin nişlere işaret edebilir ve bu nedenle de BALO'ı potansiyel konak hücrelere yakın duruma getirmede yardımcı olabilir. Yapılan bir çalışmada, konak bakterilere karşı çekimin sadece yüksek konak hücre konsantrasyonlarında göze çarpmasına rağmen, MCP2'nin (çoklu metil-kabul eden kemotaksis proteini) delesyonunun predasyonu azalttığı görülmüştür, bu da konak hücre tayininde kemotaksisin rol oynadığını düşündürmektedir [55].

2.3.2. Konak Hücreye Bağlanma

BALO'ın konak hücreye bağlanması, ortamın bileşimi ve pH, oksijen basıncı ve sıcaklık gibi birçok faktörden etkilenir. Predatör, konak olmayan hücrelerle karşılaştığında ilk bağlanma tersine çevrilebilir, ancak bağlanma birkaç dakika içinde geri dönüşümsüz hale gelir. BALO tarafından konak hücre tanıma temeli hala belirsizdir. Yapılan bir çalışmada, konak hücrenin lipopolisakkarit tabakasının (LPS) çekirdek oligosakkaritlerinin, *B. bacteriovorus* tarafından algılandığı, tüketildiklerinde bağlanmanın durduğu, ancak ortadan kaldırılmadığı gözlenmiştir. Buna karşılık, bir başka çalışmada, *Bacteriolyticum stolpii* tarafından bağlanma konak hücrenin LPS bileşimi için kayıtsız olduğu, buna karşın *E. coli* içinde OmpF ve OmpC gibi belirli porinlerin (dış zar proteinleri, Omp'ler) yokluğunda bağlanmanın azaldığı gösterilmiştir. Başka çalışmalarda, BALO'ın, taksonlar arasında büyük ölçüde farklılık gösteren benzersiz membran lipid yapılarını sentezlediği gösterilmiştir. Örneğin; *B. bacteriovorus*'ta, lipid A tamamen negatif yüklü gruplardan yoksundur ve fosfat grupları yerine α -D-mannopiranoz kalıntılarına sahip olduğu; *B. stolpii*'nin benzersiz 2-amino-3-fosfonopropanat başlarına sahip sfingosfosfolipidleri içerdiği ve *Peredibacter starrii*'nin ise lipitlere, ilave bir N-glutamil kalıntısı olan fosfatidiletanolamin yapılarını içerdiği gösterilmiştir. Farklı lipid bileşimi, predatörlerin membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin değiştirildiği ve bunun da konak hücre yüzeyi ile etkileşimini ifade eder. Ancak, farklı predatörler dış zarlarında farklı lipid yapıları taşıırken, aynı konak hücreyi kullanma yetenekleri,

bu yapıların konak hücre ile anlamlı bir etkileşime sahip olmasa da, konak hücrenin hücre duvarının farklı bileşenleriyle etkileşime girebileceğini veya farklı mekanizmalarla konak hücrenin benzer bileşenleri ile etkileşime girebileceğini işaret etmektedir [55].

Tip IVa pili, saldırı fazı hücrelerinin flagellasız kutbunda bulunur, predatörün konak hücreye bağlanması ve penetrasyonu için gereklidir. Pilusun konak hücreye bağlanması, konak hücrenin periplazmasının istilasına olanak sağlar. Bu uzantı konak hücre sitoplazmik membrana yapıştığında, büyüme ve bölünme fazı sırasında, bağlanır. Bağlantı için mekanizma tüm büyüme döngüsü boyunca ifade edilir ve bu da pilusun replikasyon sırasında da rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca bir çalışmada, tip IVb Flp pilusun, biyofilmde *B. bacteriovorus*'un predasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [55].

2.3.3. Konak Hücre İnvazyonu ve Bdelloplast Oluşumu

Geri dönüşü olmayan bağlanma, konak hücre çeperinin lokal olarak parçalanmasını tetikler. *B. bacteriovorus* tarafından periplazmanın penetrasyonu, predatörün pora doğru sıkıştırılması ile elde edilir, bu da pili kullanılarak yapılabilir. Bu işlem bağlanmadan sonra 5-20 dakika içinde tamamlanır ve streptomisine duyarlıdır, bu da por oluşumunda enzimlerin üretildiğini gösterir. Bütün süre boyunca, konak hücre peptidoglikanı modifiye edilerek, bir bdelloplast üretilir. Bu aşamada, konak hücrenin sitoplazmik zarının zarar görmesi, konak hücre solunumunda hızlı bir düşüşe neden olur.

Bdelloplast yapımı, glikanazların aktivitesi ve hücre duvarının N-asetilglukozaminin %10-15'inin çözündürülmesiyle oluşur. Erken konak hücre lizisini önlemek için N-deasetilazlar, penetrasyondan hemen sonra glikanaz aktivitesini kontrol eder. Uzun zincirli yağ asitleri ile konak hücre peptidoglikanının açılmesi ve bir lipopolisakkarridaz aktivitesi ile LPS glukozaminin %25'inin çözünür hale getirilmesi, bdelloplast hidrofobikliğini artırır ve potansiyel olarak ozmotik bir bariyer gibi davranan dış membranı stabilize eder. Büyüme boşluğu, Braun lipoproteini aktif olarak parçalayan peptidazlar, penetrasyon esnasında peptitoglikandan konak hücre lizisi sırasında DAP'ın serbest bırakılması ile penetrasyon ve bdelloplast stabilizasyonu sırasında DAP'ın konak hücre peptidoglikanına yeniden katılmasının, etkisi ile daha da değiştirilir [55].

Predatör invazyonundan sonra, bdelloplast süperenfeksiyona karşı bağıklık kazanmaktadır. Bunun, başlangıçta peptidoglikanın N-deasetilasyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada, *Bdellovibrio* sp. W suşunun hem glikanaz hem de N-deasetilaz aktivitelerinin eksik olduğu ve sferik olmayan bdelloplastlarının süperenfeksiyona uğramadığı gösterilmiştir. Bu ve diğer veriler, glikanaz aktivitesinin değil, peptidazın konak hücreye penetrasyon sağladığını ve bdelloplastın yuvarlaklaşmasına konak hücrenin otolitik muramidazlarının neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte [62], invazyon sırasında çoğunlukla eksprese edilen PBP4 DD-endo/karboksipeptidazın iki homologunda bir çift mutasyonun, küresel olmayan bdelloplastlara yol açtığı gösterilmiştir. Mutantlar ayrıca konak hücre içine nüfuz etmekte daha yavaşlardır, bu da peptidaz aktivitesinin invazyon için özel olmayan bir enzimatik gereksinim olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, tek mutant olarak kodlanan genlerin her birinde ve daha çok çift mutantlar da süperenfeksiyona karşı duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır [55].

2.3.4. Büyüme ve Bölünme

Predatör intraperiplazmik *B. bacteriovorus*, konak hücrenin sitoplazmik içeriği genişliğinde, filamentli bir şekilde büyür. Konak hücrenin DNA'sının %70'ine kadarını, sırasıyla özel enzimlerle sindirerek birleştirir. Predatör, ayrıca konak hücrenin RNA ribonükleotidlerinin %20-40'ını, baz ve riboz-L-fosfat kısımlarına indirgemektedir. Şeker fosfat daha sonra enerji üretimi ve nükleik asit olmayan hücre materyalinin biyosentezi için kullanılır. Ayrıca, BALO pürin ve pirimidin metabolizması için genlerin tam komplementini kodlar. Bunun aksine, BALO, konak hücreden elde edilmesi gereken çeşitli amino asitleri ve riboflavini sentezleme ile degrade etme yeteneğinden yoksundur. Predatörler tarafından, diğer konak hücrenin, hücre bileşenlerinin lipopolisakkarit kısımları ve Omp'ler gibi yapıtaşlarının dışarıdan alındığı ve kullanıldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, *B. bacteriovorus*'un kendi lipopolisakkaritini sentezlediği ve Omp'leri dışarıdan almadığı gösterilmiştir. Çarpıcı bir şekilde ve şimdiye kadar bilinmeyen nedenlerden dolayı, çoğu BALO, yaygın DOXP bakteriyel yolu yerine mevalonat yolunu kullanmaktadır.

Büyüme ve bölünme fazı sırasında hücre iskeleti etkilenir: MreB ökaryotik aktin homologu MreB1, bdelloplast oluşumunun başlangıcında proteinin engelleyici polimerizasyonunun geciken büyümeye neden olması bakımından önemlidir. Saldırı

fazı hücrelerinde MreB2-mTFP'nin lokalizasyon çalışmaları, bunun spiral şekilli nükleoid ile yakından bağlantılı olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, nükleotidin hücre kutuplarından eşit mesafede ki konumu, hücre bölünmesi sırasında hücre uzunluğu ile paralel bir genişletme modelini önermiştir [63]. Son olarak, filament, konak hücrenin büyüklüğü ile orantılı olan yavru hücrelerine (döllere) bölünür [64]. Döl sayısı değişir, *Bdellovibrio* sp. tarafından tek ve çift sayılarda döller üretilir; örneğin *E. coli*'de konak hücre başına ortalama 5.7 döl ile *Aquaspirillum serpens*'de 30 döl üretilir. Bölünme, çift taraflı enfekte olmuş konak hücrelerde bile filamentsi *Bdellovibrio* sp. hücresi boyunca senkronize olarak meydana gelen septasyon olayları gibi belirli özellikler sergilemektedir. Ortaya çıkan saldırı fazı hücreleri, bdelloplastta ayrı porlardan kaçar. Bu hücreler olgunlaşır ve boyları uzar [65].

Yapılan çalışmalarda, deniz BALO'nun, besin yoksunluğu altında sabit bdelloplastlar ile durağan fazda konak hücrenin senkron enfeksiyonunda düşük konsantrasyonlarda bdelloplastlar ürettiği gösterilmiştir. Bu yapılar, hızla ölen ancak çevre sorunlarına duyarlı saldırı fazı hücrelerinin aksine, aylarca canlı kalmıştır [66]. Bunlar saldırı fazı hücrelerinin salındığı maya ekstraktının varlığında lizise olmuşlardır [55].

2.3.5. Bdellokist

Birkaç *Bdellovibrio* sp. suşunun düşük besin koşullarında ve konak hücresi başına enfeksiyon sıklığında [67] kist benzeri bir aşamaya girdiği bildirilmiştir. Bdellokistler enfekte bir konak hücrede meydana gelir. Predatör hücre, yapısal olmayan, şekilsiz bir dış tabaka tarafından çevrelenmiş olan böbrek şeklindeki bir hücreye doğru genişler. Predatör hücrenin daha partiküllü plazma membranını, ince tanecikli bir iç tabaka çevreler. Nişasta granüllerine benzeyen yapılar mevcuttur. Bdellokistler, vegetatif hücrelere göre kuruluğa, yüksek sıcaklıklara ve sonikasyona karşı daha dirençlidir ve çimlenmesi için L-glutamat, K⁺ ve NH₄⁺ tarafından teşvik edilir [55].

2.4. Konak Hücreden Bağımsız BALO

Laboratuvar koşullarında, canlı konak hücre yokluğunda zengin ortamda yetişebilen kendiliğinden ortaya çıkan türevlerin bulunduğu bildirilmiştir [19]. Konak hücreden bağımsız (HI) olarak keşfedilen bu varyantlar, arketipik dimorfik yaşam döngüsüne sahiptir ve predatör bir potansiyeli korur. Bu nedenle, fakültatif predatörlerdir. Bu varyantlar vahşi tip öncülerle karşılaştırıldığında, konak hücreden

bağımsızlığının BALO yaşam tarzının orijinal bir aşaması olabileceğini düşündürmektedir. Konak hücreden bağımsız izolatlar, foto-oksidatif hasara karşı koruyucu sarımsı bir pigment üretirler [68], geniş bir karbon kaynağını kullanırlar [69], farklı LPS yapılarını sentezlerler [70] ve yapışkan biyofilmleri oluştururlar [71].

Konak hücreden bağımsız suşlarının çoğu "tip I" [25] olarak adlandırılan küçük kolonileri oluşturan izolatlardır ve standart bir ortam üzerinde izole edilirler. Bu koloniler, sıkı ve küçük büyüyen kolonileri oluşturmak için büyük bir inokulumla ekilmedikçe veya ortama predatör hücrelerin bir özütü takviye edilmezse, başlangıçtaki gelişmeden sonra alt kültüre ayrılamazlar [72]. Bu koşullar altında, izolatların yaklaşık %1'i standart olmayan, hücre özütü takviye edilmemiş ortam üzerinde, yoğun, bağımsız bir şekilde yeniden büyütülebilen, büyük koloni oluşturan "tip II" mutantları oluşturacaktır [73]. "Tip I" mutantlar, hücre özütüne bağımlıdır (saprofitiktirler) ve tek bir mutasyondan kaynaklanır; "Tip II" mutantlar ise, hücre özütüne ihtiyaç duymazlar (akseniktirler) ve ilave bir mutasyondan kaynaklanırlar, yani çift mutantlardır. Tip I mutantlar 10^6 ila 10^7 frekansında ortaya çıkarken [25]; tip II mutantlar, tip I'den 10^2 ila 10^3 arasında bir frekansta seçilirler [73]. Yapılan bir çalışmada, konak hücreden bağımsız varyantların 10^2 'ye kadar bir sıklıkta elde edilebileceği bildirilmiştir [74]. Bu veriler, aksenik fenotipe giden yolun en azından bir bölümünün mutasyona yatkın olduğuna ve tek rastgele olaylara dayalı olmadığını ortaya koymaktadır [55].

Bir başka çalışmada, Cotter ve Thomashow [75], küçük bir genetik bölge içinde, kısa bir açık okuma çerçevesinde (ORF) hit lokusta, ortaya çıkan mutasyonların gen ürününde büyük değişikliklere yol açtığı ve konak hücreden bağımsız varyantların mutasyona uğradığını, yani tüm saprofitik mutantların ORF'de mutasyonlara sahip olduğunu göstermişlerdir. Southern hibridizasyon deneyleri, hit lokusun sadece *B. bacteriovorus* suşlarında bulunduğunu göstermiştir [76].

Yapılan bir araştırmada, konak hücreden bağımsız *B. bacteriovorus* HD100 suşunun, kültür ortamına önemli miktarda hücre dışı proteaz ve DNaz salgıladığı ve gram pozitif *Staphylococcus aureus*'un biyofilmini bozduğunu (%75 oranında) tespit etmişlerdir [77].

2.5. Hücre Döngüsünün Genetiği

2.5.1. Faz Geçişi

Her faz farklı gen ve protein ekspresyon modelleri ve özellikleri ile karakterize edilmiştir [78]. Konak hücreden bağımsız (HI) mutantlar ve erken ortaya çıkmış bdelloplastlardan salınan hücreler üzerinde yapılan çalışmalara göre; saldırı fazından, büyüme ve bölünme fazına geçişte konak bakterinin iki sinyali algılamasının önemli olduğu gösterilmiş olup [79], bunlardan ilki bağlanma sırasında [73], ikincisi büyüme sırasında aktive edilmektedir [72]. Bu tür programlamının büyük olasılıkla modülasyonları farklıdır ve ana düzenleyiciler tarafından yönetilen fazlar arasında hızlı bir geçiş sağlanmaktadır [80]. *B. bacteriovorus FliA* (sigma 28) promotörleri saldırı fazına özgü genleri yukarı akışta temsil edilmekte ve bu promotörler saldırı fazı sırasında kendiliğinden aşırı eksprese (ifade) edilmektedir. Bu yüzden *FliA* promotörlerinin bir saldırı fazı ana düzenleyicisi olarak hareket ettiği sanılmaktadır [78]. *B. bacteriovorus*'taki RpoE benzeri sigma faktörlerinin ise gerekli olmadığı, ancak predatörün etkinliğini etkilediği veya şaperonin seviyelerini düzenlediği varsayılmaktadır [80]. Ayrıca ısı şoku, aksenik büyümeyi arttırdığından, ısı şoku tepkisi faz geçişinde önemli rol oynamaktadır [81].

Yaygın olan ikinci haberci molekül siklik di-GMP, birçok bakteride yaşam biçiminin belirlenmesinde rol oynamaktadır [82]. BALO genomları, siklik di-GMP ve tek siklik di-GMP tip I riboşalter'in yanı sıra, siklik di-GMP sentezleyen ve indirgeyen bolca enzim (sırasıyla diguanil siklaz ve fosfodiesterazlar) kodlamaktadır [78]. Siklik di-GMP sinyalleşmesinin, *B. bacteriovorus*'ta flagellar ve kayma hareketini etkilediği bunun yanı sıra, *B. bacteriovorus* konağa bağımlı ve bağımsız fenotiplerini de belirlemede önemli olduğu gösterilmiştir. Bu tür fenotipik farklılaşma, farklı diguanilat siklaz setleri ile sağlanmaktadır [83]. Siklik di-GMP riboşalter, saldırı fazı sırasında anormal şekilde eksprese edilmekte, büyüme ve bölünme fazı sırasında aşağı regüle edilmektedir [78].

2.5.2. Genetik, Genomiks ve Post Genomiks

Periplazmik predatör *B. bacteriovorus* ve epibiyotik predatör *M. aeruginosavorus*'un yüksek verimli transkriptom analizleri yapılmıştır [78]. Genel olarak, global transkripsiyonel değişiklikler faz geçişi ile korelasyon göstermektedir. Lambert ve ark. [80]'nın saldırı fazında, predatör (konak enfeksiyonundan 30 dakika sonra) ve konaktan bağımsız (HI) *B. bacteriovorus*'un transkripsiyon profillerini

karşılaştırmış ve her bir durumda sadece aşırı eksprese edilmiş genleri tespit etmiştir. Bu onların alt gen gruplarını sınırlandırmış olup; saldırı fazı, işgal fazı, büyüme ve bölünme fazı işlevlerini sağlamıştır. Hareketlilik ve taksis genleri ise saldırı fazında aşırı eksprese edilmiştir. Hücre duvarı metabolizması, taşıma sistemlerinin aktivasyonu ve erken replikasyon fonksiyonları, predasyonun erken aşamalarında ifade edilmiştir. Makromolekül degradasyonu, kitlesel taşınma, biyosentez yolları ve DNA replikasyonu konaktan bağımsız (HI) örneklerde ifade edilip, büyüme ve bölünme fazında eksprese edilmiştir. Açıkçası, konaktan bağımsız (HI) mutantlar saldırı fazına özgü profilleri birleştirmeye ve muhtemelen büyüme ve bölünme fazında bağlanmaya yarayan bir transkripsiyonel mozaïği temsil etmektedir. Bu veriler bu nedenle konaktan bağımsız (HI) fenotipin altında yatan mutasyonların esas olarak düzenleyici kısıtlamalardan kurtulmuş bir hücre döngüsüne yol açtığı hipotezini desteklemektedir [79]. Karunker ve ark. [78], yalnızca saldırı fazı ile büyüme ve bölünme fazı üzerinden eksprese edilen *B. bacteriovorus*'un büyük alt genom gruplarını bulmak için bütün transkriptom dizilimini kullanmıştır. Burada yine, saldırı fazında hareketlilik, kemotaksis ve hücre yüzeyi proteinlerini kodlayan genler düzenlenmiştir. Büyüme ve bölünme fazı sırasında aşırı eksprese edilen genler, ribozom biyogenezi, hücre bölünmesi, DNA polimerazi, kromozom bölünme proteinleri ve enerji metabolizması dahil olmak üzere hücre büyümesi ile ilgilidir [78]. Epibiyotik α -proteobakteri *M. aeruginosavorus*'un saldırı fazının ekspresyon profilleri; periplazmik δ -proteobakteri *B. bacteriovorus*'un büyüme fazına karşılık gelmektedir. Saldırı fazında; flagellar ve kemotaksis genleri, replikasyona bağlı genler ve taşınım ile ilgili genler, bağlanma sırasında yukarı doğru düzenlenmiştir. Ayrıca hidrolaz kodlayıcı genlerin yapısal olarak ifade edildiği bulunmuştur [81].

2.6. Taşıma

BALO tarafından salgılanan salgı, tip I ve tip II (sec) sistemlerini ve ikili arginin hedef protein translokasyon (TAT) sistemini [48] içermektedir. Tip III ve tip IV salgı sistemleri mevcut değildir. Konak bakterinin sitoplazmasına protein salgılanması, muhtemelen ilk önce konak bakterinin periplazmasının içine salınarak, daha sonra ana sitoplazmada retranslokasyon yoluyla gerçekleştirilmektedir [84]. Bir başka özel mekanizma, predatör *B. bacteriovorus*'un Omp'nin konak bakterinin sitoplazmik membranına gömülmesi ve muhtemelen onu küçük hidrofilik moleküllere geçirgenleştirmesidir [85].

B. bacteriovorus'ta, TAT sistemi, konağa bağımlı ve bağımsız suşların büyümesi için gereklidir. Sistem bileşenlerinden bazıları, hücre döngüsünün belirli safhaları sırasında spesifik olarak eksprese edilip, proteinlerin konak hücrenin sitoplazmasına transferini teşvik ettiği görülmektedir [86].

BALO genomları, olağandışı büyük taşıma sistemlerinin envanterlerini kodlamaktadır [84]. δ -proteobakterilerden *Bdellovibrionaceae* ve *Bacteriovoraceae*, amino asitler ve peptidler için çok sayıda uptake sistemi taşırlar; bunun aksine, epibiotik α -proteobakteri *Micavibrio aeruginosavorus*'da bu sistemlerin hiçbiri tespit edilememiştir [83]. BALO'nun az miktarda şeker taşıyıcıları vardır, karbon ve enerji için karbon içermeyen metabolizmaya bağımlıdır. *B. bacteriovorus* riboz, glikozitler, maltoz ve malto-oligosakaritlerin alınmasını sağlayan üç şeker permeazına sahiptir [87]. Buna karşılık, birçok akış pompası bulunur. Fosfoenolpiruvat bağımlı şeker taşıma fosfotransferaz sistemi (PTS) yoktur. Nükleotid alımı, çoğu zaman obligat predatörlerde bulunan, bakterilerde ise nadir görülen bir özelliktir. *B. bacteriovorus* muhtemelen iki farklı sistem vasıtasıyla nükleotidleri alabilmektedir [84]. *M. aeruginosavourus* genomu, nükleotid taşıyıcı kodlayıcı genlerden yoksundur [81].

2.7. Litik Enzim Aktiviteleri

Konak hücre morfolojisi, *Bdellovibrio* sp.'nin penetrasyonuna göre önemli ölçüde değişir: konak hücre genellikle yuvarlak olan bir bdelloplasta dönüşmektedir. Kovalent olmayan bir şekilde bağlanmış, dış zar bileşenlerinin penetrasyonu ise, mekanik kuvvetlerin etkisi ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte, por oluşumu ve peptidoglikanın içinden geçmesi için, kovalent bağlar enzimler tarafından kesilmelidir [88]. Bu litik aktiviteler bir yandan penetrasyona izin vermeli, diğer yandan ise konak hücrenin erken parçalanmasını önlemelidir. Farklı olarak düzenlenmiş glikanaz ve peptidaz aktivitelerinin sonucu olan peptidoglikanın hızlı çözündürülmesi, penetrasyon sırasında, serbest diaminopimelik asit (DAP) ve hücre dışı ortama salınan amino şekeri ile kanıtlanmıştır [89]. Serbest DAP daha sonra sadece intraperiplazmik büyüme sırasında mevcut olan çözünebilir bir enzim aktivitesi ile bdelloplastın peptidoglikanına hızla eklenmiştir [90]. Bir lipopolisakkarid de istila sırasında aktiftir. Glikanaz, peptidoglikan deasetilasyonu ile hızlı bir şekilde etkisiz hale gelirken, peptidaz aktivitesi, bdelloplast aşaması boyunca düşük bir hızla devam etmektedir [89]. Bdelloplast süperenfeksiyonunun

diğer *Bdellovibrio* sp. tarafından önlenmesi, peptidoglikan omurgasının deasetilasyonuna bağlanmıştır [91]. Konak hücrenin peptidoglikanının uzun zincirli yağ asitleri ile açılma peptidoglikanının ozmotik stabilitesi için gerekli olmasa da, bdelloplastın dış zarını stabilize etmektedir [92]. Birçok konak hücre yuvarlak değildir. Çünkü *Bdellovibrio* sp. W suşu ile enfekte olan hücreler ve yuvarlak olmayan, ısıyla öldürülen substrat hücrelerinin saptanabilir bir glikanaz içermediği için, Tudor ve ark. [93], ayırma için deasetilasyonun gerekli olmadığına, yuvarlak bir bdelloplast oluşumundan glikanaz aktivitesinin sorumlu olduğu sonucuna varmışlardır. İntraperiplazmik büyüme fazının sonunda ikinci bir litik aktivite patlaması ile yeni sentezlenen enzimler kalan peptidoglikanı bozmuştur [89].

2.8. Enerji Metabolizması

Kültürde BALO, durağan faza girmez ve hem yüksek hızda yüzmeye hem de büyüme ve çoğalma için, sürekli olarak yüksek oranlarda enerji kullanmaktadır. Her iki fazda, *E. coli*'den yedi kat daha yüksek olan endojen ve substrat solunum oranları, trikarboksilik asit döngüsü veya elektron taşıma zincirinin fonksiyonel kapasitesinin doygunluğuna yol açmaktadır [87]. BALO fermantasyon yapamaz ve fiili olarak şeker kullanamaz [94]. Amino asitler, bazı organik asitler (asetat ve α -ketoglutarat) ve polihidroksialkanoatlardan (PHA) enerji (ATP) elde ederler [87]. Yapılan bir araştırmada, endojen solunum sırasında *B. bacteriovorus*'ta ATP döngüsü, *E. coli*'den beş kat fazladır, substrat solunumu da benzerdir, ancak her iki koşul altında da fosfat/oksijen oranları *E. coli*'nin kine benzemektedir [95]. Bir diğer çalışmada, *Bdellovibrio* sp.'nin, substrat hücresinden veya eksojen bir kaynaktan doğrudan nükleosit monofosfatları ve ATP'yi, ayrıca konak hücre türevli fosfolipidleri kullanabildiği belirtilmiştir [96]. İntraperiplazmik aşama boyunca, predatörün DNaz'ları, substrat hücresinin DNA'sını bozarak, büyüme için gerekli olan nükleozitlerin çoğunu sağlar [97]. Diğer nükleozitler, bdellovibrios nükleotidleri yağ asitlerini sentezleyemediğinden [98], RNA bozulması, ribonükleotit ve deoksiribonükleotit dönüşümlerinden [99] gelir.

BALO'nun konak materyalini geri dönüştürebilme kabiliyeti, predatör bakterileri enerji bakımından verimli hale getirmiştir: Büyüme ve bölünme fazında ki *B. bacteriovorus*, zengin ortamda [100] yetiştirilen bakteriler için 10.5'e kıyasla, 26 olan bir Y_{ATP} 'yi (tüketilen ATP başına biyokütle) açığa çıkardığı gösterilmiştir.

Yüksek solunum oranları ve hızlı enerji tükenmesi ile BALO tipik olarak kısa bir yarı ömür ile sonuçlanır, örneğin; 20 saat içinde *B. bacteriovorus*'un hücre süspansiyonunun yaşayabilirliğinde %95'lik bir kayba neden olduğu görülmüştür. Bu, kısmen toplam enerjinin %20-40'ını kullanan BALO'nun enerjik olarak yüzmesine bağlıdır [101]. *B. bacteriovorus*, kendi hücresel materyallerini bozarak, eksojen bir substratın yokluğunda, salınan enerji üretimini kendine özgü sergilemektedir [95].

BALO hayatta kalmayı; amino asitler, bazı organik asitler ve PHA'lar gibi solunabilir substratlar kullanılarak gerçekleştirir. Yapılan çalışmalarda, *B. bacteriovorus*'un konak hücre tarafından yapılan PHA'yı depolimerize edebildiği ve bunu ATP'yi üretmek için kullanabileceği gösterilmiştir [87]. Bazı BALO ise kist benzeri bir duruma girerek veya denizdeki BALO'da gösterildiği gibi bdelloplasti uyku hali durumuna dönüştürerek sert çevre koşullarını aşabildiği gözlenmiştir.

2.9. Habitat ve Ekoloji

BALO deniz, tatlı su ve karasal ekosistemlerde yaygın olarak bulunur. Bu predatör bakterilerin habitatları, izole edildikleri ortama göre ikiye ayrıldığı gözlenmiştir; bunlardan biri deniz veya tuzlu su ekosistemleri ile sınırlı olan bir tuz gerektiren ortamlar iken [102], diğeri tuz için düşük toleransa sahip olan, tatlı su ekosistemleri ve topraktır [103]. Tatlı su ekosistemde yer alan organizmaların; su, toprak, kanalizasyon, rizosfer, su dağıtım sistemleri ile hayvanların ve insanların bağırsak kalıntılarından izole edildiği bildirilmiştir [31]. Tuzlu suda yer alan organizmaların ise; okyanus, deniz, tuz gölleri, haliç ve mavi yengeçlerin solungaçlarından izole edildiği bildirilmiştir [34]. Ayrıca BALO'nun nispeten yoğun olarak bulunduğu diğeri bir habitat yüzey biyofilmleridir [104].

Predatörlerin çeşitli bakterilere duyarlılığı ile ilgili yapılan deneylerde tuzlu su ortamlarında *Vibrio* sp.; tatlı su ve karasal ortamlarında *E. coli*; toprak ve rizosfer ortamlarında *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile kanalizasyon ve nehir suyunda ise *E. coli* ve *Achromobacter* sp.'nin en duyarlı konak bakterileri oldukları tespit edilmiştir. Toprak, rizosfer ile tatlı su gibi ortamlardan predatör bakterinin izolasyon verimini arttırmak için, birden fazla konak bakteri kullanımı gerektiği belirtilmiştir.

Predatör bakterilerin buldukları habitatlara göre inkübasyon sıcaklıklarının farklı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin; tuzlu su ortamlarında,

BALO için, plak oluşumu, 22-25 °C inkübasyon sıcaklıklarında gözlenirken, 30 °C'nin üzerinde plak oluşumunun önemli ölçüde azaldığı; tatlı su ve karasal ortamlarda ise, yaklaşık 30 °C'de plak oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Optimal inkübasyon koşulları altında, plaklar tipik olarak hem tuzlu su ortamlarında hem de tatlı su ile karasal ortamlarda 48-96 saat arasında görüldüğü tespit edilmiştir. BALO, mevsimsel dağılım modelleri de sergilemektedir. İzolasyon daha sıcak aylarda gözlenmekte, yaz sonu ve sonbaharın ilk aylarında plak sayıları artış gösterirken, daha soğuk aylarda plak sayılarının azaldığı tespit edilmiştir [105].

Kültür temelli yaklaşımlar tarafından değerlendirilen BALO'nun popülasyon bolluğu ve çeşitliliği büyük ölçüde azımsanmıştır. Nitekim, farklı BALO sınıflamalarını hedefleyen spesifik primerleri kullanarak, popülasyon büyüklükleri için yapılan ilk tahminler, bolluklarının sayım plakaları tarafından saptanan miktarından çok daha yüksek büyüklükte (2.5'tan fazla) olduklarını göstermiştir [106]. Çok çeşitli ortamlarda, 16S rRNA gen dizisi dağılımlarına dayanan BALO'nun göreceli bolluğunun sınırlı bir değerlendirmesi, predatörlerin ortalama olarak toplam bakterilerin %0.2'sine yakın bir kısmını oluşturduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde, kültürden bağımsız teknolojiler, BALO çeşitliliğinin, izolatların karakterizasyonu ile saptanandan çok daha büyük olduğunu ortaya koymaktadır [107].

Lotka-Volterra konak hücre-predatör modeline dayanan hesaplamalara göre [108], predatöre %50 hayatta kalma şansı vermek için, en az 3×10^6 konak hücreye ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Bu hesaplama, *Bdellovibrio* sp.'nin yalnızca özel ekolojik nişlerde yaşayabileceği yönündedir. Bununla birlikte, düşük seviyeli, kararlı durumdaki predatör bakteri popülasyonları, düşük konak hücre yoğunluğunda (10^4 kob/mL) sürekli kültürlerde uzun süreler boyunca yaşamını sürdürmüştür. *Bdellovibrio* sp.'nin hayatta kalması için yüksek bir konak hücre yoğunluğunun gerekli olduğu ve toprakta en az 10^5 - 10^6 kob/g veya mL konak hücre konsantrasyonlarının ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir [28].

BALO zorunlu aerob olarak kabul edilir, oksik koşullar altında çoğalırlar, ancak anoksik periyotları atak fazı hücreleri veya bdelloplastlar olarak yaşayabilirler [109]. Schoffield ve ark. [110], BALO suşlarının, anoksik ortamlarda 9 güne kadar dayanabileceğini ve mikroaerobik koşullar altında konak bakterilere saldırabildiğini tespit etmiştir. Ayrıca aynı araştırmacılar, *B. bacteriovorus* 109J'nin oksijen kısıtlı bir

ortamda avlanmadığını, ancak diğer BALO'nun bu koşullar altında da avlanmaya adapte olduğunu bildirmiştir. Monnappa ve ark. [111] 2013 yılında, *B. bacteriovorus*'un nitrat eklendiği sürece anoksik koşullar altında başarıyla avlandığını belirlemişlerdir. *B. bacteriovorus*'da nitrit redüktaz ve nitrit oksit redüktaz bulunur, fakat bona fide nitrat redüktaz genleri bulunmamaktadır [48]. *Micavibrio aeruginosavorus* EPB ancak ARL-13 suşu hariç, bir nitrat redüktaz kompleksi için kodlama yapar [112]. Ayrıca, halo-toleranslı predatörlerin, mikro-aerobik koşullar altında büyüdüğü gösterilmiş, toprakta ve suda düşük oksijen gerilimi oluşmuş ve predatör bu koşullara uyum sağladığı bildirilmiştir [59].

BALO'nun bulunduğu bir başka habitat, yüzeyler üzerinde bulunan biyofilmlerdir. Biyofilmlerin katı fazları arasındaki sürekli boşlukta, çözünmüş kimyasallar, asılı parçacıklar ve hücreler serbestçe hareket edebilir [113]. Bu nedenle, küçük boyutlarına, yüksek hareketliliğine ve çarpma moduna bağlı olarak predatör bakterilerle, ilişkili biyofilmlerin bakteriyel bileşimini güçlü bir şekilde etkilemesi olasıdır. Yapılan bir çalışmada, *E. coli* hücrelerinin biyofilm seviyesini etkili bir şekilde düşüren bir predatör izolatının paslanmaz çelik üzerinde bulunduğu bildirilmiştir [39]. Yüzeyle ilişkili *Bdellovibrio* sp.'in çeşitli çevresel saldırılardan kurtulduğu, ancak serbest hücrelerinin hızla öldüğü gösterilmiştir [114]. Sonuç olarak, biyofilmlerin BALO için potansiyel olarak daha zengin bir yaşam alanı sağladığı ve düşük mikrobiyal yoğunluklu biyotalarda predatörün gelişimi için daha elverişli bir ortam oluşturduğu gözlenmiştir [59].

2.10. Uygulamalar

BALO'nun karakteristik yaşam tarzı, onları bir dizi uygulama için cazip adaylar haline getirmiştir; örneğin kimyasal antibiyotiklere canlı alternatifler, su ürünleri yetiştiriciliğinde su kalitesini arttırmak için ajanlar, dış plağı bakterilerini kontrol etmek için bir araç ve tavuklarda *Salmonella* kaynaklı sızıntılı bağırsak sendromu tedavisinde ajan olarak önerilmiştir [55].

BALO, çok geniş ve spesifik olmayan konak hücrelere predasyon göstermektedir. Bu bakterilerin litik özelliklere sahip olması ekolojik sistemde homeostazın muhafazası içinde önemli bir rol oynamaktadır [115]. Çok farklı ve değişik cinste bulunan gram negatif bakteriler ile bazı gram pozitif bakterilere saldırabilirler. Örneğin; bir çalışmada *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J suşunun, konak hücre olarak; *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Chromatium*, *Spirillum*,

Acinetobacter, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listonella*, *Morganella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* ve *Yersinia* suşlarına saldırdığı bildirilmiştir [1]. Markelova [116], *Bdellovibrio bacteriovorus* 100NCJB suşunun, *Helicobacter pylori*'ye saldırabileceğini göstermiştir. Bu patojenik gram negatif bakterilerin bazılarının insanları enfekte ettiği, bunun yanı sıra aralarında hayvan ve bitki patojeni de olduğu kanıtlanmıştır [117]. Bu predatör bakteriler, birçok insan ve hayvan patojenini konak bakteri olarak kullanma yeteneği yüzünden 'yaşayan antibiyotikler' olarak adlandırılmaktadır [118]. Genellikle gram negatif türlerin *B. bacteriovorus*'un konağı olduğu bildirilmesine rağmen, besin eksikliği durumunda bu predatör bakterinin bazı gram pozitif türlerden de yararlanabileceği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un varlığında *B. bacteriovorus*'un etkinliği ile *S. aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın sıklıkla enfeksiyöz ajanlar olarak bir arada bulunduğu, kistik fibroz gibi, bazı patolojilerde olası terapötik kullanımı ile ilgili olduğu sonucuna varıldığı gösterilmiştir. Pantanella ve ark. [119], üç farklı protisti konak olarak kullanmışlardır. Konak olan protozoalardan biri siliat *Tetrahymena pyriformis* ile diğer ikisi flagellat *Poteroiochromonas malhamensis* ve *Poteriospumella lacustris*'tir. Siliat *Tetrahymena pyriformis* ile BALO'nun, flagellatlara göre daha iyi bir şekilde predatör-konak hücre etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir, fakat kaynak bakımından zengin ortamlarda, BALO'nun protistleri konak olarak tercih etmeyebileceği belirtilmiştir [120].

Antibiyotiklere dirençli patojenik bakteriler insanlarda ciddi hastalıklara yol açmaktadırlar. Özellikle bu bakteriler, geniş spektrumlu β -laktamaz ve KPC-tip β -laktamaz gibi son derece güçlü β -laktamaz üretirler. Antimikrobiyal maddelere dirençli bakteri enfeksiyonlarıyla mücadele için alternatif bir yaklaşım da, bu patojenleri yok etmek için predatör bakterilerin kullanılmasıdır [117]. β -laktam antibiyotiklerinin BALO türleri üzerine etkisinin olmadığı, bu yüzden predatör suşların aktif olduğu ve konak türlere saldırdığı sırada, bu antibiyotiklerin de birlikte kullanılabilmesi bildirilmiştir [1]. Kadouri ve ark. [121], *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J, *B. bacteriovorus* HD100 ve *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13 predatörler [*Acinetobacter baumannii* (AB276, AB285), *Escherichia coli* (YD429, YD438, YD446, YDC345, AZ1285), *Klebsiella pneumonia* (YD466, AZ1032, AZ1093, AZ1136, AZ1169), *Pseudomonas aeruginosa* (GB771), *Pseudomonas putida*

(YA241)] karşı predatör etkileri değerlendirmişlerdir. Buna göre; *B. bacteriovorus* HD 100'ün tüm incelenen konak bakterileri avlayabildiği, *B. bacteriovorus* 109J'nin 14 konak bakterinin 13'ünü avladığı ve *M. aeruginosavorus* ARL-13 ise 14 konak bakterinin 5'ini avlayabildiği bildirilmiştir. Bugüne kadar predatör bakteriye karşı tamamen dirençli mutant bir konak bakteri bulunamamıştır. Yapılan bir başka antibakteriyel çalışmada ise, gram pozitif bakterilere karşı etkili olan antibiyotik violaseinin, predatör *B. bacteriovorus* HD100'ün aktivitesini engelleyemediği ortaya konulmuştur. *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* ve *Klebsiella pneumoniae* içeren 4 kültüre karşın hem violasein hem de *B. bacteriovorus* HD100'ün birlikte uygulanması sonucu, toplam popülasyon %99.98 azalttığı belirtilmiştir [122].

İnsanlarda bakteriyel kronik iltihabik enfeksiyonların çoğu biyofilm oluşumunu kapsar. İnsanlarda bakteriyel kronik enflamatuar ve enfeksiyöz hastalıkların çoğu, idrar yolu enfeksiyonlarında üropatojenik *E. coli*, gastrointestinal enfeksiyonlarda enterohemorajik *E. coli* ile biyofilm oluşumunu içerir. Kadouri ve ark. [123]'nin, *Bdellovibrio* sp.'nin, bu biyofilmleri istila ettiğini ve etkili bir şekilde yok ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca *Bdellovibrio bacteriovorus*, aynı zamanda tek ve karışık türler tarafından yapılan biyofilmlere de saldırabildiği ve sadece yüzeyi ile sınırlı olmayıp, biyofilmlerin 30 µm kalınlığına kadar erişebildiği gösterilmiştir [1]. Bir başka çalışmada, BALO izolatının, paslanmaz çelik üzerindeki biyofilm oluşturan *E. coli* hücrelerinin seviyesini etkili bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir [39]. *B. bacteriovorus* HD100'ün *Staphylococcus aureus* biyofilmlerini kullandığı bildirilmiştir [124]. *Staphylococcus aureus*, sırayla bakteri hücrelerini barındıran hücre dışı polimerik maddeler veya EPS içeren biyofilm üretimine katkıda bulunma yeteneğine sahiptir [125]. EPS matrisi, hücre dışı DNA, polisakkaritler ve yüzeylere güçlü bir şekilde yapışan ve biyofilmlerin çıkarılmasında zorluklara neden olan proteinler tarafından üretilir. Biyofilmin üstesinden gelmek için, EPS'yi elimine etmek için proteazlar ve DNaz'lar gibi hidrolitik enzimler kullanılır [126]. *S. aureus* biyofilm oluşumunun, *Bdellovibrio bacteriovorus* süpernatantı tarafından inhibe edildiği, predatör bakteriler özellikle proteinaz K gibi birçok hidrolitik enzim ürettiği gösterilmiştir [127]. Bu enzimler konak hücrenin makromoleküllerini hidrolize edebilir, böylece predatör bakterilerin biyofilme karşı etkili bir şekilde çalışmasını sağlar [128]. Hücre dışı polimerik madde bozucu enzimlerin yardımı ile *B.*

bacteriovorus'un biyofilm giderim kabiliyetini arttırmayı amaçlayan deneyler yapılmış, proteinaz-K'nın predasyonu önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, bir poli-n-asetilglukosamin (PGA) hidrolize edici enzim olan DspB ile muamele edilmiş *A. actinomycetemcomitans* biyofilmleri, biyofilm giderimini arttırdığı bildirilmiştir. *B. bacteriovorus* 109J'nin, *A. actinomycetemcomitans*'a karşı predasyonu, aynı bakterilere karşı *B. bacteriovorus* HD100'ünkiyle çok benzer olduğu belirlenmiştir [129]. *A. actinomycetemcomitans* ile çeşitli *B. bacteriovorus* konsantrasyonlarını birleştiren predasyon deneyleri yapıldığı bildirilmiş olup, sonuç olarak patojen canlılığında büyük bir düşüş ile daha yüksek bir predatör hücre konsantrasyonu gözlenmiştir [130].

Periodontitis, çok sayıda gram negatif patojen içeren karmaşık bir biyofilme gömülü dental plak denilen bir polimikrobiyal enfeksiyondur [131]. Dental plak denilen iyi korunmuş karmaşık bir biyofilme gömülü *Pseudomonas aeruginosa* gibi çok sayıda gram negatif patojenlerin ortadan kaldırılmasında, *Bdellovibrio* sp. suşları başarılı bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir [123]. Van Essche ve ark. [128]'nin, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100'ün, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (periodontitise katkıda bulunan başlıca türlerden biri) saldırılabildiğini göstermişlerdir. Bir ya da daha fazla *Bdellovibrio* sp. suşlarının, periodontit ile farklı bakteri türlerine saldırılabileceği belirtilmiştir. Taramalı elektron mikroskopu ile *Bdellovibrio* sp.'nin biyofilm biyokütlesini azaltabildiği gösterilmiştir [1]. Dashiff ve Kadouri [117], *B. bacteriovorus*'un oral patojen olan *Eikenella corrodens* ve *A. actinomycetemcomitans*'ın biyofilmlerine predasyonu ile *B. bacteriovorus*'un hidroksiapatit yüzeyler üzerinde geliştirilen biyofilmleri ortadan kaldırabildiğini ve metabolik olarak inaktif biyofilmlere de saldırılabildiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada önemli bir bulgu, predatör bakterinin tükürük varlığında saldırabilme yeteneğidir. BALO gelecekte gargaralar, gibi oral bir antibakteriyel ajan olarak kullanılması açısından büyük önem taşımaktadır. Van Essche ve ark. [130]'nin, altı farklı BALO suşunun (*B. bacteriovorus* HD100, *B. bacteriovorus* 109J, *Bacteriovorus* sp. BEP2, *Bacteriovorax* sp. FCE, *Peredibacter starrii* A3.12, *Bacteriovorax stolpii* Uki2) altı farklı periodontik patojene (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*) karşı predasyon etkinliğini belirtmişlerdir. Altı farklı BALO suşundan *B. bacteriovorus* HD100, test edilen dört periodontik

patojenin canlılığını azaltmış ve en geniş konak spektrumu gösterilmiştir. *B. bacteriovorus* 109J gibi diğer suşlar, üç periodontopatojenin parçalanmasına neden olmuş, *Bacteriovorus* sp. BEP2 ve *Bacteriovorax* sp. FCE, test edilen iki patojeni etkilediği bildirilmiştir. *P. starrii* A3.12, *A. actinomycetemcomitans*'a karşı etkin olduğu, *B. stolpii* Uki2 ise test edilen herhangi bir periodontopatojen olan konak bakteriyi avlamadığı tespit edilmiştir. BALO suşlarının, oral mikrobiyotaya inoküle edilmesi sonucu, çeşitli periodontal patojenlerin sayısının hızla azaldığı bildirilmiştir [1].

BALO yüksek organizmalarda patojen değildir. Hayvan modellerinde predatör bakterileri kullanmak için birkaç araştırmada bulunulmuştur: Nakamura [132], *Shigella flexneri*'nin neden olduğu keratokonjonktivitin tavşanda *Bdellovibrio* sp. ile etkili bir şekilde tedavi edildiğini, ancak tavşanların bağırsak yollarındaki patojenlere karşı BALO kullanımının başarısız olduğunu bildirmiştir [133]. *Shigella* sp. ile enfekte olan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarına enjekte edilen predatör bakterinin, *Shigella* sp.'ye etki ettiği bildirilmiştir [134]. Bir diğer çalışmada *Salmonella enteritidis* ile enfekte olan tavuklara, *B. bacteriovorus* oral yollarla verilmiş ve tavukların gastrointestinal sistemlerinde olumlu bir iyileşme gözlenmiş ve BALO varlığının bağırsağın genel mikrobiyotasını değiştirdiği, ancak hayvanların büyümesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı bildirilmiştir [135]. Başka bir çalışma da, *Bdellovibrio* sp.'nin hayvan dışkısından da izole edilebileceği gösterilmiştir [136]. Sığır keratokonjonktivitinin etkeni olan *Moraxella bovis* ile enfekte olan *B. bacteriovorus* 109J suşu uygulanmış ve *Moraxella bovis* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak potansiyel bir ajan olduğu belirtilmiştir [137]. *Klebsiella pneumoniae* ile enfekte olan farelere nazal yol ile *Bdellovibrio bacteriovorus* ve *Micavibrio aeruginosavorus* verilmiş, patojen bakterilerin sayısının azaldığı tespit edilmiş, sağlıklı farelere de nazal yol ile bu predatör bakteriler verilmiş ve fareler de herhangi bir akciğer problemi oluşmadığı bildirilmiştir [138]. Predatör bakterilerin tavşanların üzerinde toksik etkileri araştırılmış, tavşanların gözlerine dört gün boyunca fizyolojik tuzlu su, vankomisin, *M. aeruginosavorus*, *B. bacteriovorus* HD100 ve *B. bacteriovorus* 109J solüsyonları damlatılmış ve tavşanlarda herhangi bir toksik etki gösterilmemiştir. Ayrıca *B. bacteriovorus* ve *M. aeruginosavourus*'un insan kornea stromal keratositleri için toksik olmadığı bulunmuş, bununla birlikte proinflamatuvar kemokin IL-8'in

üretmesini sağladığı, ancak IL-1 β üretimine neden olmadığı tespit edilmiştir [139]. Predatör bakterilerin canlı antibiyotikler olarak kullanımını göz önünde bulundurmak için, bunların insan hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak önemlidir. *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J ve HD100 suşları ile *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13 suşunun, beş farklı insan hücre hattına (insan keratinositleri, insan karaciğer epitel hücreleri, insan böbrek epitel hücreleri, insan dalak monositleri, insan kanı ile aktive olan makrofajlar) doğrudan maruz kalması sonucu, ölçülebilir herhangi bir sitotoksik veya enflamatuvar yanıt ortaya çıkarmadığı bildirilmiştir [140].

BALO'nun fitopatogenlere karşı potansiyelini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. BALO, çeltik tarla suyundan *Xanthomonas oryzae*'yı etkili bir şekilde ortadan kaldırmış ve topraktan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* popülasyonlarının hızlı düşüşüne neden olduğu belirtilmiştir [28]. Soya fasülyesi rizosferinden izole edilen BALO, *Pseudomonas glycinea*'nın neden olduğu bakteriyel yanıklığı kontrol etmek için kullanıldığı gösterilmiştir [37]. Patatesin yumuşak çürükçül ve siyah leke hastalığını kontrol etmek için araştırmada bulunulmuştur [141]. Antagonistik *Pseudomonas fluorescens* ile Çin lahanası rizosferinden *Bdellovibrio* sp.'nin izolasyonu gerçekleştirilmiştir [27]. *Bdellovibrio* sp.'nin bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir [142].

Bdellovibrio sp.'nin doğal su sistemlerinin kendiliğinden arındırılmasında bir rolü önerilmiştir [32]. *Bdellovibrio* sp., belirli kimyasallara ve metallerle karşı oldukça hassas olduklarından, sudaki bileşikler için indikatör olarak kullanılmıştır [143]. Ekolojide tehlikeli kirletici maddelerin (üre, fenol, diüron ve kadmiyum iyonlarının) çeşitli konsantrasyonlarında bu bakterilerin fizyolojik aktiviteleri incelenmiş ve kirleticiler varlığında elimine olmadıkları gösterilmiştir [144]. Bir başka çalışmada, ekolojik olarak tehlikeli kirleticilerden ağır metal ve kadmiyumun, *Bdellovibrio bacteriovorus* üzerindeki etkisi incelenmiş ve ekolojik olarak sağlam bir biyoteknolojinin geliştirilmesinde temel öneme sahip olabileceği gösterilmiştir [145]. Önemli çevresel kirleticiler olan kadmiyum ve diüron, *Bdellovibrio bacteriovorus* üzerindeki etkileri incelenerek, bu predatör ekosistemlerin biyolojik olarak korunmasına katkı sağladığı gösterilmiştir [146].

Atık su tesislerinde kullanılan membran biyoreaktörlerinde en önemli problem mikroorganizmaların filtreler üzerinde biyofilm oluşturmalarıdır. Fiziksel ve kimyasal temizleme yöntemleri sık sık filtrelerin temizlenmesinde kullanılmaktadır.

BALO'ın atık su tesislerindeki membran filtrelerin üst yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasını yok ettiği [147], gram negatif bakterilerin sayısını azalttığı tespit edilmiştir [46]. Özkan ve Yılmaz [148], *Bdellovibrio bacteriovorus*'un aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı %39 oranında temizlediği ve bu predatör bakterilerin istenmeyen biyofilm oluşumunu engelleyebileceğini göstermişlerdir. Kanalizasyonda aktif çamurdan, biyoliz işlemine yardımcı olmak amacıyla, BALO izole edildiği bildirilmiştir. Konak bakteri olarak *Aeromonas* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Raoultella* sp. ve *Escherichia* sp. kullanılarak, aktif çamurdan 30 BALO izolatu izole edilmiştir [149].

Temel genetik parçalar geliştirerek, pratik uygulamalar için predatör bakterilerde genetik manipülasyon deneyleri yapılmıştır. Gen ekspresyonunu kontrol etmek için, *Bdellovibrio bacteriovorus*'ta predasyon esnasında teofilinle aktive olan ribozalterler tanımlandığı bildirilmiştir. *Escherichia coli*'ye ribozalterler yerleştirilmiş ve mühendislik suşunun daha hızlı bir predasyon kinetiği gösterdiği belirtilmiştir [150]. Predatör *B. bacteriovorus* 109J ve *M. aeruginosavorus*'un konak *Klebsiella pneumoniae* ile kültürlenmesi sonucu, konak-predatör etkileşiminin genetik analizine bakılmış ve bu etkileşim sırasında konakta çok az genetik varyasyon ve yatay olarak aktarılan kromozomal DNA kanıtı görüldüğü bildirilmiştir [151].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Su ve Toprak Numuneleri

Bu çalışmada BALO'nun izolasyonu için örnekleme alanı olarak su ve toprak numuneleri kullanılmıştır. Çalışmada su numuneleri, Mayıs 2016-Haziran 2019 tarihleri arasında 30 kez olmak üzere Manisa Saruhanlı Atık Su Arıtma Tesisi'ndeki (Şekil 3.1.) atık su numunesinden (ön çökeltim çıkış suyu, atık su arıtma tesisi giriş suyu ve geri devir pompa suyu) alınmıştır.

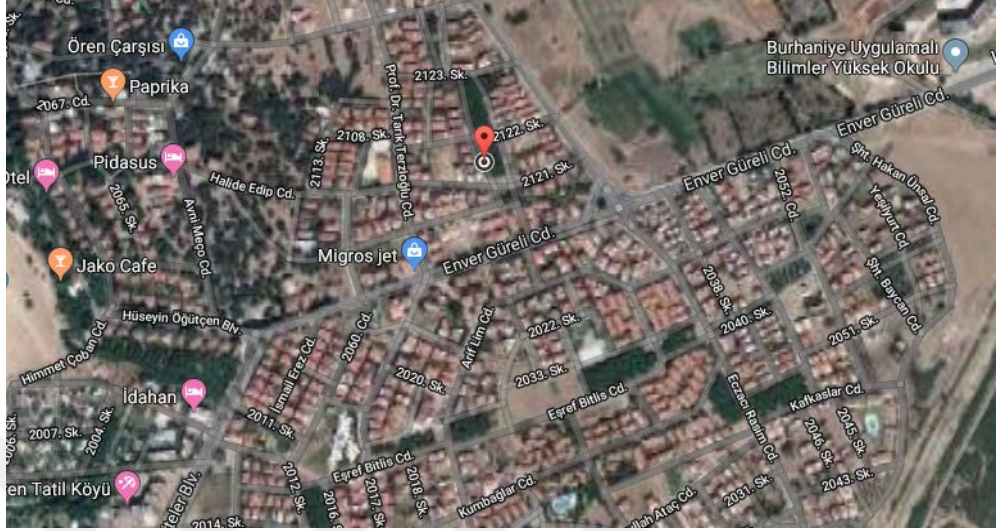
Manisa Saruhanlı Atık Su Arıtma Tesisi (Yılmaz Mahallesi, 45800, Saruhanlı/Manisa, koordinatları 38°43'10.1"N ve 27°32'21.8"E) Saruhanlı'da 12.879 m² alana kurulmuş ve bu tesiste; giriş terfi merkezi, anaerobik havuzu, havalandırma havuzu, son çökeltme havuzu, çamur susuzlaştırma ünitesi, geri devir ve fazla çamur pompa istasyonu, UV dezenfeksiyon yapısı, çamur tankı, blower binası ve idari bina bulunmaktadır. Bu tesisin günlük debisi 3.000 m³/g ile 5.040 m³/g arasındadır. Proses tipi ise uzun havalandırılmalı aktif çamurdur. Numuneler 250 ve 500 mL steril kapaklı borasilikat şişelerde, soğuk zincir koşullarında bekletmeksizin laboratuara getirilmiştir.



Şekil 3.1. Manisa Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisinin Genel Görünümü.

Çalışmada toprak numuneleri ise, Balıkesir Burhaniye/Örendeki (39°29'58"N ve 26°56'27"E) (Şekil 3.2.) elma ve erik ağaçları bulunan meyve bahçelerinden Nisan 2016 tarihinde ve İzmir Selçuk/Barutçu köyü (38°0'43.27"N ve 27°19'38.02"E) (Şekil 3.3.) ile İzmir Selçuk/Zeytinköyde ki (37°59'28.41"N ve 27°16'56.92"E) (Şekil

3.3.) kiraz ve ayva ağaçları bulunan meyve bahçelerinden Aralık 2017 tarihinde, steril polietilen torbalara konularak soğuk zincir koşullarında bekletmeksizin laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen numuneler hemen işleme alınmış, hemen işleme alınamayan numuneler 4 °C’de buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.2. Toprak Örneklerinin Alındığı Balıkesir Burhaniye/Ören Mevkisinin Görünümü (39°29'58"N ve 26°56'27"E).



Şekil 3.3. Toprak Örneklerinin Alındığı Diğer Lokaliteler A) İzmir Selçuk/Barutçu Köyü Mevkisi (38°0'43.27"N ve 27°19'38.02"E), B) İzmir Selçuk/Zeytinköyü Mevkisi (37°59'28.41"N ve 27°16'56.92"E).

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar

Çalışmada; Hepes Fisher Scientific BP310-500, Kalsiyum Klorid Dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) BioShop CCL302.1, Magnezyum Klorid Heptahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Merck 8.14733.0100, Agar Oxoid LP0011, Nutrient Broth Merck 1.05443, Yeast

Ekstrakt Oxoid LP0021, Pepton Oxoid LP0037, NaCl Gerbu, NaOH Merck, Tris (Hidroksimetil amino metan) Sigma T-6068, Gluteraldehit Merck 1.04239.0250, Agaroz Sigma A9539, TAE Tamponu Fisher Scientific BP1332-1, Gliserol Sigma 15524-1L-R olarak kullanılmıştır.

Besiyerleri

Besiyeri 1: HM Broth

Hepes	0.5	Gram (g)
Kalsiyum Klorid Dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.6	Mililitre (mL)
Magnezyum Klorid Heptahidrat (MgCl ₂ .7H ₂ O)	0.33	mL
Distile Su	100	mL
pH	7.4	

Besiyeri 2: HM Agar

Hepes	0.5	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.6	mL
MgCl ₂ .7H ₂ O	0.33	mL
Agar	1.5	g
Distile Su	100	mL
pH	7.4	

Besiyeri 3: Dilüe Nutrient (DN) Agar

Nutrient Broth	0.08	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.6	mL
MgCl ₂ .7H ₂ O	0.33	mL
Agar	1.5	g
Distile Su	100	mL
pH	7.4	

Besiyerlerinin pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlanmıştır. BALO izolasyonunda kullanılan bu besiyerleri formülasyonlarına göre hazırlanmış olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Ayrıca bu besiyerlerinin içerisinde bulunan 'CaCl₂.2H₂O ve MgCl₂.7H₂O' otoklavlanmadan, 0.2 µm por çaplı steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Agar; yarı katı halde 0.6 g, katı halde ise 1.5 g olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 4: Yeast Ekstrakt Pepton (YP) Agar

Yeast Ekstrakt	0.3	g
Pepton	0.06	g
Tris-HCl	0.05	Molarite (M)
Agar	1.2	g
Distile Su	100	mL
pH	7.5	

Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.5'e ayarlanmıştır. İzolasyonda kullanılan bu besiyeri formülasyona göre hazırlanmış olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Agar, yarı katı halde 0.6 g, katı halde ise 1.5 g olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Nutrient Broth (NB)

Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	2	g
Lab-Lemco Tozu	1	g
Sodyum Klorür (NaCl)	5	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.4±0.2	

Ticari olarak besiyeri (Oxoid CM0001)'den 13 g/L hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'a ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde ve saklanmasında kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 6: Nutrient Agar (NA)

Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	2	g
Lab-Lemco Tozu	1	g
NaCl	5	g
Agar (Oxoid)	15	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.4±0.2	

Ticari olarak besiyeri NB (Oxoid CM0001)'den 13 g/L ile Agar'dan 15 g/L hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde ve saklanmasında kullanılan bu besiyerinin genel

içeriği yukarıda verilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 7: Luria Broth (LB)

Kazein Pepton	10	g
Yeast Ekstrakt	5	g
NaCl	10	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.5	

Ticari olarak besiyeri (Fisher BioReagents BP9723-500)'den 25 g/L hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.5'e ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde ve saklanması için kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 8: Luria Agar (LA)

Pepton	10	g
Yeast Ekstrakt	5	g
NaCl	10	g
Agar (Oxoid)	15	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.5	

Ticari olarak besiyeri LB (Fisher BioReagents BP9723-500)'den 25 g/L ile Agar'dan 15 g/L hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.5'e ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde ve saklanması için kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiş olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 9: Eosin Metilen Blue Agar (EMB)

Pepton	10	g
Laktoz	5	g
Sükroz	5	g
Potasyum Fosfat (K ₂ HPO ₄)	2	g
Eosin Y sarımsı	0.4	g
Metilen Mavisi	0.07	g
Agar	13.5	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.1±0.2	

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.01347)'den 35.97 g/L hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.1'e ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiş olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 10: King B Agar (KBA)

Pepton	20	g
Dipotasyum Fosfat (K ₂ HPO ₄)	1.5	g
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	1.5	g
Agar	14	g
Gliserol (Sigma 15524-1L-R)	10	mL
Distile Su	1000	mL
pH	7.0±0.2	

Ticari olarak besiyeri KB (Pronadisa Cat:1532.00)'dan 37 g/L ile Gliserol'den 10 mL hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.0'a ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiş olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 11: Cetrime Agar (CA)

Jelatin Kaynaklı Pepton	20	g
MgCl ₂ .7H ₂ O	1.4	g
Potasyum Sülfat (K ₂ SO ₄)	10	g
Setrimid	0.3	g
Gliserol (Sigma 15524-1L-R)	10	mL
Agar	13.6	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.0±0.2	

Ticari olarak besiyeri CA (Merck 1.05284.0500)'dan 45.3 g/L ile Gliserol'den 10 mL hazırlanmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH ile 7.0'e ayarlanmıştır. Konak bakterilerin aktive edilmesinde kullanılan bu besiyerinin genel içeriği yukarıda verilmiş olup, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Çözeltiler ve Kimyasallar:

Kristal Viyole Solüsyonu

Kristal viyole	1	g
Asit-Fenik Kristali	2	g

%95'lik Etil Alkol	10	mL
Ultra Saf Su (dDH ₂ O)	100	mL

Konak bakterilerin preparasyon çalışmasında, Gram boyamada, Kristal viyole solüsyonu kullanılmıştır. Kristal viyole ile Asit-fenik kristali porselen kapta havan yardımı ile ezilerek, alkolde çözülmüş ve üzerine 100 mL distile su eklenmiştir.

İyodür Solüsyonu

Potasyum İyodür	2	g
İyot	1	g
dDH ₂ O	300	mL

Konak bakterilerin preparasyon çalışmasında ve Gram boyamada İyodür solüsyonu kullanılmıştır. İyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun havan içerisinde iyice ezilip karıştırılarak, distile su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Koyu renkli şişelerde saklanmıştır.

Safranin Solüsyonu

Safranin	0.56	g
dDH ₂ O	300	mL

Konak bakterilerin preparasyon çalışmasında ve Gram boyamada Safranin solüsyonu kullanılmıştır. Safranin solüsyonu, distile su içerisinde çözüldürülerek hazırlanmıştır.

Tamponlar:

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS, %0.9)

NaCl	9	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.0	

Tamponun pH'sı 1 N NaOH ile ayarlanmıştır. Konak bakterilerin yoğunluğunun ölçülmesi ile ilgili yapılan seyreltmelerde tampon olarak fizyolojik tuzlu su kullanılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

NaOH (1 N)

Sodyum Hidroksit (NaOH)	20	g
dDH ₂ O	500	mL

Bu tampon formülasyonuna göre hazırlanmıştır. Besiyerlerin, çözeltilerin ve solüsyonların pH ayarlanmasında kullanılmıştır.

Tris-HCl Tamponu (0.05 M)

Tris	6.057	g
dDH ₂ O	1000	mL
pH	7.6	

Tris tamponu, formülasyonuna göre hazırlanmış, daha sonra derişik HCl ile pH istenilen değere getirilmiştir. Bu tampon izolasyon için kullanılan Yeast Ekstrakt Pepton Agar besiyeri içerisinde katılmıştır.

Gluteraldehit Solüsyonu (%2.5)

%25 Gluteraldehit	15	mL
dDH ₂ O	135	mL

150 mL %2.5 Gluteraldehit solüsyonu, elektron mikroskopisinde fiksatif olarak kullanılmıştır.

Etil Alkol Solüsyonu (%)	Etil Alkol (%100) (mL)	dDH ₂ O (mL)
30	45	105
40	60	90
50	75	75
60	90	60
70	105	45
80	120	30
90	135	15
100	100	0

Hazırlanan etil alkol serileri, elektron mikroskopisinde numunelerin filtrelere tespit amacıyla kullanılmıştır.

Agaroz Jel (%1)

Agaroz	1	g
1x TAE tamponu	100	mL

1 g agaroz tartılarak, 100 mL TAE tamponuna alınmış, eriyinceye kadar mikrodalga fırında bekletilmiştir. 65 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 4 µL nükleik asit boyası (GeneMark) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanmış, uygun şekilde elektroforez tankına dökümü yapılarak donması beklenmiştir. İzolatların DNA ve PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde kullanılmıştır.

TAE Tamponu (Tris-Asetat-EDTA, 50X)

Tris-Asetat (Hidroksimetil amino metan- C ₂ H ₃ O ₂ ⁻)	40	mM
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	1	mM
dDH ₂ O	980	mL
pH	8.3±0.1	

Beher içerisine 20 mL 50X TAE buffer ile 980 mL dDH₂O konulup, iyice karıştırılmış, pH 8.3'e ayarlanmıştır. İzole edilen DNA ve PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler ve Stoklarının Hazırlanışı:

Kullanılan Primerler	Stok (nmol/μL)
BbsF216 (forward primer: 5'-TTTCGCTCTAAGATGAGTCCGCGT-3') (İnvitrogen)	41.5 /415
BbsR707 (reverse primer: 5'-TTCGCCTCCGGTATTCCTGTTGAT-3') (İnvitrogen)	50.8 /508
Bac676F (forward primer:5'-ATTCGCATGTAGGGGTA-3') (Eurofins)	836 /100
Bac1442R (reverse primer:5'-GCCACGGCTTCAGGTAAG-3') (Eurofins)	775 /100
Per676F (forward primer:5'-ATTCACGTGTAGGGGTA-3') (Eurofins)	815/100
Per1443R (reverse primer: 5'-AGTCACGTCTTAAAATGAAA-3') (Eurofins)	721/100
Mic431F (forward primer:5'-AAGCTCTTTTAGGTGTGAAA- 3') (Eurofins)	672/100
Mic996R (reverse primer:5'-TGAAAGTCAAAGGAGGAT- 3') (Eurofins)	603/100

Firma tarafından sentezlenen primerlerin özelliklerine göre; yukarıda belirtilen miktarlarda PCR grade su, her bir primer için ayrı ayrı 100 μmoL primer stoğu şeklinde hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok solüsyonlarından 10 μL pipetle çekilip, içinde 90 mL PCR grade su olan steril eppendorflara aktarılıp, 10 μmoL/μL olarak kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları aşağıda ki tabloda (Tablo 3.1.) listelenmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Markaları

Kullanılan Cihaz	Marka
Otoklav	Nüve Ot032
Etüv	Heraeus B12
Çalkalayıcı İnkübatör	Wisecube Fuzzy Cont Sys
Vorteks	Biosan Fvl-2600n
Spektrofotometre	Varian Carry50 Uv-Visible
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3-18K
Santrifüj	Sigma 1-15
Su banyosu	Memmert
pH metre	Hanna-HI-221
Hassas Terazi	Sartorius Gc1603 S-Oce
Mikrodalga	Beko İntellowave
PCR Thermal Cyclers	Applied Biosystems Veriti
Elektroforez Tankı	Major Science
Güç Kaynağı	Consort EV243
Jel Görüntüleme Cihazı (UV transillüminatör)	gLite gel scanner
Nanodrop	Thermo 2000c
Işık Mikroskobu	Olympus-Cx21fs1 Biokular
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Thermo Scientific Apreo S
Kaplama Cihazı	Leica EM ACE600

3.1.4. Bakteri Kültürleri

Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinden *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile konak bakterisi *E.coli* ML35 (ATCC 43827) İsrail Hebrew Üniversitesi Bitki Patolojisi ve Mikrobiyolojisi bölümünden, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile konak bakterisi *E.coli* S17 (ATCC 47055) Kocaeli Gebze Üniversitesi Çevre Mühendisliği bölümünden, konak bakterilerden *E.coli* (ATCC 29998) ve *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (ICMP 567) ve *Erwinia*

amylovora (RK 228) Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden, *E.coli* DH5 α (ATCC 68361) ve *E.coli* Stbl3 ise Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünden temin edilmiştir.



3.2. Yöntem

3.2.1. Atık Su Numunelerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametrelerinin Eldesi

Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisi giriş suyu numunelerinin pH, sıcaklık, askıda ki katı madde, kimyasal oksijen ihtiyacı ve biyolojik oksijen ihtiyacı gibi bazı fiziko-kimyasal parametreleri Manisa Su ve Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü (MASKİ) tarafından Tesisin Laboratuvarlarından tedarik edilmiştir.

3.2.2. *Bdellovibrio* sp. Suşlarının Aktive Edilmesi

Bdellovibrio bacteriovorus HD100 aktive edilmesi için uygun besiyeri DNB (Dilüe Nutrient Broth) ve HM ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyelerini hazırlamadan önce konak bakterileri *E.coli* ML35 ve *E.coli* S17 NA (Nutrient Agar) üzerinde aktive edilmiştir. Aktive edilen konak bakteriler, steril tüplerde hazırlanan LB (Luria Broth) besiyerine aşılanmıştır. Aşılanan bu tüpler 37 °C 24 saat 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiş ve absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür.

Predatör bakterilerin bir kısmı sıvı besiyerinde, bir kısmı katı besiyerinde temin edilmiştir. Katı besiyerinde *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 suşunun üreyip üremediğini kontrol amacıyla, 2 mL DNB besiyeri içeren 10 mL tüplerin içerisine bir miktar agarlı bir parça aktarılıp, 28 °C 48 saat 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra önceden hazırlanan ve absorbansları ayarlanan konak bakteriler ile birlikte steril tüplerde hazırlanan DNB besiyeri veya HM tamponuna aşılanmıştır. Aşılanan bu tüpler 28 °C 48-72 saat 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiş ve absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür [152]. Sıvı besiyerinde temin edilen *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 suşunun ise aktive edilmesi için, ekim yaptığımız şişenin boyutuna göre (100 mL'lik bir şişe ise, 10 mL konak bakteri *E.coli* içeren) ortam hazırlanmış, onun üzerine 1 mL *Bdellovibrio* sp. suşu aşılanmıştır. *Bdellovibrio* sp. suşu ve konak bakteri bulunan tüplerin bir kısmı çalkalamalı inkübatöre 28 °C 48-72 saat 180 rpm'de inkübasyona tabi tutulurken, bir kısmı da sabit etüvde aynı sıcaklık derecesinde ve sürede inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda spektrofotometre yardımıyla tüplerdeki absorbans değerlerine bakılmıştır. Hem katı hem sıvı formdaki predatörün, konak bakteriyi kullanarak, ortamda üreyip üremediği tespit edilmiştir [153].

Daha sonra predatör ve konak bakteri bulunan tüpler, Jurkevitch [152]'de açıklandığı şekilde bir sonraki denemelere tabi tutulmuştur. Bu denemelerde ise HM üst agar (yarı katı agar) ve HM alt agar birlikte kullanılmıştır. 10 mL'lik test tüplerinde bulunan 4 mL HM üst agar'ın içine 250-300 µL konak bakteri *E.coli* ML35 ve 100 µL *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 aşılansmıştır. Ardından tüpler vorteks ile karıştırılmış ve hızlı bir şekilde HM alt agar bulunan besiyerinin üzerine dökülmüştür. HM üst ve alt agarı içeren petriler, yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında katılaşımaya bırakılmış, sonrasında petriler parafilmle kaplanmıştır. Petriler 28 °C'de 3-8 gün boyunca inkübe edilmiş ve gelişen litik plaklar düzenli olarak kontrol edilmiştir.

Bdellovibrio sp. suşlarıyla beraber gelen konak bakteri yoğunluğunun tespiti amacıyla preparatları hazırlanarak Gram boyama işlemine alınmış ve ışık mikroskobunda immersiyon yağı ile 100x'de incelenmiştir.

3.2.3. Konak Bakterilerin Aktive Edilmesi

E.coli ML35, *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Erwinia amylovora*, *E.coli* DH5α ve *E.coli* Stb13 suşları aşağıda belirtildiği şekilde uygun ortamlarda aktive edilmiştir.

Konak bakteriler *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *E.coli* DH5α, *E.coli* Stb13 ve *Pseudomonas aureginosa* Nutrient Broth'lara aşılansarak 37 °C'de 24 saat; *E.coli* ML35, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Erwinia amylovora* yine NB'da 28 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak gelişen tüplerden Nutrient Agar'a ekimleri yapılarak aynı süre ve sıcaklıklarda inkübe edilmiştir.

Katı ortama alınan ve gelişen *E.coli* ML35, *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *E.coli* DH5α ve *E.coli* Stb13 konak bakterileri doğrulamak için EMB (Eosin Metilen Blue Agar) içeren petrilere ekimleri yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda EMB petrilerinde metalik parlak renkli koloniler *E. coli* olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer konak bakterilerden *Pseudomonas aureginosa* doğrulamak için Cetrimide Agar içeren petrilere ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda sarı renkli floresans kolonilerin varlığı açısından gözlemlenmiştir. Bir diğer konak bakteriler *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Erwinia amylovora* suşları ise King B besiyeri içeren petrilere ekilmiş, 26-28 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek, inkübasyon sonucunda krem renkli

tek koloni gelişimleri gözlenmiştir. Aktive edilen ve doğrulanan konak bakterilerden preparatlar hazırlanarak, Gram boyama işlemi uygulanmış ve ışık mikroskopunda immersiyon yağı ile 100x’de incelenmiştir.

3.2.3.1. Konak Bakterilerin Stok Kültürlerinin Hazırlanması

Tüm konak bakterilerin stok kültürü için; bakteriler Luria Agar içeren petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37 °C 16-24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra inkübe edilen bakteriler Luria Broth içeren tüplere aşılanmış ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C 16-24 saat 180 rpm’de çalkalanmıştır. Tüplerde gelişen bakteri kültürlerinden 0.6 mL alınarak 0.4 mL %50’lik steril gliserol ile homojen karıştırılmış ve steril kriyojenik falkon tüplerde -80 °C’de stok kültürleri saklanmıştır.

3.2.3.2. Konak Bakterilerin Absorbans Değerlerinin Belirlenmesi

Tüm konak bakteriler Luria Agar içeren petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve inkübasyon sıcaklıkları göz önünde bulundurularak (28-37 °C) 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra katı ortamda gelişen bu bakteriler Luria Broth içeren tüplere aşılanmış ve çalkalamalı inkübatörde 28-37 °C 24 saat 180 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda sıvı kültürler seyreltme plaka yöntemi (dökme plaka) (9 mL FTS içeren tüplere 1 mL’lik sıvı kültür) ile seyreltilerek yoğunlukları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Uygun yoğunluktaki (OD_{600nm} ’de 0.75-0.85 Abs.) her bir tüpten 0.1 ve/veya 1 mL boş steril petri kaplarına aktararak, üzerine 45 °C’ye kadar soğutulmuş steril Nutrient Agar eklenerek homojen karıştırılarak donması sağlanmıştır. Sonrasında petriler 28-37 °C’de 24 saat inkübe edilerek gelişen kolonilerin sayımları yapılmıştır.

3.2.3.3. BALO İzolasyonu için Konak Bakterilerin Hazırlanması

Potansiyel konak bakteri suşları önce Luria Agar içeren petrilere ekilip, 28-37 °C’de 16-24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra katı ortamda gelişen kolonilerden öze ile 50 mL Luria Broth içeren 250 mL’lik erlenlere aktarılmıştır ve 28-37 °C 16-24 saat 180 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bakteriler eksponansiyel fazdan, duraklama fazına geçiş yapmakta ve BALO için uygun konak bakteri olarak kullanılabilirler. Konak bakterilerin yoğunluğu spektrofotometre ile ölçülerek sonraki BALO konak etkileşimleri için kullanılmıştır.

3.2.4. Diferansiyel Santrifüjleme ve Filtrasyon ile BALO İzolasyonu (Çift Katmanlı Agar Plaka Deneyi)

Soğuk zincir altında laboratuara getirilen kompozit toprak numunelerinin herbirinden 10 gr hassas terazide tartılıp, 100 mL distile su ile 1:10 oranında toprak/steril su dilüsyonu hazırlanmıştır. Atık su numuneleri ise 50 mL miktarlarda steril erlenlere aktararak işleme alınmıştır.

Hazırlanan toprak/su ve atık su numuneleri 25 °C 30 dk 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde karıştırılmıştır. Bu numunelerden 2 mL alınarak steril eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorflar önce 4 °C 5 dk 500 xg (2335 rpm)'de santrifüjlenmiş ve supernatantlar yeni steril eppendorflara alınarak, 4 °C 20 dk 27.000 xg (17.161 rpm)'de tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen supernatantlar steril pipetle dikkatlice uzaklaştırılmış ve kalan pelletlere izolasyon şansını arttırmak için çoklaştırma işlemi uygulanmıştır. Toprak/su dilüsyonları ve atık su için ayrı ayrı yapılan bu işlem sonucu steril eppendorfta toplanan pelletler 1-2 mL soğuk HM tamponunda süspande edilmiş, vorteksle pelletin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi gerçekleştikten sonra örnekler şırınga ile çekilerek 1.2 µm por çaplı filtrelerden geçirilmiş ve işlem yapılıncaya kadar kısa bir süre 4 °C'de bekletilmiştir.

Eppendorfta ki süzütünün seri dilüsyonları içerisinde 4.5 mL HM tamponu bulunan 5 tüp için seyreltme işlemi uygulanmıştır. Seyreltme işleminden sonra farklı besiyerleri (HM agar, DNB agar ve YP agar) kullanılarak çift katmanlı agar plak yöntemi uygulanmıştır. 10 mL test tüplerinde bulunan 4 mL üst agar üzerine 500 µL uygun konak bakteri ve seyreltilmiş 500 µL süzüntü eklenip, tüpler hızla vortekslenerek daha önceden hazırlanan petride ki alt agar üzerine dökülmüştür. Petriler 1 saat oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılarak sonrasında ters vaziyette 28 °C'de 2-7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında litik plak oluşturan petriler değerlendirilmiştir [19, 152].

3.2.4.1. Saflaştırma Deneyi

Çift katmanlı agar plak deneyinden yaklaşık 1 hafta sonra katı kültürlerde oluşan litik plaklardan (litik zon çapı genişleyen), steril öze ile dikkatlice örnek alınmış ve içinde steril 1-2 mL HM bulunan steril eppendorflarda süspande edilmiş mikrobiyal yükü azaltmak için 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtrat HM tamponu içeren dilüsyonlara alınarak tekrar uygun konak bakteriler ile

birlikte çift katmanlı agar plak uygulamalarında kullanılmıştır. Bu işlem en az 1-2 kez tekrar edilerek nihayetinde oluşan plaklar saf klon olarak kabul edilmiştir [152].

3.2.4.2. Lizat Deneyi

3.2.4.1.'de verilen yöntemle saflaştırma sonucu elde edilen petri plaklarından steril öze ile alınarak, steril 2 mL HM tamponuna aktarılmış, vortekslenerek, 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Sonrasında bu BALO filtratından 500 µL alınarak steril 4 mL HM tamponuna aktarılmış ve üzerine de duraklama fazında bulunan uygun konak bakteriden 500 µL ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan konak-predatör karışımı 28 °C 24-72 saat 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.4.3. Litik Plaklar ile Biyokontrol Deneyi

Saflaştırılan ve kendi konak bakterilerine karşı litik plak oluşturan saf klonlar Bölüm 3.2.4. (çift katmanlı agar plaka deneyi) ve 3.2.4.2. (lizat deneyi)'de açıklanan yöntemler ışığında diğer konak bakterilerle beraber işleme alınmıştır. Bu sayede daha önceki denemelerde ve kendi uygun konak bakterilere karşı lizis yapan predatör organizmaların farklı konak bakterilere karşı biyokontrol ajanı olup olmadığı belirlenmiştir.

3.2.4.4. Litik Plakların Sayımı

Atık su numunelerinden konak bakteri *E.coli* ML35 kullanılarak yapılan çift katmanlı agar plak deneyleri ile izole edilen ve mevsimsel olarak belirlenen ortalama litik plaklar, seyreltme plaka sayım yöntemi ile hesaplanmıştır. Hesaplama ardışık iki seyreltmeden yapılan ekim sonuçlarıyla elde edilen litik plakların aritmetik ortalamasının alınarak dilüsyon faktörü ile çarpılması sonucu belirlenmiştir. 30-300 arasında litik plak gözlemlenen petri dikkate alınmıştır.

3.2.4.5. BALO'ın Gliserol Stoklarının Hazırlanması

İzolasyon ve litik plakların saflaştırılmasıyla elde edilen klonlar steril 1-2 mL HM tamponu bulunan eppendorflara steril öze ile aktararak süspand edilmiş ve 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtratlardan 0.6 mL alınarak, 0.3 mL %50 steril gliserol ile kriyojenik falkon tüplerinde vortekslenerek karıştırılmıştır. Bir diğer uygulanan stok yönteminde ise, filtratlardan 0.3 mL alınarak, uygun duraklama fazında bulunan konak bakteriden 0.3 mL ve %50 steril gliserolden 0.3

mL ile birlikte kriyojenik falkon tüplerinde vortekslenerek karıştırılmıştır. Her iki şekilde hazırlanan stok kültürler -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.5. Litik Plakların Faj Kaynaklı Olup-Olmadığının Belirlenmesi

Elde edilen litik plakların belirlenen izolasyon prosedürünün haricinde, predatör bakteri mi yoksa bakteriyofaj tarafından mı kaynaklandığını belirlemek amacıyla faj izolasyon denemeleri yapılmıştır. Faj izolasyon denemeleri için BALO izolasyonunda uygulanan diferansiyel santrifüjleme ve filtrasyon deneyi (Bölüm 3.2.4.) uygulanmış, tek fark ikinci santrifüjleme basamağında eppendorfta numunede oluşan pelletlerle değil, supernatantlarla deneye devam edilmesidir.

3.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Uygun koşullarda önce katı kültürde (24 saat), daha sonra sıvı kültürde (24 saat) inkübe edilen duraklama fazında bulunan konak bakterilerin (50 mL) üzerine, yine uygun koşullarda üretilen BALO lizatları (5 mL) aşılıp, 28 °C 16-18 saat 180 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra oluşan bu kültürler 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Kültürün bulunduğu bu filtreler birkaç kez steril distile su ile yıkanmış ve %2.5 gluteraldehit solüsyonunda 1 gece fikse edilmiştir. Ardından filtreler %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 ve %100 alkol serilerinden 10’ar dakika süreyle geçirilmiş ve kurutmak için 35 °C’de 4-5 saat etüvde bekletilmiştir. Daha sonra filtrelerin bulunduğu plastik kesilmiş, filtre kağıtları çıkarılmış ve tekrar tamamen kuruması için 35 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Kurutulan filtre kağıtları, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (Ege MATA) hizmet alımı karşılığında, alimünyum örnek kabına yerleştirilmiş, altınla kaplanmış, 7.5 kV ile taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir [27, 154].

3.2.7. Moleküler Sistemik Çalışmalar

3.2.7.1. BALO Genomik DNA’larının İzolasyonu

Genellikle litik plaklardan, lizatlardan ve atık su numunesinden Genomik DNA, Geneaid firmasının belirttiği koşullara uygun bir şekilde ‘Geneaid: Presto Mini gDNA Bacteria Kit (GBB100)’ izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre prosedür aşağıda belirtildiği gibidir:

1. Litik plaklar steril öze ile petri kaplarından alınmış, steril eppendorflara aktarılmış, lizat ya da atık su numunesinden ise 300 µL alınıp, steril eppendorflara aktarılmıştır,

2. Üzerine 180 µL kitin bileşiminde bulunan GT tamponundan ilave edilmiştir,
3. Hızlıca vortekslenmiştir,
4. Üzerine 20 µL Proteinaz K (protein çöktürme solüsyonu) eklenerek, 60 °C'de 15 dk inkübe edilmiş, inkübasyon sırasında eppendorflar 3 dk'da bir çalkalanmıştır,
5. Süre sonunda üzerine 200 µL GB tamponundan (lisis solüsyonu) ilave edilerek, 10 sn vortekslenmiş, 3 dk'da bir çalkalanarak 70 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir (Bu sırada Elüsyon tamponunu da 70 °C'de inkübasyona bırakılmıştır),
6. Üzerine 200 µL mutlak etanol ilave edilmiştir,
7. Hızlıca vortekslenmiştir,
8. 2 mL toplama tüpü GD kolonuna yerleştirilmiş, eppendorflarda ki karışım GD kolonuna aktarılmış ve 14-16.000 xg 2 dk santrifüjlenmiştir,
9. 2 mL toplama tüpü atılmış, tekrar GD kolonuna yeni 2 mL toplama tüpü yerleştirilmiştir,
10. GD kolonuna 400 µL W1 tamponu ilave edilmiş, 14-16.000 xg 30 sn santrifüjlenmiş ve toplama tüpünde ki akış sıvısı atılmış, GD kolonu 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiştir,
11. Üzerine 600 µL yıkama solüsyonu (1 mL yıkama tamponu + 4 mL etanol) ilave edilmiş, 14-16.000 xg 30 sn santrifüjlenmiş ve toplama tüpünde ki akış sıvısı atılmış, GD kolonu 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiş, 14-16.000 xg 3 dk santrifüjlenmiştir,
12. GD kolonu 1.5 mL steril eppendorflara aktarılmış, üzerine önceden 70 °C'de inkübasyona bırakılan Elüsyon tamponundan 50 µL ilave edilmiş, 3 dk bekletilerek 14-16.000 xg 30 sn santrifüjlenmiştir.

Elde edilen DNA'lar PCR reaksiyonları gerçekleştirilene kadar, -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktarı ve saflığı, nanodrop (Thermo 2000c) ile 260 ve 280 nm'lerdeki absorbansları dikkate alınarak belirlenmiştir. DNA örneklerinde, 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri (A260) DNA miktarını ve 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri (A280) protein miktarını göstermektedir. A260/280 oranı 1.90 veya yakın olan DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen DNA örneklerinin saflık kontrolleri agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir. Buna göre; DNA agaroz jel elektroforezi %1'lik agaroz, 1xTAE tampon çözeltisi ve 4 µL nükleik asit boyası (Genmark) ilave edilerek hazırlanmış, ilk kuyucuğa DNA marker (1 kb DNA Ladder, Geneaid), diğerlerine DNA örneği aktarılarak [1.2 µL (6xYükleme boyası, Biotechrabbit) + 5 µL DNA örneği] 100V 45 dk süreyle jelde yürütülmüştür. Jelde yürütülen DNA örnekleri, UV transillüminatörde (görüntüleme cihazında) incelenmiş, tek bant oluşturan saf DNA örnekleri PCR reaksiyonuna alınmıştır.

3.2.7.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu

İzolatların genomik DNA'sından 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, sekiz primer seti kullanılmıştır. Bu primerlerin (Tablo 3.2.)'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. DNA Bölgesinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primerler.

BbsF216 (forward primer:5'-TTTCGCTCTAAGATGAGTCCGCGT-3')
BbsR707 (reverse primer:5'-TTCGCCTCCGGTATTCCTGTTGAT-3')
Bac676F (forward primer:5'-ATTTTCGCATGTAGGGGTA-3')
Bac1442R (reverse primer:5'-GCCACGGCTTCAGGTAAG-3')
Per676F (forward primer:5'-ATTTTCACGTGTAGGGGTA-3')
Per1443R (reverse primer:5'-AGTCACGTCTTAAAATGAAA-3')
Mic431F (forward primer:5'-AAGCTCTTTTAGGTGTGAAA-3')
Mic996R (reverse primer:5'-TGAAAGTCAAAGGAGGAT-3')

PCR için optimize edilen reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.3. ile optimize edilen PCR koşulları Tablo 3.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyondaki Son Konsantrasyonu	Son Hacim (µL)
PCR Buffer	10X	1X	5
MgCl ₂ *	50 mM	3 mM	3
dNTP	10 mM	0.2 mM	1
Forward Primer	10 µM	0.5 µM	2.5
Reverse Primer	10 µM	0.5 µM	2.5
Polimeraz*	5.0 U/µL	2.0 U/µL	0.4
Template DNA	10/20 ng/µL	10 ng/µL	1
PCR Grade Su	-----	-----	34.6
Toplam Reaksiyon Hacmi	-----	-----	50

*Bazı reaksiyonlarda Geneaid *Taq* DNA polimeraz kullanılmıştır. Bu enzimle beraber reaksiyonda tabloda gösterilen miktarda MgCl₂ eklenmiştir. Bazı reaksiyonlarda ise, ThermoScientific, Dream *Taq* DNA polimeraz (EP0702) kullanılmıştır. Bu enzimle beraber gelen PCR buffer bileşiminde 20 mM MgCl₂ bulunduğundan dolayı ayrıca reaksiyon bileşimine MgCl₂ eklenmemiştir.

Tablo 3.4. PCR ile Ürün Eldesi İçin Belirlenen Koşullar.

Adım	Sıcaklık	Süre	Çevrim
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	4 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Bağlanma	50 °C	1 dk	35
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1

Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'de verilen koşullarla Veriti Applied Biosystems Thermal Cycler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Buna göre; PCR agaroz jel elektroforezi %1'lik agaroz, 1xTAE tampon çözeltisi ve 4 µL nükleik asit boyası (Genmark) ilave edilerek hazırlanmış, ilk kuyucuğa DNA marker (100 bp DNA Ladder, Geneaid), diğerlerine PCR örneği aktararak [1.2 µL (6xYükleme boyası, Biotechrabbit) + 5 µL PCR örneği] 100V 40 dk sürede örnekler jelde yürütülmüştür. Jelde yürütülen PCR örnekleri, UV transillüminatörde incelenmiş, tek bant oluşturan saf PCR örnekleri sekans analizleri yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizleri GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderilmiş ve firmadan 16S rRNA kromatogramları sağlanmıştır.

3.2.7.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması

16S rRNA ve sekans analizleri yurtdışında GATC Biotech (Almanya) firmasına hizmet alımları kapsamında yaptırılmıştır. Elde edilen ham sekans verileri degenaratif bazların karşılığı için, BioEdit Sequence Alignment Editor programı (V, 7.2.5.) ile düzenlenmiş, muhtemel türlerin belirlenmesi için gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak amacıyla MEGA X (V, 10.0.4) programı kullanılarak blastlanmıştır. 16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramları oluşturmak için, gen bankasından elde edilen *Bdellovibrio* sp., *Bacteriovorax* sp., ve *Peredibacter* sp. tip örneği 16S rRNA gen dizileri ile test örneklerinin gen dizileri karşılaştırılarak, elde edilen BALO'nun tür veya cins seviyesinde tanılamaları yapılmıştır. MEGA X (V, 10.0.4) programı yardımıyla Neighbour-joining, Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak filogenetik dendogramlar oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Atık Su Numunelerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreleri

Atık su numunelerinin bazı fiziko-kimyasal parametreleri, Bölüm 3.2.1.'de açıklanan yöntemlerde belirtildiği şekilde tedarik edilmiştir. Tablo 4.1.'de ki verilere göre, 2018-2019 yılları arasında Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisi giriş suyu numunesinde kış döneminde askıdaki katı madde ve kimyasal oksijen ihtiyacının arttığı, yaz döneminde ise pH'nın arttığı gözlemlenmiş olup; sıcaklık ve biyolojik oksijen ihtiyacı ile ilgili yeterince bilgiye ulaşılamamıştır.

Tablo 4.1. 2018-2019 Yılları Arasında Örnekleme Yapılan İstasyonla (Saruhanlı Atık Su Arıtım Tesisi 'Giriş Suyu Numunesi') İlgili Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreler.

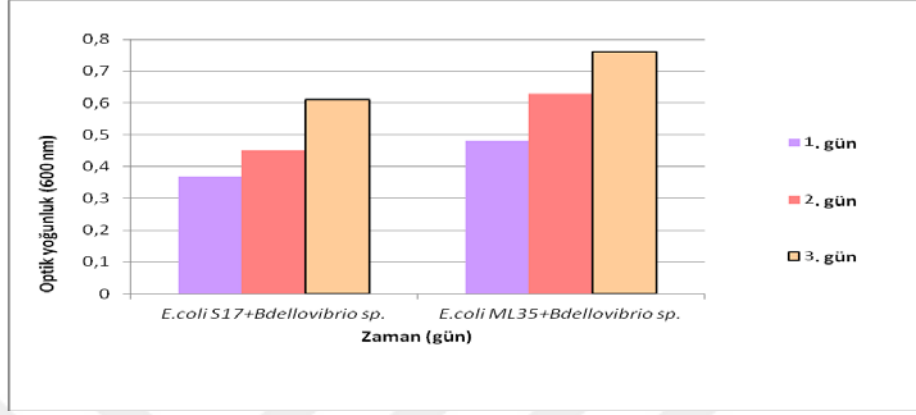
Aylar	pH	Sıcaklık	Askıdaki Katı Madde	KOİ	BOİ
Ocak*	8.12	15.3	74.2	263.1	N.D.
Şubat	7.74	13.4	184.5	223.1	N.D.
Mart	7.40	14.1	77.7	165.1	55.3
Nisan	7.38	16.6	63.3	87.5	177.4
Mayıs	8.26	N.D.	106.7	190.6	28
Haziran	7.34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Temmuz	8.56	N.D.	91.8	148.2	N.D.
Ağustos	7.99	N.D.	48.5	148.6	N.D.
Eylül	7.65	N.D.	44.4	181.7	35
Ekim	7.75	N.D.	53	258.1	98.2
Kasım	7.97	N.D.	117.6	252.1	N.D.
Aralık	N.D.	17.3	106.1	252.5	N.D.

*: Ay Bazında 2-10 Arasında Yapılan Ölçümlerin Ortalama Değerleri Olarak Verilmiştir; N.D.: Ölçüm Yapılmadı; KOİ: Kimyasal Oksijen İhtiyacı; BOİ: Biyolojik Oksijen İhtiyacı.

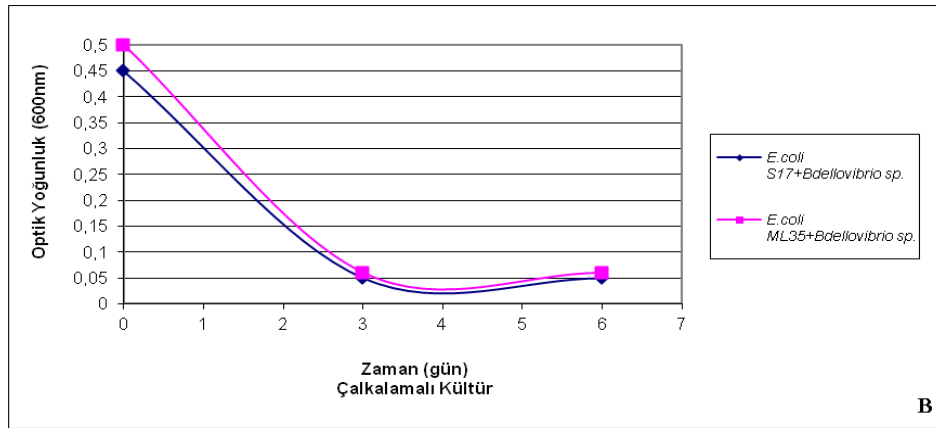
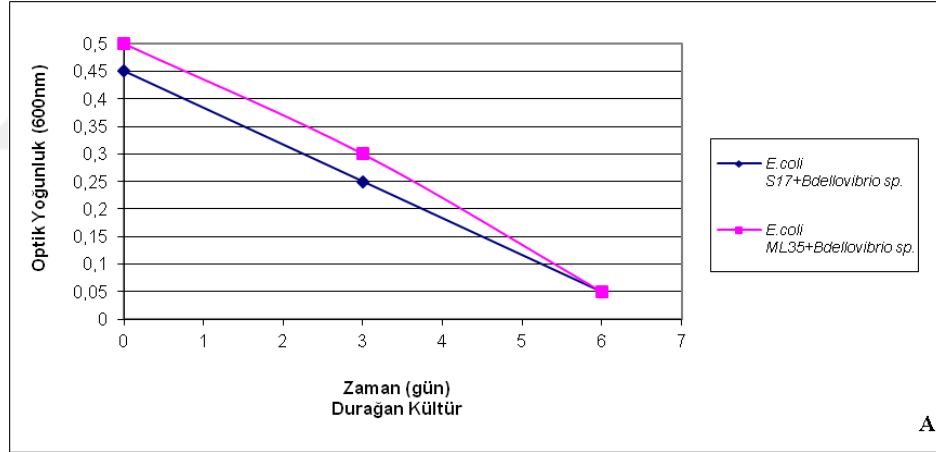
4.1.2. *Bdellovibrio* sp. Suşlarının Aktive Edilmesi

Bdellovibrio sp. suşlarının aktive edilmesi, Bölüm 3.2.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre, hem *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile konak *E.coli* ML35, hem de *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile *E.coli* S17 ile katı ortamda (Dilüe Nutrient Agar) yapılan deneylerde, *Bdellovibrio* sp. suşlarının üremediği ve bunun sonucu olarak, ortamda bulunan konak bakterileri parçalamadığı, böylece ortamda ki konak bakterinin zaman (1-3 gün) içinde çoğaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.1.). Fakat sıvı ortamda (Dilüe Nutrient Broth) belli bir sıcaklıkta ve sürede kültürlerle yapılan denemelerde hem çalkalamalı kültür hem

durağan kültürde, *Bdellovibrio* sp. suşlarının ürediği ve ortamda bulunan konak bakterileri parçaladığı, spektrofotometre yardımıyla tüplerdeki absorbans değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. Absorbans değerindeki düşme (0.1-0.05 civarına düşüş) *Bdellovibrio* sp. hücrelerinin *E.coli* hücrelerini parçaladığını göstermektedir (Şekil 4.2.).

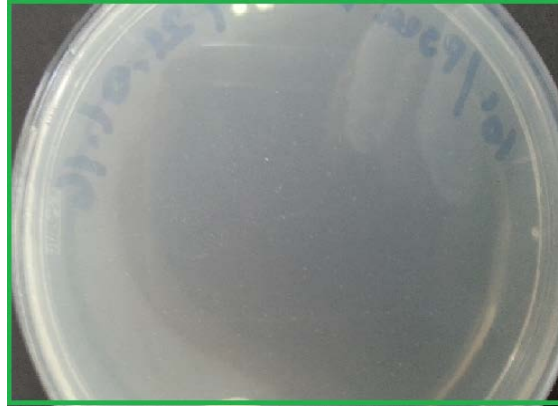


Şekil 4.1. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak *Bdellovibrio* sp. Suşu ve Konak Hücrelerin Sayılarının Belirlenmesi 1.



Şekil 4.2. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak *Bdellovibrio* sp. Suşu ve Konak Hücrelerin Sayılarının Belirlenmesi 2.

Sıvı ortamda istenilen sonuçların eldesi ile birlikte, predatör ve konak bakteriler ile HM ortamında çift katmanlı agar plaka deneyi yapılmış, fakat sıvı ortamında üretilen bakteriler tekrar katı ortamda üretilmemiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Aktifleştirilen *Bdellovibrio* sp. Suşu ve Konak *E.coli* ML35.

Bdellovibrio sp. suşları ile beraber gelen tüplerde konak bakterileri tespit etmek amacıyla yapılan preparasyonlar sonucu, yoğun olarak bulunduğu mikroskop ile görüntülenerek belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



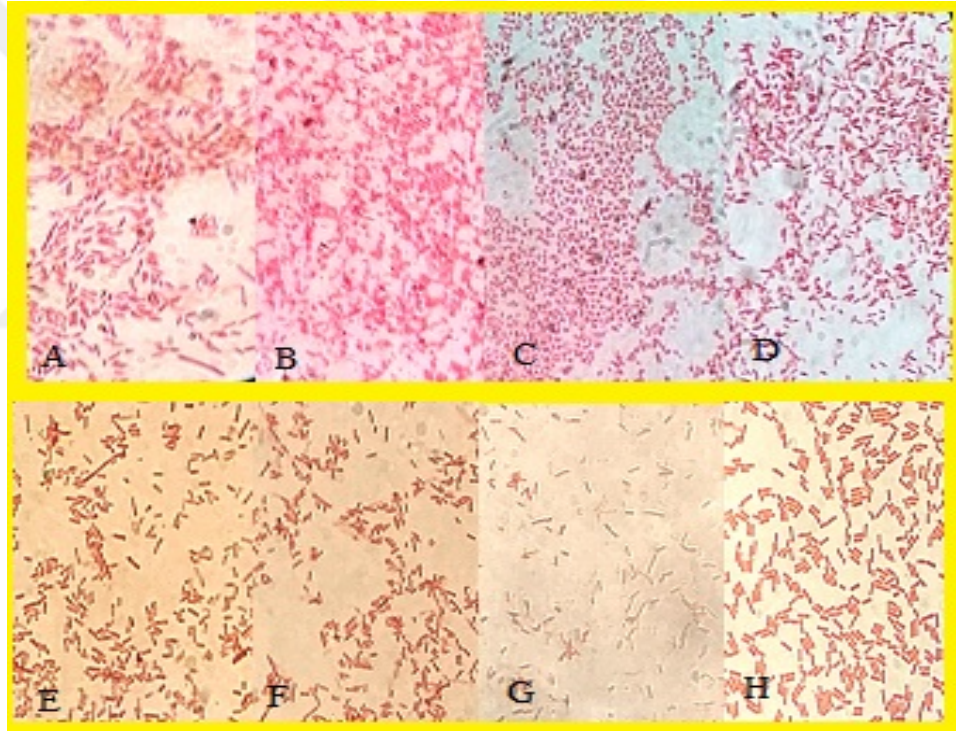
Şekil 4.4. *Bdellovibrio* sp. Suşunun ve Konak Bakterilerin Bulunduğu Tüplerden Yapılan Preparatların Işık Mikroskopisi Görüntüsü (100x).

4.1.3. Konak Bakterilerin Aktive Edilmesi

Bölüm 3.2.3.'de açıklandığı üzere konak bakteriler aktive edilmiştir. Böylece saf koloniler elde edilmiştir. Şekil 4.5.'de seçici besiyeri olan Eozin Metilen Blue Agar, Ceftrimide Agar ve King B Agarda konak bakterilerin sonuçları ile Şekil 4.6.'da Gram boyama işlemi sonucu, preparatların ışık mikroskopunda ki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.5. Eozin Metilen Blue Agarda *E.coli* (ATCC 29998) (A) ve *E.coli* ML35 (B), Cetrimide Agarda *Pseudomonas aureginosa* (C) ve King B Agarda *Erwinia amylovora* (D) Suşları.



Şekil 4.6. Konak Bakterilerin Işık Mikroskopunda 100x Büyütmede Görüntüsü. [A) *E.coli* S17 B) *E.coli* ML35 C) *E.coli* (ATCC 29998) D) *Pseudomonas aureginosa* E) *E.coli* Stbl3 F) *E.coli* DH5a G) *Erwinia amylovora* H) *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*].

4.1.3.1. Konak Bakterilerin Absorbans Değerleri

Bölüm 3.2.3.2.'de açıklandığı üzere konak bakterilerin absorbansları hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, BALO süspansiyonlarının belli bir yoğunlukta olmayan konak bakterilere karşı lizis oluşturmadığı tespit edilmiş olup, BALO izolasyon deneyleri

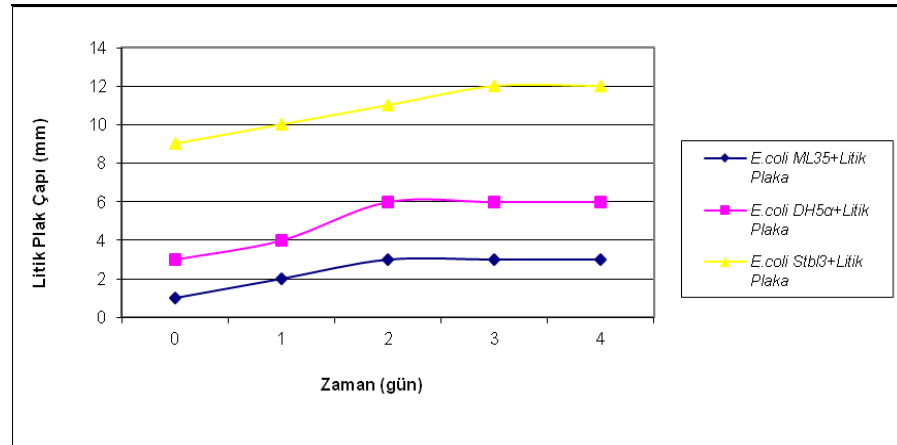
için konak bakterilerin optimum absorbands değerlerinin oldukça önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Konak Bakterilerin Absorbans Değerlerine Karşılık Gelen Hücre Sayıları.

Konak Bakteri İsmi	Optimum Absorbans Değerleri (kob/mL)
<i>E.coli</i> ML35	0.75 Abs (4.2×10^{10})
<i>E.coli</i> S17	0.81 Abs (2.3×10^9)
<i>E.coli</i> (ATCC 29998)	0.67 Abs (3.3×10^7)
<i>E.coli</i> DH5 α	0.80 Abs (1.7×10^9)
<i>E.coli</i> Stb13	0.71 Abs (4.5×10^7)
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	0.78 Abs (1.4×10^8)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	0.95 Abs (6.8×10^7)
<i>Erwinia amylovora</i>	0.69 Abs (3.2×10^7)

4.1.4. Diferansiyel Santrifüjleme ve Filtrasyon ile BALO İzolasyonu (Çift Katmanlı Agar Plaka Deneyi)

BALO izolasyonu Bölüm 3.2.4.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Büyüyen litik plaklar inkübasyon süresince düzenli olarak kontrol edilmiştir. Litik plakların inkübasyon sırasında 24-48 saatte ortaya çıktığı, yaklaşık bir hafta büyümenin devam ettiği ve aynı zamanda bu süre zarfında litik plakların çapının da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.).

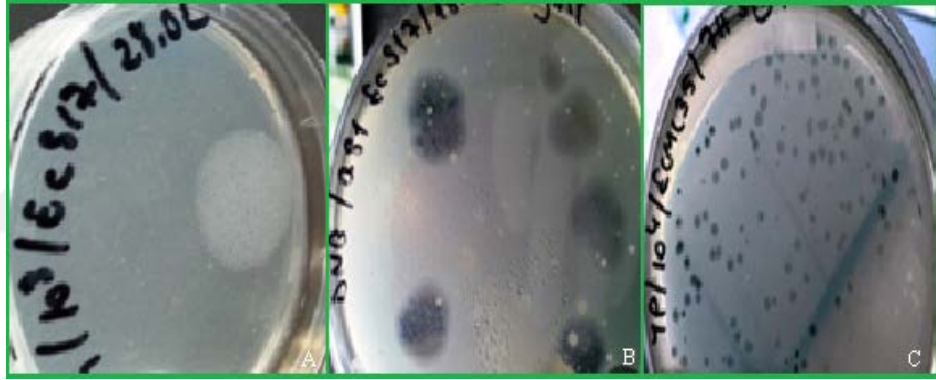


Şekil 4.7. İzolasyonda Litik Plakların Çaplarının Artışı.

İzolasyonda birçok farklı besiyeri (HM Agar, DNB Agar ve YP Agar), farklı konak bakterisi (*E.coli* ML35, *E.coli* S17, *E.coli* DH5 α , *E.coli* Stb13, *E.coli* (ATCC 29998), *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Erwinia amylovora*) ve farklı numune örneği (toprak numunesi ve atık su numunesi

‘ön çökeltim çıkış suyu, atık su arıtma tesisi giriş suyu, geri devir pompa suyu’) kullanılmıştır.

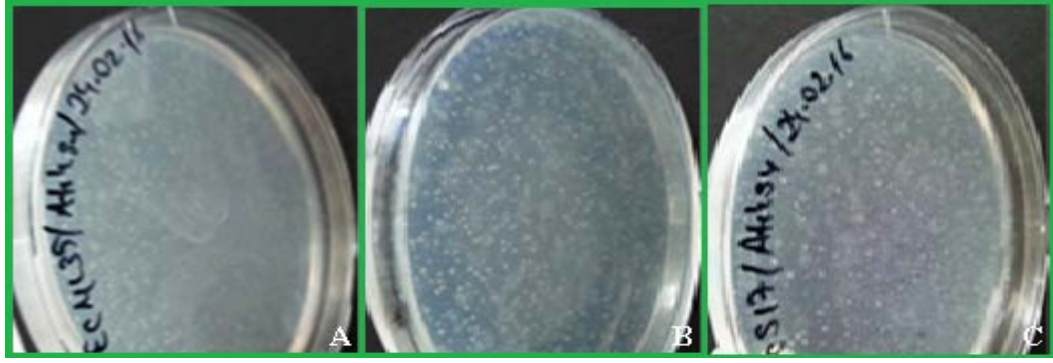
İzolasyonda en iyi plak oluşumunun görüldüğü besiyeri sırasıyla YP Agar ve DNB Agar iken, HM Agar da hiç plak oluşumu tespit edilememiştir (Şekil 4.8.). Farklı konak bakterilerle yapılan izolasyonda ise, en iyi litik plağın oluşumunun görüldüğü konak bakteriler sırasıyla *E.coli* ML35, *E.coli* DH5 α , *E.coli* Stb13, *Erwinia amylovora*, *E.coli* (ATCC 29998), *E.coli* S17 ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olduğu belirlenirken, *Pseudomonas aureginosa* suşuna karşı hiçbir litik plak oluşumuna rastlanmamıştır. Farklı numune örneklerinden toprak numunesi, atık su numunesi ‘ön çökeltim çıkış suyu ve geri devir pompa suyu’ndan alınan numuneler ile yapılan izolasyon deneyinde litik plaklar oluşmazken (Şekil 4.9., 4.10.), sadece atık su numunesinde (giriş ham atık suyu) litik plak oluşturan organizmaya rastlanmıştır (Şekil 4.11.).



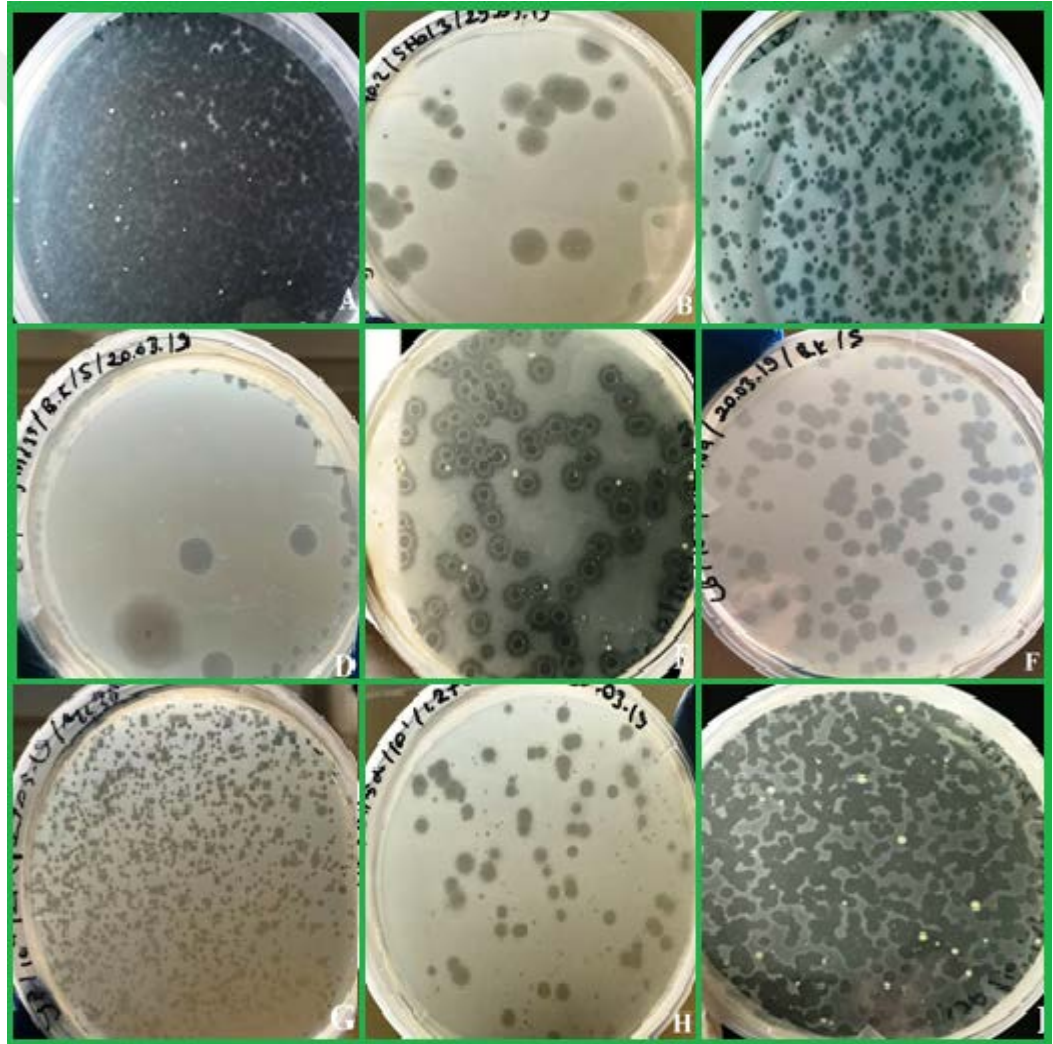
Şekil 4.8. İzolasyonda Kullanılan Katı Besiyerleri. (Besiyeri: A) HM Agar, B) DNB Agar, C) YP Agar)



Şekil 4.9. Toprak Numunesi (Meyve Bahçeleri Toprağı) ile İzolasyon Sonuçları (Konak bakteriler; A) *E.coli* ML35, B) *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, C) *E.coli* (ATCC 29998), D) *Erwinia amylovora*, Besiyeri: A, C; HM Agar, B, D; DNB Agar).



Şekil 4.10. Atık Su Numuneleri (Ön Çökeltim Çıkış Suyu, Geri Devir Pompa Suyu) ile İzolasyon Sonuçları (1). (Konak Bakteriler: A-B) *E.coli* ML35, C) *E.coli* S17; Besiyeri: HM Agar).



Şekil 4.11. Atık Su Numuneleri (Giriş Ham Atık Su) ile İzolasyon Sonuçları (2). (Konak Bakteriler: A, C, D, E, G, I) *E.coli* ML35, H) *E.coli* DH5α, B) *E.coli* Stb13, F) *Erwinia amylovora*; Besiyeri: YP Agar).

İzolasyon sonucu konak bakterilere karşı oluşturulan litik plakların, konak bakteri yoğunluğuna, tipine, inkübasyon koşullarına (süre, sıcaklık, havalandırma vb.) kullanılan besiyerleri gibi birçok faktörden etkilendiği belirlenmiştir. Aynı zamanda deney basamaklarından numunenin filtrelenmesinin ve santrifüjlenmesi de litik plak oluşumunda oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Atık su numesinden yapılan izolasyonlarda elde edilen litik plakların yoğunlukları Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.

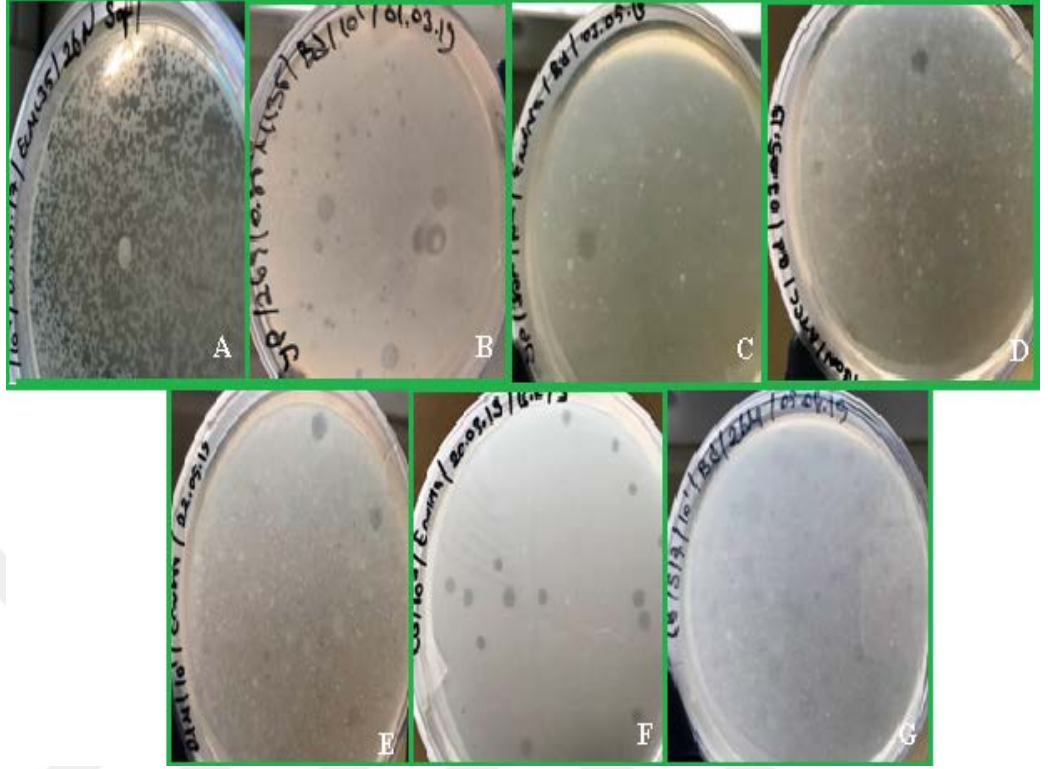


Şekil 4.12. Atık Su Numesinden Yapılan İzolasyonlarda Elde Edilen Seyreltme Oranları. (Konak Bakteri: *E.coli* DH5α; Seyreltme Plaka Yoğunlukları: A-D) 10^{-2} - 10^{-5} ; Besiyeri YP Agar).

Çevresel kaynaklı numunelerden bakteriyofajlar da predatör bakteriler gibi, Bölüm 3.2.5. (litik plakların faj kaynaklı olup-olmadığının belirlenmesi)'de açıklandığı şekilde izole edilmiştir. Atık su numunelerinde izolasyon deneyi sonucu oluşan litik plakların bakteri ya da bakteriyofaj kaynaklı olup olmadığını belirleyebilmek için, inkübasyon süresince litik plakların ilk oluşmaya başladığı an (faj plakları 12-16 saat içerisinde gözlemlenmiştir) ve litik plakların çap boyutunda ki büyüme göz önüne alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu plakların BALO plağı olduğu görüşünü güçlendirmiştir. Konak bakterilere karşı gözlemlenen litik plaklardan alınan örneklerin, moleküler biyoloji çalışma sonucu ile BALO plağı olduğu, faj kaynaklı plak olmadığı ortaya çıkmıştır (Şekil 4.13., Şekil 4.14.).

Predatör bakterileri izole etmek oldukça zordur. Bunun sebebi bu mikroorganizmaların metabolizmalarının hızlı olması ile beraber 20 saat gibi kısa bir süre içinde, hücre süspansiyonlarında %95'lik bir hücre kaybına uğramalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu tür olumsuzluklara rağmen çalışmada, mikrobiyolojik ölçümler ve gözlemlerle beraber, hem de moleküler biyoloji

yöntemleriyle litik plakların predatör bakteriler tarafından oluşturulduğu doğrulanmıştır.



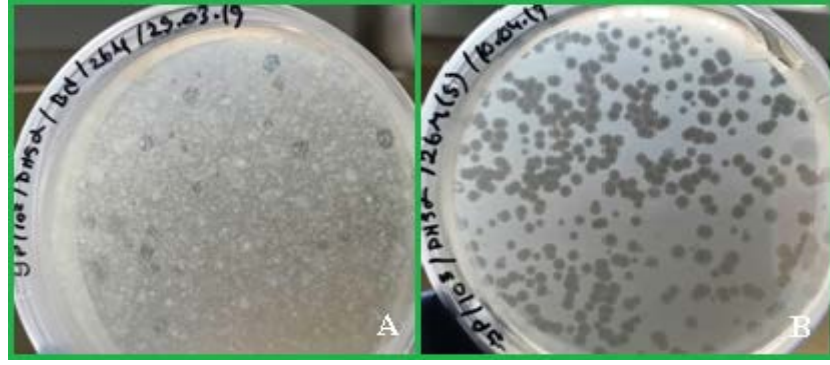
Şekil 4.13. Atık Su Numunelerinden İzole Edilen Litik Plaklar (*Bdellovibrio bacteriovorus*) (1). (Konak Bakteriler: A-B) *E.coli* ML35, C, E-F) *Erwinia amylovora*, D) *E.coli* (ATCC 29998), G) *E.coli* S17; Besiyeri YP Agar).



Şekil 4.14. Atık Su Numunelerinden İzole Edilen Litik Plaklar (*Bdellovibrio* sp.) (2). (Konak Bakteriler: A) *E.coli* ML35, B) *E.coli* (ATCC 29998); Besiyeri YP Agar).

4.1.4.1. Saflaştırma Deneyi

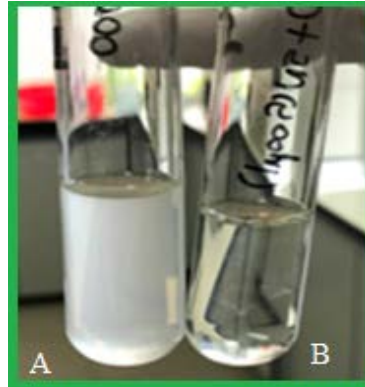
Bölüm 3.2.4.1.'de açıklandığı üzere deney gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonucu elde edilen litik plakların, izolasyon deneyi ile elde edilen litik plaklara göre; daha net, parlak ve yoğun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. İzolasyon ve Saflaştırma Sonucu Elde Edilen Litik Plakların Karşılaştırması A) İzolasyon Sonucu B) Saflaştırma Deneyi Sonucu. (Konak Bakteri: *E.coli* DH5 α ; Besiyeri YP Agar).

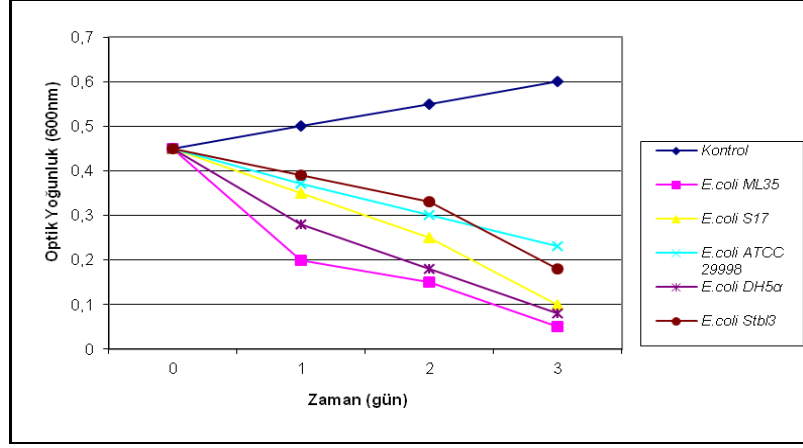
4.1.4.2. Lizat Deneyi

Lizatlar bölüm 3.2.4.2.'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Spektrofotometrede inkübasyon süresi boyunca yoğunlukları ölçülmüştür. Yoğunluklarında düşüş görülen lizatların, aynı zamanda renk olarak da tüplerde meydana gelen berraklaşmanın BALO izolatları tarafından konak bakterilerin parçalanması neticesi ile gerçekleştiği gözlenmiştir. Ortamda yoğunluk olarak gerektiğinden fazla konak bakteri aşılınması, yoğunluğun artışına neden olmuş ve tüplerde lizis kaynaklı renk değişimi meydana gelmemiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. HM Ortamında Elde Edilen Lizatlar. (A) İnkübasyon Öncesi B) İnkübasyon Sonrası; Konak Bakteri: *E.coli* ML35).]

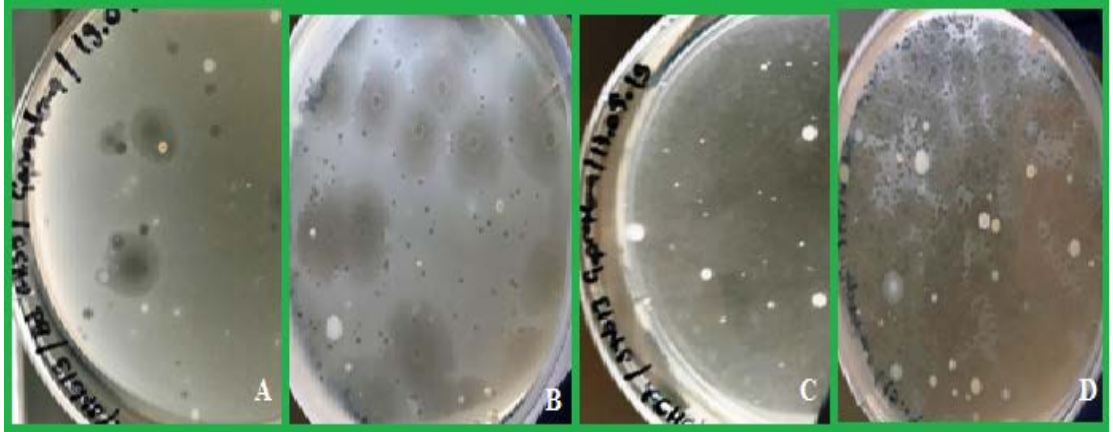
Bazı konak bakteriler ile sıvı ortamda yapılan lizat deneyleri sonucunda, en hızlı parçalanan konağın *E.coli* ML35 olduğu Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Optik Yoğunluğa Bağlı Olarak Konak-Predatör Bakterilerin Litik Aktivite İlişkisi. (Besiyeri; HM).

4.1.4.3. Litik Plaklar ile Biyokontrol Deneyi

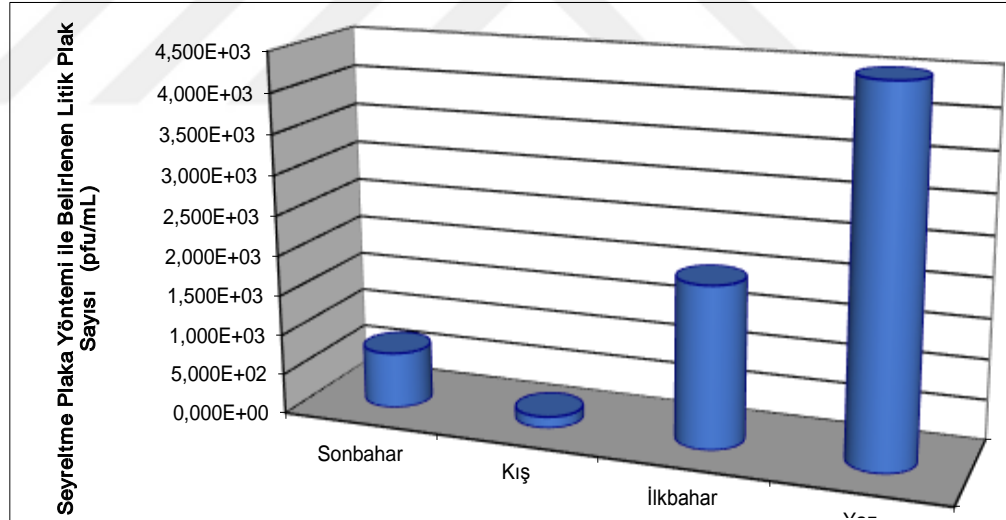
Bölüm 3.2.4.3.'de açıklandığı şekilde yapılan deneyler sonucunda, *E.coli* ML35'e karşı oluşan litik plaklar ile saflaştırma deneyi yapılmış, oluşan saf klonların farklı konaklara karşı biyokontrol ajanı olup olmadığı tespit edilmiştir. Buna göre; *E.coli* DH5α, *E.coli* Stb13 ve *Erwinia amylovora* ile plak oluşumu gösterdiği; *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Pseudomonas aureginosa* ile plak oluşumu göstermediği belirlenmiştir. *E.coli* Stb13'e karşı oluşan litik plaklarla da farklı konaklara karşı biyokontrol denemeleri yapılmış, sonuç olarak *E.coli* ML35 ve *E.coli* DH5α ile plak oluşumu gösterdiği; *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Pseudomonas aureginosa* ile plak oluşumu göstermediği gözlenmiştir. Şekil 4.18.'de litik plakların farklı konak bakterilere karşı biyokontrol deney sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.18. Litik Plakların Farklı Konak Bakterilere Karşı Biyokontrol Deney Sonuçları. (Konak Bakteriler: A-B) *E.coli* Stb13, C-D) *E.coli* DH5α; Besiyeri: YP Agar).

4.1.4.4. Litik Plakların Sayımı

Bölüm 3.2.4.4.'de açıklandığı üzere litik plakların sayısı hesaplanmıştır. Verilere göre oluşan litik plakların sırasıyla en çok yazın (4.5×10^3 pfu/mL), en az kışın (1.4×10^2 pfu/mL) olduğu tespit edilmiş ve Şekil 4.19.'da mevsimsel olarak dağılımları verilmiştir.

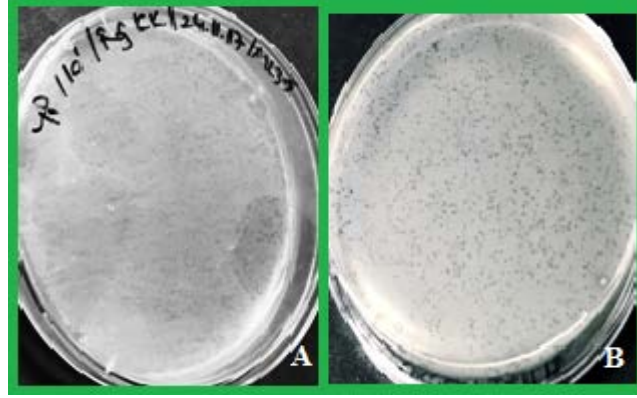


Şekil 4.19. Atık Su Numunelerinden İzolasyonlar Sonucu Litik Plakların Mevsimsel Olarak Dağılımı. (Konak Bakteri: *E.coli* ML35; Seyreltme Plaka Sayım Sonuçları; Mevsim Bazında 2-3 Numune Arasında Yapılan Sayımların Ortalama Değerleri Olarak Verilmiştir).

4.1.5. Litik Plakların Faj Kaynaklı Olup-Olmadığının Belirlenmesi

Litik plakların faj kaynaklı olup olmadığının belirlenebilmesi için Bölüm 3.2.5. (litik plakların faj kaynaklı olup-olmadığının belirlenmesi)'de açıklandığı şekilde faj izolasyon denemeleri yapılmıştır. Sonuç olarak, bakteriyofaj litik plaklarının inkübasyon sırasında 12-16 saat içerisinde oluştuğu, inkübasyon boyunca

ise litik plakların çapında hiçbir değişiklik olmadığı ve tespit edilen BALO litik plaklarından daha küçük boyutlarda olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.20.'de atık su numunelerinden elde edilen muhtemel faj plakları gösterilmiştir.



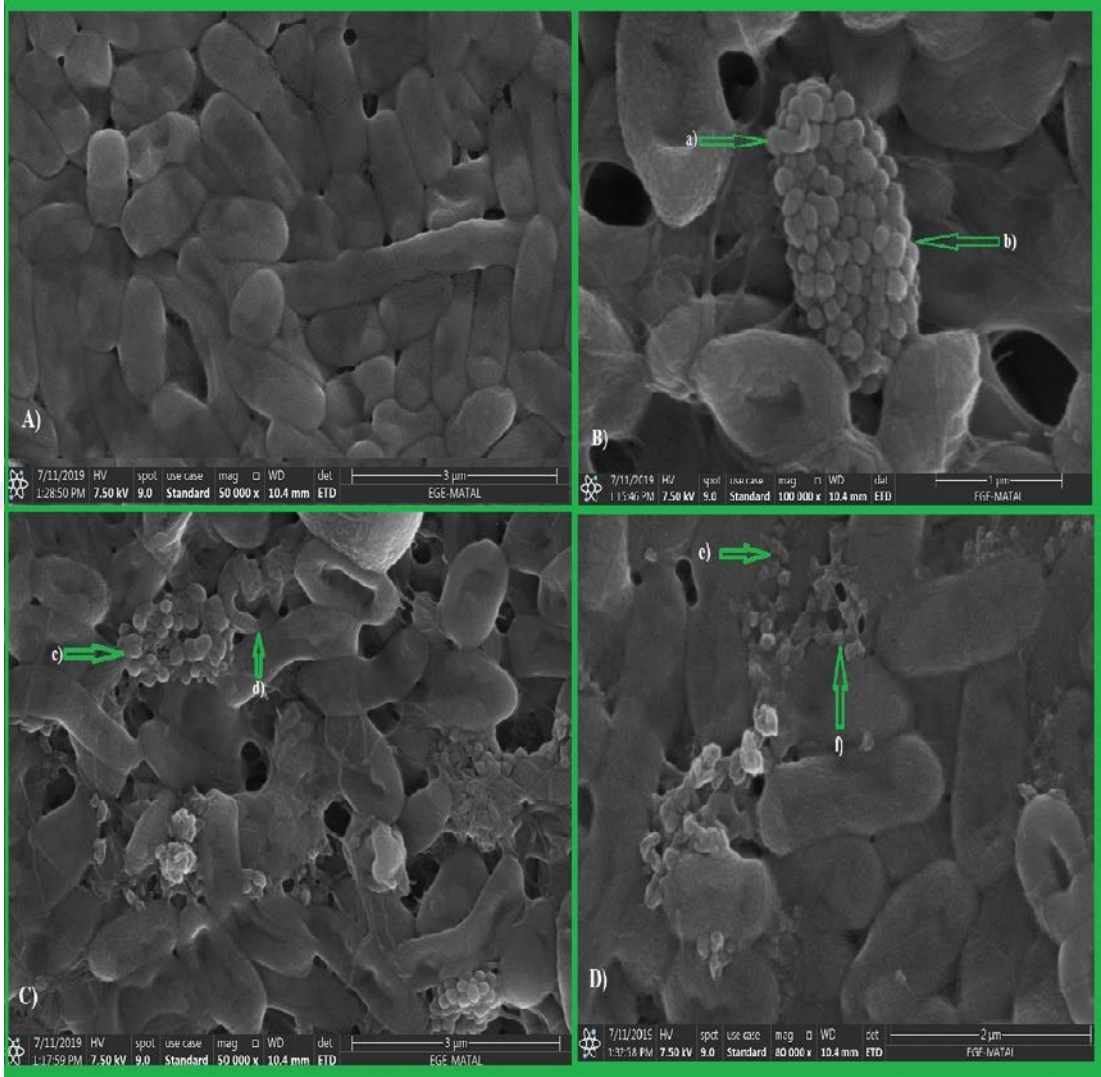
Şekil 4.20. Atık Su Numunelerinden İzolasyon Sonucu Oluşan Muhtemel Faj Litik Plakları. (Konak Bakteri: *E.coli* ML35; Besiyeri YP Agar).

4.1.6. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Bölüm 3.2.6.'da açıklanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Kurutulan filtre kağıtları, hizmet alımı karşılığında Ege MATAL'da altınla kaplanmış (yaklaşık yarım saat) ve ardından görüntülenmeye alınmıştır. Şekil 4.21.'de 50.000x, 80.000x ve 100.000x büyütme ile taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenen numuneler görüntülenmiştir.

SEM'in çalışma prensibi, yeteri kadar hızlandırılmış elektronlar ile örneğin etkileşmesi esasına dayanır. Işık mikroskoplarına kıyasla yüksek çözünürlüğü olan morfolojik görüntüleme yapmaktadır. Şekil 4.21.'de A) Negatif kontrol olarak konak bakteri *E.coli* ML35'in 50.000x büyütme ile taramalı elektron mikroskop (SEM) ile, B) Lizat (*Bdellovibrio* sp. plak materyali+konak hücre *E.coli* DH5 α), konak bakteri *E.coli* DH5 α 'nın içerisine inoküle edilerek, 18-24 saat inkübasyon sonucu oluşan *Bdellovibrio* sp. ve bdellokistler 100.000x büyütme ile taramalı elektron mikroskop (SEM) ile, C) Lizat (*Bdellovibrio* sp. plak materyali+konak hücre *E.coli* DH5 α) ile konak bakteri *E.coli* DH5 α steril bir ortama (LB) inoküle edilerek 18-24 saat inkübasyon sonucu oluşan bdellokist ve enfektif konak hücreler 50.000x büyütme ile taramalı elektron mikroskop (SEM) ile, D) Filtrat (*Bdellovibrio* sp. plak materyali preparasyon için 0.45 μ m por çaplı filtreden geçirilmiş) ile konak bakteri *E.coli* ML35 steril bir ortama (LB) inoküle edilerek 18-24 saat inkübasyon sonucu oluşan

bdellokist ve konağın oluşturduğu ekzopolisakkarit maddeler 80.000x büyütme ile taramalı elektron mikroskop (SEM) ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.21. Konak ve Predatör Bakterinin Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM) Görüntüsü. **A)** Konak Hücre: *E.coli* ML35 (Negatif Kontrol), **B)** Lizat [a] *Bdellovibrio* sp. b) Bdellokist] Konak Hücre: *E.coli* DH5α, **C)** Lizat [c] Bdellokist d) Enfektif Konak Bakteri] Konak Hücre: *E.coli* DH5α, **D)** Lizat [e] *Bdellovibrio* sp. f) Konağın Oluşturduğu Ekzopolisakkarit Madde (EPS)] Konak hücre: *E.coli* ML35.

4.1.7. Moleküler Sistematik Çalışmalar

4.1.7.1. BALO Genomik DNA'larının İzolasyonu

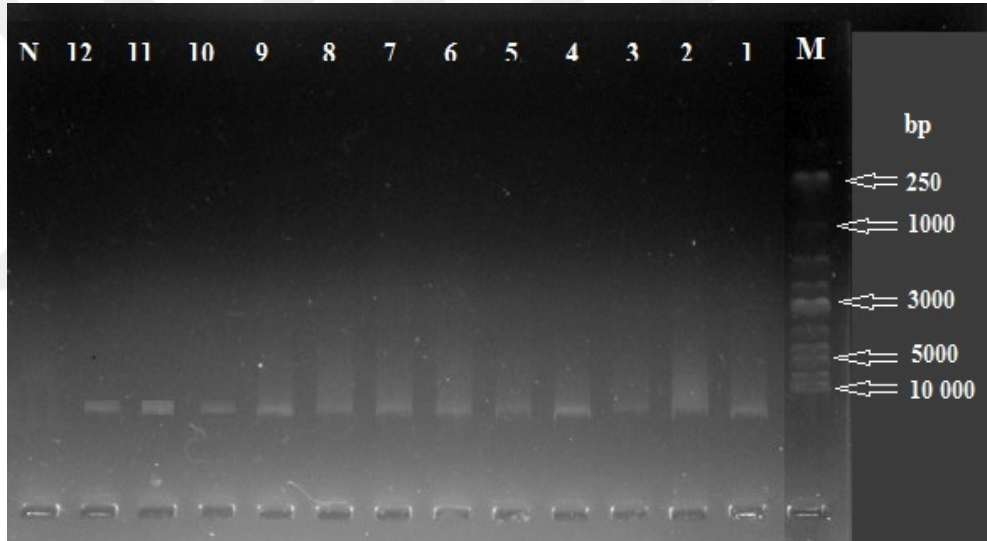
Litik plaklardan alınan örneklerin DNA izolasyonu Bölüm 3.2.7.1. (BALO genomik DNA'larının izolasyonu)'de açıklanan yöntemle göre, toplam 160 genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Litik plaklar, agarlı katı ortamlardan steril öze ile

dikkatlice alınırken, ister istemez DNA izolasyonunda, kontaminasyonlara neden olmaktadır.

4.1.7.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2.7.2.'de açıklandığı üzere DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi belirlenmiştir. Tablo 4.3.'de izolatların nükleik asit konsantrasyonu ve saflık oranları gösterilmiştir. Bu absorbans değerleri ve agaroz jel elektroforezde tek bant oluşturan saf DNA örnekleri (Şekil 4.22.) göz önüne alınarak, PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonunda DNA miktarı en az 10-20 (ng/μL) konsantrasyonda olan örnekler agaroz jel çalışmalarında kullanılmış, daha az konsantrasyonlara sahip örnekler ise DNA konsantrasyonları arttırılarak PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



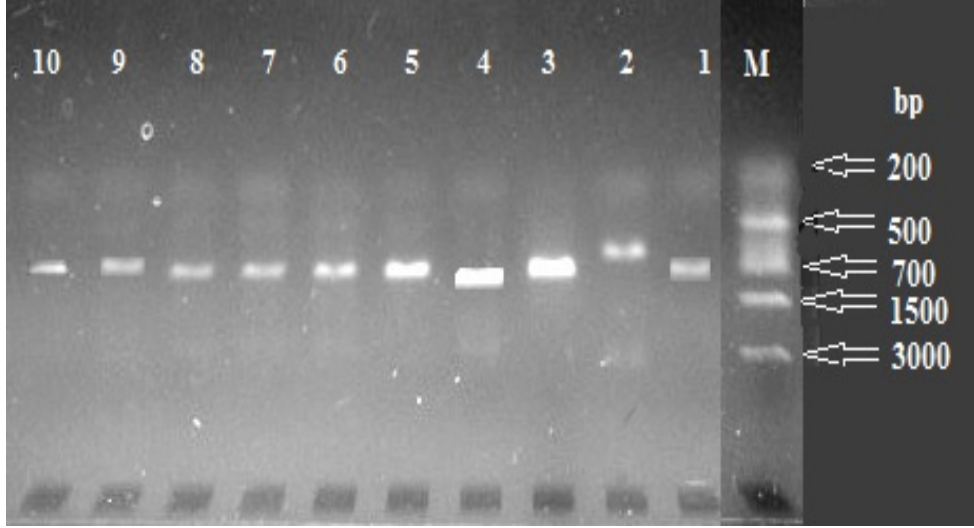
Şekil 4.22. Bazı BALO İzolatlarından Elde Edilen DNA Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri. [M=DNA Ladder (1000 bp), 1-12 İzolatlar DNA Ürünleri, N=Negatif Kontrol].

Tablo 4.3. İzolatların Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflık Oranı.

İzolat No	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/μL)	A260/A280 (nm)
SAT17-02-14	30.67	1.86
SAT18-01-14	23.46	1.38
SAT18-00-19	12.9	1.63
SAT19-00-12	21.34	1.97
SAT19-00-19	16.4	1.68
SAT19-04-25	1.7	1.25
SAT19-00-26	6.4	1.96
SAT19-01-26	28.3	0.87
SAT19-02-26	23.1	2.05
SAT19-03-26	2.3	2.14
SAT19-04-26	2.8	1.63
SAT19-00-27	8.1	2.42
SAT19-03-27	5.0	2.84
SAT19-04-27	6.7	2.21
SAT19-00-28	5.7	2.53
SAT19-01-28	4.5	1.21
SAT19-04-28	9.2	2.51
SAT19-05-28	10.3	1.68
SAT19-01-27	10.1	1.08
SAT19-00-29	9.8	2.74
SAT19-01-29	20.0	2.27
SAT19-03-29	3.7	2.21
SAT19-04-29	6.8	2.62
SAT19-05-29	19.0	2.23
SAT19-06-29	3.1	2.85

4.1.7.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu

Elde edilen genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, Bölüm 3.2.7.3.'de ki PCR koşulları sağlanarak, dört primer seti BbsF216, BbsR707, Bac676F, Bac1442R, Per676F, Per1443R, Mic431F ve Mic996R ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlerden Mic431F ve Mic996R ile pozitif sonuç alınamamıştır. Elde edilen PCR ürünleri UV transillüminatörde incelenmiş, tek bant oluşturanlar seçilerek sekans analizleri için -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Toplamda 25 predatör bakterinin (BALO) PCR amplifikasyonu ile elde edilen ürünleri, sekans analizine gönderilmiş ve sonuçlar alınmıştır. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.23.'de verilmiştir.



Şekil 4.23. Bazı BALO İzolatlarından Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri. [M=DNA Ladder (100 bp), 1-10 İzolatlar PCR Ürünleri] (Farklı Jel Görüntüleri Orijinalini Bozmadan Tek Bir Şekil Üzerinde Birleştirilmiştir).

4.1.7.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramın Oluşması

Bölüm 3.2.7.4.'de verilen yönteme göre yapılmıştır. 16S rRNA sekans verileri alındıktan sonra ham diziler, BioEdit Sequence Alignment Editor (V, 7.2.5.) ve MEGA X (V, 10.0.4) programı kullanılarak düzenlenmiş, gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak amacıyla muhtemel türlerin belirlenmesi için blastlanmıştır. Elde edilen ve düzenlenen izolatların 16S rRNA sekans verilerinin gen bankasıyla karşılaştırılması ve en yüksek (%97 ve üzerinde) benzerlik gösteren predatör bakterilerin verileri Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası (NCBI:<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

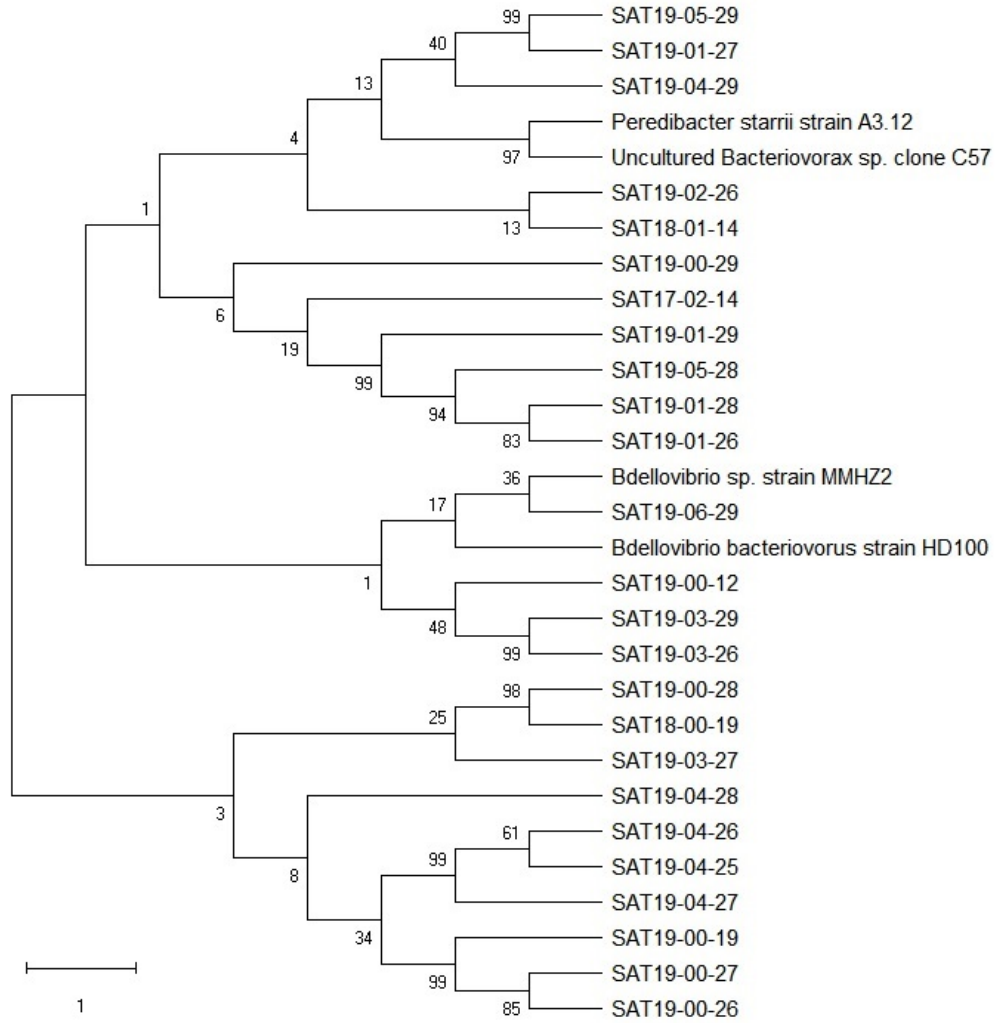
Verileri ile Karşılaştırılması.

İzolat No	Eşleşen (en yüksek benzerlik gösteren) Muhtemel Cins/Tür	Benzerlik (%)	Editlenen Sekans Sayısı	Gen Bank Erişim No	Atanan Cins/Tür
SAT17-02-14	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	%97.43	506	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT18-01-14	<i>Bdellovibrio</i> sp. strain Kdesi	%94.88	696	MG957118.1	<i>Bdellovibrio</i> sp.
SAT18-00-19	Uncultured <i>Bacteriovorax</i> sp. clone C57	%91.77	783	GQ180036.1	<i>Bacteriovorax</i> sp.
SAT19-00-12	<i>Peredibacter starrii</i> strain A3.12	%95.63	784	NR_024943.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-00-19	Uncultured <i>Bacteriovorax</i> sp. clone C57	%91.63	783	GQ180036.1	<i>Bacteriovorax</i> sp.
SAT19-04-25	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%96.27	785	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-00-26	<i>Peredibacter starrii</i> strain A3.12	%95.99	779	NR_024943.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-01-26	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	% 99.39	494	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT19-02-26	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	%99.77	439	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT19-03-26	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%96.40	784	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-04-26	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%96.65	783	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-00-27	<i>Peredibacter starrii</i> strain A3.12	% 96.52	782	NR_024943.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-01-27	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	%98.20	501	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>

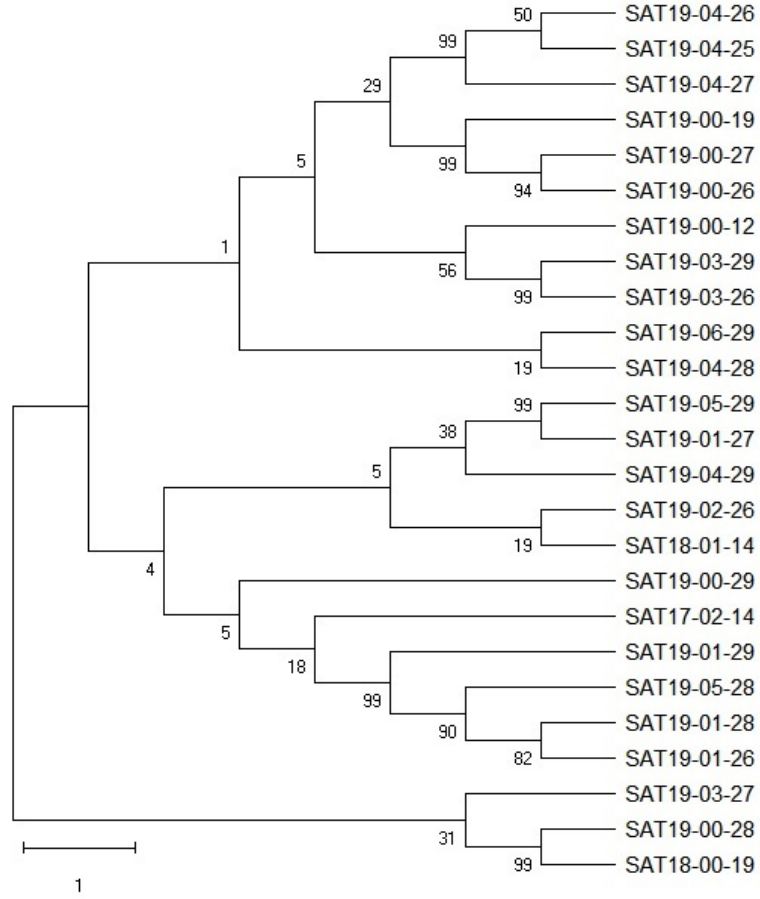
SAT19-03-27	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%94.22	800	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-04-27	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%96.13	780	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-00-28	<i>Peredibacter starrii</i> strain A3.12	%96.39	783	NR_024943.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-01-28	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	% 99.80	494	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT19-04-28	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%96.03	787	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-05-28	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	% 99.80	494	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT19-00-29	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%95.01	837	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-01-29	<i>Bdellovibrio</i> sp. strain MMHZ2	%96.81	503	MG821232.1	<i>Bdellovibrio</i> sp.
SAT19-03-29	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%95.12	784	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-04-29	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%95.45	855	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.
SAT19-05-29	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain HD100	%97.22	504	NR_027553.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SAT19-06-29	Uncultured <i>Peredibacter</i> sp. clone pb8	%94.13	761	FJ648628.1	<i>Peredibacter</i> sp.

Elde edilen sekans verilerine göre BALO'a %97 ve üzerinde benzerlik gösteren tür bazında 7 adet ile %97 ve altında benzerlik gösterenler cins bazında 18 adet tabloda listelenmiştir. Toplamda yüksek benzerlik gösteren, 7 farklı örnekten alınan ve tür bazında belirlenebilen bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus*'tur. İdentifikasyonu yapılan bakterilerin gen bankasına sunulması ve erişim numaralarının alınması için çalışmalarımız devam etmektedir.

16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramlar için databanklardan elde edilen *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bdellovibrio* sp., *Peredibacter* sp. ve *Bacteriovorax* sp. tip örneği 16S rRNA gen dizileri ile test bakterilerinin gen dizileri karşılaştırılarak tür veya cins seviyesinde tanılamaları yapılmıştır. Filogenetik analizler için ise MEGA X (V, 10.0.4) paket programından yararlanılmış, Neighbour-joining ve Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak dendogramları oluşturulmuştur (Şekil 4.24., 4.25.).



Şekil 4.24. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin *Bdellovibrio* sp., *Bacteriovorax* sp. ve *Peredibacter* sp. Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri. (Evrimsel analizler Neighbor-Joining metodu ile 1000 replikattan elde edilen bootstrap konsensüs ağacı kullanılarak çıkarılmıştır. %50'den daha az filogenetik dallanmalar gösterilmemektedir. Evrimsel uzaklık Maksimum Kompozit Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [155]. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elenmiştir), Bar 1 μ m.



Şekil 4.25. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Kendi Aralarındaki Evrimsel İlişkileri.

(Evrimsel analizler Neighbor-Joining metodu ile 1000 replikattan elde edilen bootstrap konsensüs ağacı kullanılarak çıkarılmıştır. %50'den daha az filogenetik dallanmalar gösterilmemektedir. Evrimsel uzaklık Maksimum Kompozit Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [155]. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elenmiştir), Bar 1 μ m.

Tanımlanan strainlerin % G+C oranı, nükleotit frekansları ve toplam nükleotit sayıları Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Strainlerin Nükleotit Frekansları ve Toplam Nükleotit Sayıları.

Strain No	Nükleotit Frekansı (%)					Toplam (bp)
	T	C	A	G	G + C	
SAT17-02-14	27.5	30.4	22.1	20.0	50.4	506
SAT18-01-14	27.0	27.9	22.3	22.8	50.7	696
SAT18-00-19	24.9	29.0	22.2	23.9	52.9	783
SAT19-00-19	25.3	28.9	22.1	23.8	52.7	783
SAT19-01-26	27.4	31.1	22.8	18.7	49.8	492
SAT19-02-26	26.4	31.2	22.6	19.8	51.0	439
SAT19-00-12	25.4	29.2	22.4	23.0	52.2	784
SAT19-00-26	25.3	29.0	22.7	23.0	52.0	779
SAT19-03-27	25.6	28.3	23.8	22.4	50.7	800
SAT19-04-27	25.4	29.0	22.7	22.9	51.9	780
SAT19-04-25	25.7	29.0	22.2	23.1	52.1	785
SAT19-03-26	25.5	29.0	22.8	22.7	51.7	784
SAT19-04-26	25.5	29.1	22.9	22.5	51.6	783
SAT19-00-27	25.7	29.2	22.3	22.9	52.1	782
SAT19-00-28	25.7	28.9	22.6	22.9	51.8	783
SAT19-01-28	27.3	31.2	22.7	18.8	50.0	494
SAT19-04-28	25.7	28.7	22.6	23.0	51.7	787
SAT19-05-28	27.4	31.2	22.5	18.9	50.1	493
SAT19-01-27	26.7	31.7	22.2	19.4	51.1	501
SAT19-00-29	26.3	29.7	22.9	21.0	50.7	837
SAT19-01-29	26.2	31.4	23.3	19.1	50.5	503
SAT19-03-29	25.5	28.2	23.7	22.6	50.8	784
SAT19-04-29	26.5	29.8	22.2	21.4	51.2	855
SAT19-05-29	27.0	30.6	22.6	19.8	50.4	504
SAT19-06-29	21.3	22.6	28.3	27.9	50.5	761
Ortalama	25.8	29.2	22.9	22.2	51.4	691.1

4.2. Tartışma

Bu çalışma ile bildiğimiz kadarıyla ülkemizde şimdiye kadar çalışılmamış olan, *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar (BALO) atık su ve toprak numunelerinden izole edilmeye çalışılmış, izole edilebilenler tanımlanarak buldukları ortamda çeşitlilikleri ortaya konulmuştur. Yaptığımız tüm denemelere rağmen, topraktan yapılan tüm izolasyon işlemlerinde predatör bakteri varlığı tespit edilememiştir. Su örneklerinden izolasyonlarda sadece atık su arıtım tesisinin giriş ham atık suyundan alınan örneklerde BALO varlığı tespit edilmiştir. İzole edilen litik plaklar farklı gram negatif bakteriler kullanılarak, konak-predatör ilişkileri yönüyle incelenmiştir. DNA izolasyonları yapılan ve spesifik primer setleri aracılığı ile özel bölgelerin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen amplikonların sekans analizleri sonucu, toplamda 25 predatör bakterinin %56'sı *Peredibacter* sp., %28'i *Bdellovibrio bacteriovorus*, %8'i *Bdellovibrio* sp. ve %8'i *Bacteriovorax* sp. olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.4.). Aynı zamanda çalışma kapsamında, metodolojik olarak BALO izolasyon koşulları optimize edilmiş olup, nihayetinde elde ettiğimiz veriler yeni projelerin üretilmesi ve diğer çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

BALO izolatlarının karakterizasyonu ve çeşitliliği genellikle konak bakteri-duyarlılık modelleri ile tuzluluk ve sıcaklık gibi bazı ekolojik faktörlere olan tercih ve toleranslarına göre yapılmaktadır. Bu nedenle, yapılan araştırmalarda predatör bakterilerin izolasyon kaynaklarından biri tuzlu su ekosistemleri, diğeri ise tuz için düşük toleransa sahip olan tatlı su ekosistemleri ve topraktır [102]. Çalışmamızda predatör bakterilerin izole edildiği bölge atık su olarak tatlı su ekosistemi ve toprak sınıfında bulunmaktadır. Predatör bakterilerin izolasyonu ile ilgili çalışmamızda konak bakteriler olarak *E.coli* ML35, *E.coli* S17, *E.coli* DH5 α , *E.coli* Stb13, *E.coli* (ATCC 29998), *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ile *Erwinia amylovora* kullanılmış olup, en iyi litik plak oluşumu *E.coli* ML35 ile gözlemlenmiştir. Benzer diğer çalışmalara bakıldığında atık su numunelerinden BALO izolasyonunda genellikle konak olarak *E.coli* suşu kullanılmaktadır.

Dias ve Bhat [156], predatör bakterilerin kanalizasyon ve aktif çamur örneklerinden izolasyonu için konak bakteri olarak *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi*, *Serratia marcescens*, *Proteus morgani* ve

Aerobacter aerogenes'i kullanmışlardır. En fazla litik plak oluşumunun *E. coli* ile, en az litik plak oluşumunun ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens* ve *Serratia marcescens* ile olduğunu bildirmişlerdir. Staples ve Fry [35], nehir ve kanalizasyon suyu örneklerinden BALO izolasyonu için konak bakteri suşları olarak; *Arthrobacter aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter* sp., *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Serratia marcescens*, *E.coli*, *Aerobacter aerogenes* ve *Proteus vulgaris* kullanmış, en iyi plak oluşumunu *Achromobacter* sp. ve *E.coli* ile tespit etmişlerdir. Afinogenova ve ark. [157], kanalizasyon ve nehir suyu ile yapılan predatör bakteri izolasyonunda, konak bakteri olarak *E. coli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas fluorescens* ile litik plak oluşumunu tespit etmiş, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophila* ve *Brevundimonas vesicularis* ile litik plak oluşumunu tespit etmemişlerdir. Predatör bakteriler ile izolasyonda kullanılan konak bakteriler genellikle gram negatif özellikte ise de [32, 39-40, 158-164], yukarıda verilen örneklerde belirtmiş olduğumuz gibi birkaç çalışmada [19, 35] ise gram pozitif bakterilerde kullanılmıştır. Farklı bakterilerin predatörlere karşı duyarlılığı ise; yapılan deneylerde tatlı su ve karasal ortamlarında *E. coli* ile kanalizasyon ve nehir suyunda ise *E. coli* ve *Achromobacter* sp.'nin en duyarlı konak bakteri oldukları tespit edilmiştir [105].

Atık su ve toprak numunelerinden yaptığımız konak-predatör bakterilerin izolasyonu diferansiyel santrifüjleme ve filtrasyon basamağı ve çift katmanlı agar plaka yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Litik plak oluşturan tek predatör bakteri ise *Bdellovibrio bacteriovorus*'tur. Diğer predatör bakterilerin (*Bacteriovorax* sp., *Peredibacter* sp. ve *Micavibrio* sp.) konak bakterilerle katı ya da sıvı ortamda izolasyonu sağlanamamıştır.

Fratamico ve Cooke [39], kanalizasyon ve toprak numuneleri ile yaptıkları predatör bakteri izolasyonunda, diferansiyel santrifüjleme ve filtrasyon basamağını kullanmışlardır. İzolasyon basamağı olarak diferansiyel santrifüjleme ve filtrasyon, benzer çalışmalarda da [19, 27,165, 166] uygulanmıştır. Pirinç tarlasından predatör bakteri izolasyonunda sadece filtrasyon basamağını kullandığını bildirilmiştir [28]. Fry ve Staples [32], nehir suyundan predatör bakteri izolasyonu için seyreltme basamağını, yaptıkları diğer bir çalışmada ise [35], kanalizasyondan predatör bakteri izolasyonu için homojenizasyon basamağını kullanmışlardır. Bu ve benzer

araştırmaların, izolasyon basamaklarının herbirinde çift katmanlı agar plaka yöntemi uygulanmış, predatör bakteri olarak *Bdellovibrio* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Atık su numunelerinden yaptığımız direk izolasyonlarda litik plaklardan örnekleme yapılmış olup, konak bakteri olarak *E.coli* ML35, *E.coli* DH5 α , *E.coli* Stbl3 ve *Erwinia amylovora* kullanıldığında, tekrar plak oluşumu gözlemlenirken, *E.coli* S17, *E.coli* (ATCC 29998), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Pseudomonas aureginosa* türüne karşı plak oluşumu gözlemlenmemiştir. Böylece bazı konak bakterilerin oluşturduğu plakların, diğer konak bakteriler üzerinde biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Klein ve Casida [167], *Bdellovibrio bacteriovorus* olarak belirledikleri iki predatör bakterinin 16 farklı konak bakteriye karşı biyokontrol deneyleri yapılmış, sonuçta *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter* sp., *Arthrobacter globiformis*, *Erwinia tracheiphila*, *Nocardia* sp. ve *Rhizobium japonicum*'a karşı hiç plak oluşumunun görülmediğini tespit etmişlerdir. Davidov ve ark. [107], toprak örneklerinden izole ettikleri predatör bakterilerin potansiyel 6 farklı konak bakteriye karşı biyokontrol deneyleri yapılmış, *Agrobacterium tumefaciens* ile *Bdellovibrio* sp.'nin, *Pseudomonas corrugata* ile *Peredibacter* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum brasilense*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* ve *E. coli* ML35 ile *Bacteriovorax* sp.'nin, *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ile *Micavibrio* sp.'nin plak oluşturduğunu tespit etmişlerdir. El-Shanshoury ve ark. [160], Suudi Arabistan'da Taif bölgesinde ki atık sulardan izole ettikleri 17 *Bdellovibrio* sp. izolatının farklı konak bakterilere karşı biyokontrol deneyleri yapılmış ve sonuçta *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Azotobacter* sp.'e karşı hiç plak meydana gelmediğini bildirmişlerdir. BALO izolasyonunda benzer ya da farklı konak bakteriler kullanılarak yapılan bu tür çalışmaların sayısını arttırmak mümkündür [39, 119, 162-164]. Çalışmamız ile kaynaklarda belirtilen çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, kullanılan konak bakterilerin predatör bakterilere karşı duyarlılıklarının farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Bunun nedeninin ise diğer araştırmalarda kullanılan konak bakterilerin metabolik, genetik yapı ve buldukları ortamın fizyolojik koşullarının (sıcaklık gibi) farklılıklarıdır.

Predatör bakterilerin atık sularda ki mevsimsel dağılımı seyreltme plaka yöntemiyle konak bakteri olarak *E.coli* ML35 kullanılarak hesaplanmıştır.

Sonuçlarımıza göre litik plakların en çok yaz mevsiminde (4.5×10^3 pfu/mL), en az ise kış mevsiminde (1.4×10^2 pfu/mL) olduğu tespit edilmiştir. Williams ve ark. [33] bu bakterilerin mevsimsel dağılımlarıyla ilgili Patuxent Nehrinde yaptıkları bir çalışmada, en çok yaz mevsiminde BALO elde ettiklerini, predatörlerin sayılarının geç yaz ile ilk soğuk aylara kadar belirgin bir şekilde yükseldiğini ve kış mevsiminde sayılarının azaldığını bildirmişlerdir. Paix ve Jacquet [168] ile Paix ve ark. [169] ise, üç dağ gölünde (Annecy Gölü, Bourget Gölü ve Cenevre Gölü) farklı mevsimlerde predatör bakterilerin bolluğu, dağılımı, çeşitliliğini araştırmışlardır. qPCR ile *Peredibacteraceae* familyasının bolluğu 1.62×10^5 gen kopya/mL, *Bdellovibrionaceae* ve *Bacteriovoracaceae* familyalarının bolluk oranı ise 4×10^1 - 1.25×10^1 gen kopya/mL olarak ölçmüşlerdir. Hücre sayılarını ise *Bdellovibrionaceae* 10^3 pfu/mL ile *Bacteriovoracaceae* 10^6 pfu/mL olarak tespit etmişlerdir. Yaz mevsiminde, *Peredibacteraceae*'nin bolluğu kış ya da sonbahar mevsimlerinden belirgin şekilde daha yüksek olduğunu hem qPCR hem de mikrobiyolojik sayım yöntemleriyle tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalara göre, ilkbahar ve yaz mevsiminde sıcaklık arttığında, numunenin sıcaklığı da artmış ve predatör bakterilerin çoğalması için şartlar uygun hale dönüşmektedir.

Atık su numunelerinden yaptığımız BALO izolasyonunda inkübasyon sıcaklığı 28 °C olarak kullanılmıştır. Benzer çalışmalarda [35, 59, 156, 158, 170] bu sıcaklık 25-30 °C arasında uygulanmaktadır. İstisnai olarak birkaç çalışmada daha düşük [42, 171] veya daha yüksek sıcaklıkların [17, 161] uygulandığı görülmektedir. Çalışmamızda ise daha düşük (20 °C) ve daha yüksek (35 °C) sıcaklık denemelerinde konak bakterilere karşı litik plak oluşmamıştır. Paix ve ark. [169], predatör bakterilerin metabolik aktivilerinde özellikle sıcaklık ve tuzluluğun daha çok, diğer faktörlerin (iletkenlik, pH, oksijen, amonyum vb.) ise daha az etkin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Predatör bakteri izolasyonlarında çift katmanlı agar plaka yönteminde ortam olarak YP (Yeast Ekstrakt Pepton) Agar kullanılmıştır. Benzer çalışmalarda [19, 39] da BALO izolasyon deneyinde ortam olarak kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda [25, 152, 162, 164, 172], ise izolasyon ortamı olarak DN (Dilüe Nutrient) Agar, HM Agar ve YPSC (Yeast Ekstrat Pepton Sülfat Sistein) Agar kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda ise predatör bakterilerin ihtiyaç duyduğu ortamlara bakıldığında genellikle düşük besin konsantrasyonları içeren ortamların tercih edildiği, hatta bazı ortamların

(Hepes gibi) hiçbir besin içermediği, özellikle etkin bir predasyon için ihtiyaç duyulan katyonları (magnezyum ve kalsiyum) içerdikleri görülmektedir [164].

Elde ettiğimiz izolatlara ait litik plaklardan DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş, farklı primer setleri kullanılarak PCR ile uygun sekanslar elde edilmiştir. Sekans verilerinin sonuçlarına göre örnekleme yapılan atık sudaki predatör çeşitliliği tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. PCR ile dört farklı primer seti ile ürün oluşumuna bakılmıştır. Daha fazla çeşitliliğin ortaya konulabilmesi için farklı spesifik primerlerinde ileri ki çalışmalarda denenmesi gerekmektedir.

İzolatlarının tanımlanması amacıyla primer setlerinden BbsF216 ve BbsR707 *Bdellovibrio bacteriovorus*, Bac676F ve Bac1442R *Bacteriovorax* sp., Per676F ve Per1443R *Peredibacter* sp. ve Mic431F ile Mic996R *Micavibrio* sp. için kullanılmış, ancak Mic431F ve Mic996R primer seti ile olumlu sonuç alınamamıştır. Davidov ve ark. [107], toprak numunelerinden PCR ile Bd529F, Bd1007R, Bac676F, Bac1442R, Per676F, Per1443R, Mic431F ve Mic996R primerleri ile 17 BALO izolatı tanımlamış, bu izolatların *Bdellovibrio* sp., *Bacteriovorax* sp., *Peredibacter* sp. ve *Micavibrio* sp. suşları olduğunu belirtmişlerdir. Bu primer setleri BALO izolatlarının tanımlanması için farklı çalışmalarda kullanılmıştır [168, 169]. Jurkevitch ve ark. [76], toprak numunelerinden izole edilen izolatların tanımlanması için 176F ve 887R primerleri kullanmış, çalışma sonucu *Bdellovibrio stolpii*, *Bdellovibrio starrii* ve *Bdellovibrio bacteriovorus*'u tanımlamışlardır. Bazı primer setlerinin de kullanıldığı görülmektedir [119, 162, 173].

16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması ve bu bölgelerin dizi analizi sonuçlarına göre tür ve cins düzeyinde filogenetik tanımlamalar yapılmaya çalışılmıştır. Bu predatör bakteriler arasında yapılan DNA hibridizasyon çalışmalarına bakıldığında, %75 ve üzeri oranında benzerlik görüldüğü için tam anlamıyla ayrılma meydana gelmemektedir. 16S rRNA analizi sonucuna göre çalışmamızda, tür bazında; 7 adet izolat %97-99 benzerlik oranıyla *Bdellovibrio bacteriovorus*, cins bazında 14 adet izolat %94-96 benzerlik oranıyla *Peredibacter* sp., 2 adet izolat %96-94 benzerlik oranıyla *Bdellovibrio* sp. ve 2 adet izolat %91 benzerlik oranıyla *Bacteriovorax* sp. olmak üzere toplam 25 adet predatör bakteri tanımlanmıştır (Tablo 4.4). Oyedara ve ark. [162], topraktan izole edilen iki farklı *Bdellovibrio* spp.'nin genomlarını dizmiş, filogenetik analizler sonucu, *Bdellovibrio* sp. SKB1291214 %99 oranında kültüre edilemeyen *Bdellovibrio* sp. clone 12L106

benzerlik gösterirken, *Bdellovibrio* sp. SSB218315 ise %96 oranında *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile %100 oranında *Bdellovibrio bacteriovorus* Tiberius benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Koval ve ark. [40] Kanada'da izole ettikleri izolatın, 16S rRNA gen dizisi ile oluşturulan filogenetik analizine göre, %93 oranında *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ile %90-93 oranında ise *Bdellovibrio bacteriovorus* izolatlarına (suş 109J, 114, 127) benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Feng ve ark. [163], 16S rDNA gen dizileme analizi ile aktif çamurdan elde ettikleri izolatın %99 oranında '*Bdellovibrio bacteriovorus* suşu Tiberius' ile benzerlik gösterdiğini, bu nedenle izolatı '*Bdellovibrio bacteriovorus* UP' olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada ise, Neighbor-Joining metodu ve Maximum Composit Likelihood ile filogenetik analizler yapılmış, dendogramlar oluşturularak sonuca gidilmiştir [18, 42, 44, 76, 174].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Predasyon organizmalar arasındaki ortak bir etkileşim şekli olup; popülasyon ekolojisi ve mikroorganizmalar arası rekabette önemli bir güçtür. Bu gücün popülasyon dinamikleri ve çeşitlilikte, mikroorganizmaların üzerinde büyük etkileri olmaktadır. Son yıllarda mikrobiyal ekoloji çalışmalarında predatör bakteri ya da topluluklarının ortaya çıkarılmasıyla bu güç daha da önemli hale gelmiştir.

Yaşamın hemen her alanında bakteriler; bakteriyofajların, protistlerin ve predatör prokaryotların predasyonuna maruz kalmıştır. Prokaryotik predasyon, farklı taksonomik bakteri grupları arasında yaygın bir hayatta kalma şekli gibi görünmekte ve muhtemelen gram pozitif ile gram negatifler arasında geniş bir konak aralığını etkilemektedir. Predatör prokaryotlar, *Bdellovibrio* sp.'nin keşfedildiği 1960'ların başından beri bilinmekte, birçok sucul ve karasal ortamdan izole edilen *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar (BALO) şu anda en çok incelenen predatör prokaryotlar grubunu oluşturmaktadır.

Bu çalışma ile predatör bakterilerin bazı suşları Dünya'nın farklı ülkelerinde tespit edilmiş, ancak ülkemizde henüz izolasyonları gerçekleştirilmemiştir. Bunun nedenlerinden birisi de predatör bakteri suşlarının izolasyonunun oldukça zor olmasıdır. Manisa Atık Su Arıtım Tesisi ham atık suyundan alınan numunelerden predatör bakteriler izole edilerek moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Sonuç olarak bu araştırma sonucunda elde edilen veriler, ileride yapılacak yeni projeler ve araştırmalar için yol gösterici olabilecek ve ülkemizde ki predatör bakteri çeşitliliğine katkıda bulunabilecektir.

Günümüzde özellikle ilaca dirençli patojenler, dünya çapında bir halk sağlığı tehdidi haline gelmektedir. Geniş bir konak hücre aralığına sahip ve predasyon yapan bu eşsiz organizmalar, 'canlı antibiyotikler' olarak patojen veya gıda bozulmalarına neden olabilen saprofitik gram negatif ve bazı gram pozitif bakterilerin kontrolünde kullanılabilirler. Bu predatör bakterilerin yüksek yapılı organizmalara karşı patojen olmamaları insan sağlığında da, zararlı olan patojen bakterilerle mücadelede kullanım olasılıklarını güçlendirmektedir. Bu suretle istenmeyen bakterilerin biyokontrol çalışmalarında biyolojik ajan olarak yararlanılabilir.

Karasal ortamlarda ki predatör suşlar ise özellikle fitopatojen bakterilere karşı denenebilir ve bitki hastalıklarıyla mücadelede kullanılabilirler. Yine bu

mikroorganizmaların toksik kirleticilerden pek etkilenmedikleri ve bu gibi maddeleri parçalayabildikleri ortaya konulmuş olmasına rağmen, çevresel kirleticilerin temizlenmesiyle ilgili remediasyon araştırmaları yeterli seviyede değildir.

Bu ve benzeri çalışmalar neticesinde varlığı ortaya konulan BALO'ın çeşitli bakteriler üzerindeki başarılı predasyonu, gelecekte endüstriyel, tıbbi, tarımsal, çevresel ve biyosavunmanın farklı alanlarında çok daha verimli amaçlar için kullanılacaklarını göstermekte ve sayısız potansiyel uygulamayı hızlandıracak daha fazla genetik manipölasyonlara da acilen ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Sinha, A., Hurakadli, M., Ravindra, S., Agarwal, A. *Bdellovibrio* Like Organisms: The Predatory Assassin. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences. 2014, 13(10), 32-36.
2. Summers, J.K., Kreft, J.U. Predation strategies of the bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* result in bottlenecks, overexploitation, minimal and optimal prey sizes. BioRxiv. 2019, DOI: 10.1101/621490.
3. Jurkevitch, E., Davidov, Y. Phylogenetic Diversity and Evolution of Predatory Prokaryotes. Microbiology Monographs (4), Jurkevitch, E. Predatory Prokaryotes. Berlin Heidelberg, 2006, 11-56 s.
4. Stanley, S.M. An ecological theory for the sudden origin of multicellular life in the late Precambrian. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1973, 70(5), 1486-1489.
5. Abrams, P.A. The evolution of predator-prey interactions: theory and evidence. Annual Review of Ecology Systematics. 2000, 31(1), 79-105.
6. Jurkevitch, E. A Brief History of Short Bacteria: A Chronicle of *Bdellovibrio* (and Like Organisms) Research. Microbiology Monographs (4), Jurkevitch, E. Predatory Prokaryotes. Berlin Heidelberg, 2006, 1-9 s.
7. Guerrero, R., Pedros-Alio, C., Esteve, I., Mas, J., Chase, D., Margulis, L., Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986, 83(7), 2138-2142.
8. Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F. Mitochondrial evolution. Science. 1999, 283(5407), 1476-1481.
9. Emelanov, V.V. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. European Journal of Biochemistry. 2003, 270(8), 1599-1618.
10. Yu, X-J., Walker, D.H. In: The Order *Rickettsiales*, The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Ed: Dworkin, M. et al. 2000, (3), 3-7.
11. Sacchi, L., Bigliardi, E., Corona, S., Beninati, T., Lo, N., Franceschi, A. A symbiont of the tick *Inoexes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. Tissue Cell. 2004, 36(1), 43-53.

12. Stolp, H. Lysis von Bakterien durch den Parasiten *Bdellovibrio bacteriovorus*. Institut für den wissenschaftlichen Film. Begleittext in Publikationen Wissenschaftlicher Film. 1967, 2, 695-706.
13. Starr, M.P., Seidler, R.J. The *Bdellovibrios*, Annual Review of Microbiology. 1971, 25, 649-678.
14. Beebe, J.M. Studies on the myxobacteria. 2. The role of myxobacteria as bacterial parasites. Iowa State College Journal of Science. 1941, 15, 319-337.
15. Perez, J., Munoz, A.M., Torres, F.S.T., Dorado, J.M. Bacterial predation: 75 years and counting. Environmental Microbiology. 2016, 18(3), 766-779.
16. Sherr, E.B., Sherr, B.F. High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. Nature. 1987, 325, 710-711.
17. Baer, M.L., Ravel, J., Chun, J., Hill, R.T., Williams, H.N. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary. 2000, 50, 219-224.
18. Davidov, Y., Friedjung, A., Jurkevitch, E. High diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) in soil revealed by culture-dependent and culture-independent methods. Environmental Microbiology, 2006, 8, 1667-1673.
19. Stolp, H., Starr, M.P., *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et.sp.n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. Antonie van Leeuwenhoek, 1963, 29(1), 217-248.
20. Stolp, H., Pertzold, H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für *Pseudomonas*-Bakterien. Phytopathologische Zeitschrift Journal of phytopathology. 1962, 45, 364-390.
21. Thomashow, L.S., Rittenberg, S. Waveform analysis and structure of flagella and basal complexes from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. Journal of Bacteriology. 1985, 163(3), 1038-1046.
22. Rittenberg, S.C. *Bdellovibrio*: Attack, penetration and growth on its prey. American Society for Microbiology. 1983, 49, 435-440.
23. Madigan, M.T., Martinko, J.M. Brock Mikroorganismaların Biyolojisi, Ed: Çökmüş, C. Palme Yayınevi, Ankara, 2010, 992 s.
24. Dwidar, M., Monnappa, A.K., Mitchell, R.J. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. BMB Reports. 2012,45(2), 71-78.

25. Seidler, R., Starr, M.P. Isolation and characterization of host-independent *Bdellovibrios*. *Journal of Bacteriology*. 1969, 100(2), 769-785.
26. Krieg, N.R., Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams&Wilkins, Baltimore, 1984, 1, 118-124.
27. Elsherif, M., Grossmann, F. Role of biotic factors in the control of soil-borne fungi by fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiological Research*. 1996, 151, 351-357.
28. Uematsu, T. Ecology of *Bdellovibrio* parasitic to rice bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*. *Review of Plant Protection Research*. 1980, 13, 12-26.
29. Pan, C.L., Hsu, Y.L., Tsai, G.J., Kuo, H.J., Chang, C.M., Wang, F.J., Wu, C.S. Isolation and identification of *Bdellovibrio* from coastal areas of Taiwan. *Fisheries Science*. 1997, 63(1), 52-59.
30. Miyamoto, S., Kuroda, K. Lethal effect of fresh sea water on *Vibrio parahaemolyticus* and isolation of *Bdellovibrio* parasitic against the organism. *Japanese Journal of Microbiology*. 1975, 19(4), 309-317.
31. Richardson, I.R. The incidence of *Bdellovibrio* spp., in man-made water systems: coexistence with legionellas. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1990, 69(1), 134-140.
32. Fry, J.C., Staples, D.G. Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976, 31(4), 469-474.
33. Williams, H., Falkler, W., Shay, D. Seasonal distribution of bdellovibrios at the mouth of the Patuxent river in the Chesapeake bay. *Canadian Journal of Microbiology*. 1982, 28(1), 111-116.
34. Kelley, J.I., Williams, H.N. *Bdellovibrios* in *Callinectes sapidus*, the blue crab. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58(4), 1408-1410.
35. Staples, D.G., Fry, J.C. Factors which influence the enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage and river water. *Journal of Applied Bacteriology*. 1973, 36(1), 1-11.
36. Cao, H., He, S., Wang, H., Hou, S., Lu, L., Yang, X. *Bdellovibrios*, potential biocontrol bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Microbiology*. 2012, 154(3-4), 413-418.
37. Scherff, R.H. Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Phytopathology*. 1973, 63(3), 400-402.

38. Parker, C.A., Grove, P.L. *Bdellovibrio bacteriovorus* parasitizing *Rhizobium* in western Australia. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1970, 33(1), 253-255.
39. Fratamico, P.M., Cooke, P.H. Isolation of bdellovibrios that prey on *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety*. 1996, 16(2), 161-173.
40. Koval, S.F., Hynes, S.H., Flannagan, R.S., Pasternak, Z., Davidov, Y., Jurkevitch, E. *Bdellovibrio exovorus* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013, 63(1), 146-151.
41. Siedler, R.J., Mendel, M., Baptist, J.N. Molecular heterogeneity of the bdellovibrios: evidence for two new species. *Journal of Applied Bacteriology*. 1972, 109(1), 209-217.
42. Davidov, Y., Jurkevitch, E. Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54(5), 1439-1452.
43. Pineiro, S.A., Williams, H.N., Stine, O.C. Phylogenetic relationships amongst the saltwater members of the genus *Bacteriovorax* using *rpoB* sequences and reclassification of *Bacteriovorax stolpii* as *Bacteriolyticum stolpii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, 58(5), 1203-1209.
44. Baer, M.L., Ravel, J., Pineiro, S.A., Guether-Borg, D., Williams, H.N. Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54(4), 1011-1016.
45. Koval, S.F., Williams, H.N., Stine, O.C. Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of *Halobacteriovoracaceae* fam. nov. in the class *Deltaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015, 65(2), 593-597.
46. Lambina, V.A., Afinogenova, A.V., Romai, P. S., Konovalona, S.M., Pushkareva, A.P. *Micavibrio admirandus* gen. et sp. nov. *Mikrobiologiya*. 1982, 51(1), 114-117.

- 47.** Davidov, Y., Huchon, D., Koval, S.F., Jurkevitch, E. A new α -proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environmental Microbiology*. 2006, 8(12), 2179-2188.
- 48.** Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., Keller, H., Lambert, C., Evans, K.J., Goesmann, A., Meyer, F., Sockett, E.R., Schuster, S. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*. 2004, 303(5658), 689-692.
- 49.** Pineiro, S., Stine, C.O., Chauhan, A., Steyert, S.R., Smith, R., Williams, H.N. Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoraceae*. *Environmental Microbiology*. 2007, 9(10), 2441-2450.
- 50.** Guether, D.L., Williams, H. N. Antibioqram characterization of aquatic and terrestrial *Bdellovibrio* isolates. 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. 1993, Atlanta, Georgia, USA, 391 s.
- 51.** Lambina, V.A., Afinogenova, A.V., Romay, P.S., Konovalona, S.M., Andreev, L.V. New species of exoparasitic bacteria from the genus *Micavibrio* infecting gram-positive bacteria. *Mikrobiologiya*. 1983, 52(5), 777-780.
- 52.** Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. Taxonomic outline of the Procaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0. Springer-Verlag, New York, 2004, 1-399.
- 53.** Fitzpatrick, D.A., Creevey, C.J., McInerney, J.O. Genome phylogenies indicate a meaningful α -proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the *Rickettsiales*. *Molecular Biology and Evolution*. 2006, 23(1), 74-85.
- 54.** Afinogenova, A.V., Markelova, N.Y., Lambina, V.A. Detection of enzyme-activities of some metabolic pathways in *Micavibrio admirandus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. 1986, 141(6), 471-475.
- 55.** Rotem, O., Pasternak, Z., Jurkevitch, E. The Genus *Bdellovibrio* and Like Organisms. *The Prokaryotes-Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*, Ed: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, 3-17 s.
- 56.** Straley, S.C., Conti, S.F. Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward prey. *Journal of Bacteriology*. 1977, 132(2), 628-640.

57. Straley, S.C., LaMarre, A.G., Lawrence, L.J., Conti, S.F. Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward pure compounds. *Journal of Bacteriology*. 1979, 140(2), 634-642.
58. Schoeffield, A.J., Williams, H.N., Turng, B.F., Falkler, W.A. A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase *Bdellovibrios* with reduced oxygen. *Microbial Ecology*. 1996, 32(1), 35-46.
59. Jurkevitch, E. The genus *Bdellovibrio*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, Ed: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. New York: Springer. 2006, 3(7), 12-30.
60. LaMarre, A.G., Straley, S.C., Conti, S.F. Chemotaxis toward amino acids by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*. 1977, 131(1), 201-207.
61. Varon, M., Shilo, M. Ecology of aquatic *Bdellovibrios*. Ed: Droop, M.R., Jannash, H.W. *Advances in Aquatic Microbiology*. Academic Press. New York. 1980, 1-48 s.
62. Lerner, T.R., Lovering, A.L., Bui, N.K., Uchida, K., Aizawa, S.I., Vollmer, W., Sockett, R.E. Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness. *PLoS Pathogens*. 2012, 8(2), e1002524.
63. Butan, C., Hartnell, L.M., Fenton, A.K., Bliss, D., Sockett, R.E., Subramaniam, S., Milne, J.L.S. Spiral architecture of the nucleoid in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193(6), 1341-1350.
64. Kessel, M., Shilo, M. Relationship of *Bdellovibrio* elongation and fission to host cell size. *Journal of Bacteriology*. 1976, 128(1), 477-480.
65. Fenton, A.K., Kanna, M., Woods, R.D., Aizawa, S.I., Sockett, R.E. Shadowing the actions of a predator: Backlit fluorescent microscopy reveals synchronous non binary septation of predatory *Bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *Journal of Bacteriology*. 2010, 192(24), 6329-6335.
66. Sanchez-Amet, A., Torrella, F. Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine *Bdellovibrios*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(9), 2717-2725.
67. Tudor, J.J., Conti, S.F. Characterization of bdelloplasts of *Bdellovibrio* sp. *Journal of Bacteriology*. 1977, 131(1), 314-322.
68. Friedberg, D. Effect of light on *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*. 1977, 131(2), 399-404.

- 69.** Ishiguro, E.E. Minimum nutritional requirements for growth of host independent derivatives of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109 Davis. *Canadian Journal of Microbiology*. 1974, 20(2), 263-264.
- 70.** Schwudke, D., Linscheid, M., Strauch, E., Appel, B., Zahringer, U., Moll, H., Muller, M., Brecker, L., Gronow, S., Lindner, B. The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing alpha-D-Mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain *B. bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(30), 27502-27512.
- 71.** Medina, A.A., Kadouri, D.E. Biofilm formation of *Bdellovibrio bacteriovorus* host-independent derivatives. *Research in Microbiology*. 2009, 160(3), 224-231.
- 72.** Gray, K.M., Ruby, E.G. Prey-derived signals regulating duration of the developmental growth phase of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(7), 4002-4007.
- 73.** Thomashow, M.F., Cotter, T.W. *Bdellovibrio* host dependence: the search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. *Journal of Bacteriology*. 1992, 174(18), 5767-5771.
- 74.** Dashiff, A., Kadouri, D.E. A new method for isolating host-independent variants of *Bdellovibrio bacteriovorus* using *E. coli* auxotrophs. *The Open Microbiology Journal*. 2009, 3, 87-91.
- 75.** Cotter, T.W., Thomashow, M.F. Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with the host-independent phenotype. *Journal of Bacteriology*. 1992, 174(19), 6018-6024.
- 76.** Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., Barel, G. Prey range characterization, ribotyping and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(6), 2365-2371.
- 77.** Monnappa, A.K., Dwidar, M., Seo, J.K., Hur, J-H., Mitchell, R.J. *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Scientific Reports*. 2014, 4, 3811-3819.
- 78.** Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., Sorek, R. A global transcriptional switch between the attack and growth forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS One*. 2013, 8(4), e61850.

- 79.** Roschanski, N., Klages, S., Reinhardt, R., Linscheid, M., Strauch, E. Identification of genes essential for prey-independent growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193(7), 1745-1756.
- 80.** Lambert, C., Chang, C.Y., Capeness, M.J., Sockett, R.E. The first bite-profiling the predatosome in the bacterial pathogen *Bdellovibrio*. *PLoS One*. 2010, 5(1), e8599.
- 81.** Wang, Z., Kadouri, D., Wu, M. Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*. 2011, 12, 453.
- 82.** Mills, E., Pultz, I.S., Kulasekara, H.D., Miller, S.I. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cellular Microbiology*. 2011, 13(8), 1122-1129.
- 83.** Hobley, L., Fung, R.K., Lambert, C., Harris, M.A., Dabhi, J.M., King, S.S., Basford, S.M., Uchida, K., Till, R., Ahmad, R., Aizawa, S., Gomelsky, M., Sockett, R.E. Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathogens*. 2012, 8(2), e1002493.
- 84.** Barabote, R.D., Rendulic, S., Schuster, S.C., Saier, M.H.Jr. Comprehensive analysis of transport proteins encoded within the genome of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Genomics*. 2007, 90(4), 424-446.
- 85.** Beck, S., Schwudke, D., Strauch, E., Appel, B., Linscheid, M. *Bdellovibrio bacteriovorus* strains produce a novel major outer membrane protein during predacious growth in the periplasm of prey bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2004, 186(9), 2766-2773.
- 86.** Chang, C.Y., Hobley, L., Till, R., Capeness, M., Kanna, M., Burt, W., Jagtap, P., Aizawa, S., Sockett, R.E. The *Bdellovibrio bacteriovorus* twin-arginine transport system has roles in predatory and prey-independent growth. *Microbiology*. 2011, 157(11), 3079-3093.
- 87.** Hespell, R.B., Rosson, R.A., Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C. Respiration of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109J and its energy substrates for intraperiplasmic growth. *Journal of Bacteriology*. 1973, 113(3), 1280-1288.
- 88.** Fackrell, H.B., Robinson, J. Purification and characterization of a lytic peptidase produced by *Bdellovibrio bacteriovorus* 6-5-S. *Canadian Journal of Microbiology*. 1973, 19(5), 659-666.

- 89.** Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: solubilization of *Escherichia coli* peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 1978, 135(3), 998-1007.
- 90.** Araki, Y., Ruby, E.G. A soluble enzyme activity that attaches free diaminopimelic acid bdelloplast peptidoglycan. *Biochemistry*. 1988, 27(7), 2624-2629.
- 91.** Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: N-deacetylation of *Escherichia coli* peptidoglycan amino sugars. *Journal of Bacteriology*. 1978, 135(3), 1008-1014.
- 92.** Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: attachment of long-chain fatty acids to *Escherichia coli* peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 1978, 135(3), 1015-1023.
- 93.** Tudor, J.J., McCann, M., Acrich, I.A. A new model for the penetration of prey cells by *Bdellovibrios*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(5), 2421-2426.
- 94.** Seidler, R.J., Starr, M.P. Factors affecting the intracellular parasitic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* developing within *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1969, 97(2), 912-923.
- 95.** Gadkari, D., Stolp, H. Energy metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus*. II. P/O ratio and ATP pool turnover rate. *Archives of Microbiology*. 1976, 108(1), 125-132.
- 96.** Ruby, E.G., McCabe, J.B. An ATP transport system in the intracellular bacterium, *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*. 1986, 167(3), 1066-1070.
- 97.** Rosson, R.A., Rittenberg, S.C. Regulated breakdown of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*. 1979, 140(2), 620-633.
- 98.** Engelking, H.M., Seidler, R.J. The involvement of extracellular enzymes in the metabolism of *Bdellovibrio*. *Archiv fur Mikrobiologie*. 1974, 95(4), 293-304.
- 99.** Rosson, R.A., Rittenberg, S.C. Pyrimidine metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus* grown intraperiplasmically and anexically. *Journal of Bacteriology*. 1981, 146, 108-116.
- 100.** Rittenberg, S.C., Hespell, R.B. Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*. 1975, 121(3), 1158-1165.

- 101.** Hespell, R.B., Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C. Changes in cell composition and viability of *Bdellovibrio bacteriovorus* during starvation. Archives of Microbiology. 1974, 97(1), 313-327.
- 102.** Shilo, M. Predatory bacteria. Science Journal. 1966, 2, 33-37.
- 103.** Varon, M., Shilo, M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Journal of Bacteriology. 1968, 95(3), 744-753.
- 104.** Williams, H.N., Schoeffied, H.N., Guether, D., Kelley, J., Shah, D., Falkler, W.A. Recovery of *Bdellovibrios* from submerged surfaces and other aquatic habitats. Microbial Ecology. 1995, 29(1), 39-48.
- 105.** Williams, H.N., Pineiro, S. Ecology of the Predatory *Bdellovibrio* and Like Organisms. Microbiology Monographs Ed: Jurkevitch E. Predatory Prokaryotes. 2006, 213-248.
- 106.** Van Essche, M., Sliepen, I., Loozen, G., Van Eldere, J., Quiryne, M., Davidov, Y., Jurkevitch, E., Boon, N., Teughels, W. Development and performance of a quantitative PCR for the enumeration of *Bdellovibrionaceae*. Environmental Microbiology Reports. 2009, 1(4), 228-233.
- 107.** Davidov, Y., Friedjung, A., Jurkevitch, E. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms. Environmental Microbiology. 2006, 8(9), 1667-1673.
- 108.** Varon, M., Zeigler, B. Bacterial predator-prey interaction at low prey density. Applied and Environmental Microbiology. 1978, 36(1), 11-17.
- 109.** Schoeffield, A.J., Falkler, Jr., W.A., Desai, D., Williams, H.N. Serogrouping of halophilic *Bdellovibrios* from Chesapeake Bay and environs by immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 1991, 57(12), 3470-3475.
- 110.** Schoeffield, A.J., Williams, H.N., Turng, B., Fackler, W.A.J. A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase *Bdellovibrios* with reduced oxygen. Microbial Ecology. 1996, 32(1), 35-46.
- 111.** Monnappa, A.F., Dwidar, M., Mitchell, R.J. Application of bacterial predation to mitigate recombinant bacterial populations and their DNA. Soil Biology and Biochemistry. 2013, 57, 427-435.

- 112.** Pasternak, Z., Pietrokovski, S., Rotem, O., Gophna, U., Lurie-Weinberger, M.N., Jurkevitch, E. By their genes ye shall know them: genomic signatures of predatory bacteria. *The ISME Journal*. 2012, 7(4), 756-769.
- 113.** Wanner, O. Modeling of population dynamics. Ed: Characklis, W.G., Wilderer, P.A. *Structure and function of biofilms*. Wiley & Sons. New York, NY. 1989, 91-110.
- 114.** Markelova, N.Y., Shahamat, M., Levin, M.A., Colwell, R.R. Effect of various pollutants on *Bdellovibrio*'s contribution to the self-purification processes. 8th International Symposium on Microbial Ecology. 1998, 227.
- 115.** Edao, A. Research on the occurrence and importance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the gastrointestinal tract of humans, animals as well as in the natural environment. Dissertation, University of Leipzig, Germany. 2000.
- 116.** Markelova, N.Y. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with bacteria *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Microbiology*. 2010, 79(6), 777-779.
- 117.** Dashiff, A., Junka, R.A., Libera, M., Kadouri, D.E. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, 110(2), 431-444.
- 118.** Sockett, R.E., Lambert, C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*. 2004, 2(8), 669-675.
- 119.** Pantanella, F., Lebba, V., Mura, F., Dini, L., Totino, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., Trancassini, M., Passariello, C., Schippa, S. Behaviour of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of gram positive *Staphylococcus aureus*. *The New Microbiologica*. 2018, 41(2), 145-152.
- 120.** Johnke, J., Boenigk, J., Harms, H., Chatzinotas, A. Killing the killer: predation between protists and predatory bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2017, 364(9), fnx089,1-8.
- 121.** Kadouri, D.E., To, K., Shanks, R.M., Doi, Y. Predatory bacteria: A potential ally against multidrug-resistance gram negative pathogens. *Plos One*. 2013, 8(5), e63397,1-4.
- 122.** Im, H., Choi, S.Y., Son, S., Mitchell, R.J. Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), 14415-14422.

- 123.** Kadouri, D., O'Toole, G.A. Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(7), 4044-4051.
- 124.** Im, H., Dwidar, M., Mitchell, R.J. *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100, a predator of Gram-negative bacteria, benefits energetically from *Staphylococcus aureus* biofilms without predation. *The ISME Journal*. 2018, 12 (8), 2090-2095.
- 125.** Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. The EPS matrix: The "House of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(22), 7945-7947.
- 126.** Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74(2), 470-476.
- 127.** Park, J.H., Lee, J.H., Kim, C.J., Lee, J.C., Cho, M.H., Lee, J. Extracellular protease in *Actinomyces* culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Biotechnology Letters*. 2012, 34(4), 655-661.
- 128.** Thomashow, L.S., Rittenberg, S.C. Waveform analysis and structure of flagella and basal complexes from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*. 1985, 163(3), 1038-1046.
- 129.** Van Essche, M., Quirynen, M., Sliepen, I., Van Eldere, J., Teughels, W. *Bdellovibrio bacteriovorus* Attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Dental Research*. 2009, 88(2), 182-186.
- 130.** Van Essche, M., Quirynen, M., Sliepen, I., Loozen, G., Boon, N., Van Eldere, J., Teughels, W. Killing of anaerobic pathogens by predatory bacteria. *Molecular Oral Microbiology*. 2011, 26(1), 52-61.
- 131.** Stewart, P.S., Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001, 358(9276), 135-138.
- 132.** Nakamura, M. Alteration of *Shigella* pathogenicity by other bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1972, 25(12), 1441-1451.
- 133.** Westergaard, J.M., Kramer, T.T. *Bdellovibrio* and the intestinal flora of vertebrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 1977, 34(5), 506-511.
- 134.** Willis, A.R., Moore, C., Mazon-Moya, M., Krokowski, S., Lambert, C., Till, R., Mostowy, S., Sockett, R.E. Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat *Shigella* Infection in Zebrafish Larvae. *Current Biology*. 2016, 26(24), 3343-3351.

- 135.** Atterbury, R.J., Hogley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M.J., Lerner, T.R., Fenton, A.K., Barrow, P., Sockett, R.E. Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(16), 5794-5803.
- 136.** Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., Appel, B. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001, 24(3), 385-394.
- 137.** Boileau, M.J., Clinkenbeard, K.D., Iandolo, J.J. Assessment of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J killing of *Moraxella bovis* in an in vitro model of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2011, 75(4), 285-291.
- 138.** Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., Dharani, S., Onyile, O., Rinaggio, J., Connell, N.D., Kadouri, D.E. Predatory bacteria attenuate *Klebsiella pneumoniae* burden in rat lungs. *mBio*. 2016, 7(6), e01847-16.
- 139.** Romanowski, E.G., Stella, N.A., Brothers, K.M., Yates, K.A., Funderburgh, M.L., Funderburgh, J.L., Gupta, S., Dharani, S., Kadouri, D.E., Shanks, R.M.Q. Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface. *Scientific Reports*. 2016, 6, 30987-9.
- 140.** Gupta, S., Tang, C., Tran, M., Kadouri, D.E. Effect of Predatory Bacteria on Human Cell Lines. *PLoS One*. 2016, 11(8), e0161242-15.
- 141.** Epton, H.A.S., Walker, N.M., Sigeo, D.C. *Bdellovibrio*: a potential control agent for soft rot and black leg of potato. Ed: Klement, Z. *Plant pathogenic bacteria-Part A*. Akademia Kiado. Budapest. 1989, 207-212.
- 142.** Germida, J.J. Isolation of *Bdellovibrio* spp. that prey on *Azospirillum brasilense* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 1987, 33(5), 459-461.
- 143.** Varon, M., Shilo, M. Inhibition of the predatory activity of *Bdellovibrio* by various environmental pollutants. *Microbial Ecology*. 1981, 7(2), 107-111.
- 144.** Markelova, N.Y. Effect of toxic pollutants on *Bdellovibrio*. *Process Biochemistry*. 2002, 37(10), 1177-1181.
- 145.** Markelova, N.Y., Gariev, I.A. Predatory bacteria *Bdellovibrio*: survival strategy. *Process Biochemistry*. 2005, 40(3-4), 1089-1094.

- 146.** Markelova, N.Y. Survival Strategy of *Bdellovibrio*. *Microbiology*. 2007, 76(6), 769-774.
- 147.** Kim, E.H., Dwidar, M., Mitchell, R.J., Kwon, Y.N. Assessing the effects of bacterial predation on membrane biofouling. *Water Research*. 2013, 47(16), 6024-6032.
- 148.** Özkan, M., Yılmaz, H. Avcı Bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2018, 48(1), 29-37
- 149.** Yu, R., Zhang, S., Chen, Z., Li, C. Isolation and application of predatory *Bdellovibrio*-and-like organisms for municipal waste sludge biolysis and dewaterability enhancement. *Frontiers of Environmental Science Engineering*. 2017, 11(1), 10-21.
- 150.** Dwidar, M., Yokobayashi, Y. Controlling *Bdellovibrio bacteriovorus* Gene Expression and Predation Using Synthetic Riboswitches. *ACS Synthetic Biology*. 2017, 6(11), 2035-2041.
- 151.** Gupta, S., Lemenze, A., Donnelly, R.J., Connell, N.D., Kadouri, D.E. Keeping it together: absence of genetic variation and DNA incorporation by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus* during predation. *Research in Microbiology*. 2018, 169(4-5), 237-243.
- 152.** Jurkevitch, E. Isolation and Classification of *Bdellovibrio* and Like Organisms. *Current Protocols in Microbiology*. Malden, MA, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2012, 7, 1-17.
- 153.** Yılmaz, H., Çelik, M.A., Şengezer, Ç., Özkan, M. Use of *Bdellovibrio bacteriovorus* as Biological Cleaning Method for MBR Systems. 2nd International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology (ICETET'2014). 30-31 May, 2014, London (UK), 192-195.
- 154.** Snellen, J.E., Starr, M.P. Alterations in the Cell Wall of *Spirillum serpens* VHL Early in Its Association with *Bdellovibrio bacteriovorus* 109D. *Archives of Microbiology*. 1976, 108(1), 55-64.
- 155.** Berlendis, S., Cayol, J.L., Verhé, F., Laveau, S., Tholozan, J.L., Ollivier, B., Auria, R. First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160(7), 1992-1999.

- 156.** Dias, F.F., Bhat, J.V. Microbial ecology of activated sludge. II. Bacteriophages, coliforms, and other organisms. *Applied Microbiology*. 1965, 13, 257-261.
- 157.** Afinogenova, A.V., Penabad, S.R., Konovalova, S.M., Churkina, L.G., Lambina, V.A. Comparative characteristics of strains of the *Bdellovibrio* strains isolated from river water and sewage. *Mikrobiologiya*. 1981, 50(2), 378-385.
- 158.** Klein, D.A., Casida, L.E.J. Occurrence and enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in soil capable of parasitizing *Escherichia coli* and indigenous soil bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1967,13(9),1235-1241.
- 159.** Lindstrom, A. Enumeration of *Bdellovibrio* sp. in aquatic environments using host bacteria isolated from nature. *Microbial diversity*, MBL, Inst. of Limnology, Uppsala university, Sweden. 1993, 1-5 s.
- 160.** El-Shanshoury, A.E.R., Abo-Amer, A.E., Alzahrani, O.M. Isolation of *Bdellovibrio* sp. from wastewater and their potential application in control of *Salmonella paratyphi* in water. *Geomicrobiology Journal*. 2016, 33(10), 886-893.
- 161.** Sar, T.T., Umeh, E.U., Akosu, D.D. Occurrence, Detection and Isolation of *Bdellovibrio* spp. from Some Fresh Water Bodies in Benue State, Nigeria. *Microbiology Journal*. 2015, 5(1), 21-27.
- 162.** Oyedara, O.O., Santillana, E.J.D.L., Rodriguez, O.O., Guo, X., Villa, M.A.M., Arredondo, J.L.M., Elufisan, T.O., Hernandez, J.A.G., Leon, I.G., Perez, M.A.R. Isolation of *Bdellovibrio* sp. from soil samples in Mexico and their potential applications in control of pathogens. *Microbiology Open*. 2016, 5(6), 992-1002.
- 163.** Feng, S., Tan, C.H., Cohen, Y., Rice, S.A. Isolation of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a tropical wastewater treatment plant and predation of mixed species biofilms assembled by the native community members. *Environmental Microbiology*. 2016, 18(11), 3923-3931.
- 164.** Waso, M., Khan, S., Khan, W. Assessment of predatory bacteria and prey interactions using culture-based methods and EMA-qPCR. *Microbiological Research*. 2019, DOI: 10.1016/j.micres.2019.126305.
- 165.** Varon, M., Shilo, M. Method for separation of *Bdellovibrio* from mixed bacterial population by filtration through millipore or by gradient differential centrifugation. *Revue Internationale d'Océanographie Médicale*. 1970, 18(19), 145-152.
- 166.** Stolp, H. The genus *Bdellovibrio*. Ed: Starr, M.P., Stolp, H., Troper, H.G., Balows, Schegel., A. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag. Berlin, 1981, 618-629.

- 167.** Klein, D.A., Casida, L.E.J. Occurrence and enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in soil capable of parasitizing *Escherichia coli* and indigenous soil bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1967,13(9), 1235-1241.
- 168.** Paix, B., Jacquet, S. *Bdellovibrio* and like organisms bacterial predators are not equally distributed in peri-alpine lakes. *BioRxiv*. 2017, 194688-22.
- 169.** Paix, B., Ezzedine J.A., Jacquet, S. Diversity, dynamics and distribution of *Bdellovibrio* and like organisms in peri-alpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019, DOI:10.1128/AEM.02494-18.
- 170.** Lambert, C., Morehouse, K.A., Chang C.Y., Sockett, R.E. *Bdellovibrio*: Growth and development during the predatory cycle. *Current Opinion in Microbiology*. 2006, 9(6), 639-644.
- 171.** Chen, H., Laws, E.A., Martin, J.L., Berhane, T.K., Gulig, P.A., Williams, H.N. Relative Contributions of *Halobacteriovorax* and Bacteriophage to Bacterial Cell Death under Various Environmental Conditions. *American Society for Microbiology. MBio*. 2018, 9(4), e01202-18.
- 172.** Hobley, L., King, J.R., Sockett, R.E. *Bdellovibrio* Predation in the Presence of Decoys: Three-Way Bacterial Interactions Revealed by Mathematical and Experimental Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72 (10), 6757-6765.
- 173.** Snyder, A.R., Williams, H.N., Baer, M.L., Walker, K.E., Stine, O.C. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio* and like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 2002, 52(6), 2089-2094.
- 174.** Lauderdale, K.J., Malone, C.L., Boles, B.R., Morcuende, J., Horswill, A.R. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010, 28(1), 55-61.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek ŞEKER
Doğum Yeri ve Yılı : Balıkesir, 1984
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : dilek.seker@cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Balıkesir Fatma Emin Kutvar Anadolu Lisesi, 2003.

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2008.

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı, 2011.

Mesleki Deneyim : Araştırma Görevlisi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 2010-.....(halen).