MİKROBİYOLOJİYE GİRİŞ
MİKROBİYOLOJİ DERS TAKVİYE NOTU, Eylül 2008

GİRİŞ

Mikros: küçük, **Bios**: hayat, **Logos**: ilim

Çok uzun süre gözle görülmeyen yaratıkların varlığından şüpheleniliyordu; ancak keşifleri, mikroskobun icadı ile gelişti. Robert Hooke, 1664'de mayaların meyve gibi üreyen yapılarını tanımladı. Mikroorganizmaları detaylı olarak ilk gören kişi amatör mikroskop imalatcısı Hollanda'lı Antoni van Leeuwenhoek'dur. Ancak 19. Yy'da gelişmiş mikroskoplar yapıldı ve mikrobiyoloji, buna paralel olarak gelişti. Gecikmenin bir sebebi de mikroorganizmaları incelemek için gerekli tekniklerin geliştirilmesiydi.

Açıkta bırakılan gıdalarda bir süre sonra bakteri üremesi sonucu bozulma olduğu görüldü; bunun cansız materyalden spontan oluştuğu bile tartışıldı. İlk defa Fransız kimyacısı Louis Pasteur havada, gıdada bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara benzer yapılar olduğunu gösterdi. Pasteur, solunan havada devamlı olarak çeşitli katı maddeler olduğunu ve bunların ebatlarının 0.01 mm ilâ > 1.0 mm olduğunu gösterdi. Gıdadaki canlıların havadakilerden üreme sonucu meydana geldiği anlaşıldı. Yani bu cisimler havada olduklarından her yerde vardır ve bütün maddelere konarlar, gıdayı da kontamine ederler.

Pasteur kontamine edici (kontaminan) bu maddeleri uzaklaştırmak için ısı kullandı. Yani onları öldürdü. Şimdi ısı ile mimroorganizmaları öldürmeye sterilizasyon diyoruz. Sterilizasyondan sonra tekrar bakteri vs. bulaşmaması için gerekli tekniklere de aseptik teknik denir. Gıdalardaki konserve ve reçel yapmanın da temeli sterilizasyondur. Ancak, bazan kaynatma yeterli sterilizasyon sağlamaz; endospor oluşturan, ısıya-dayanıklı yapılar ölmez. İlk defa *Bacillus* hücrelerinin içinde endosporlar Cohn ve Koch tarafından gösterilmiştir. Daha sonraları hastalıkların sebebi olarak da mikroorganizmalar bulundu: anthrax (*Bacillus anthracis*) (Koch) gibi. Kültürde, yani mikoorganizmaları, canlı vücudu dışında üretme teknikleri bulunduktan sonra da saf kültürler halinde üretme metodu geliştirildi. Bunlardan tek koloni izolasyonu artık mikrobiyolojinin vaz geçilmez tekniklerinden biri haline geldi. Böylece infeksiyon hastalıklarının; teşhis, önleme ve tedavi metodları da geliştirildi.

20. Yüzyılda Mikrobiyolojide Gelişmeler:

Medikal mikrobiyoloji ve immunoloji 20. yüzyılda geliştiler. Patojenler ve vücudun savunma mekanizması ile ilgili çok önemli bilgiler elde edildi. Ziraî mikrobiyolojideki gelişmelerle, topraktaki mikrobiyal prosesler ve dolayısıyla bitki büyümesine müsbet ve menfî etkileri araştırıldı. Toprak mikrobiyolojisindeki gelişmeler sonucu antibiyotiklerin oluşumu ve endüstriyel kimyasalların oluşumu bulundu; bunun sonucunda da ; bilhassa II. Dünya Savaşından sonra endüstriyel mikrobiyoloji gelişti.

Su mikrobiyolojisindeki gelişmelerle insan ve insan faaliyetleri sonucu oluşan atıklar olan kanalizasyonların arıtılmasında mikropların kullanılması başarıldı. İlk büyük kapasiteli atıksu arıtma tesisleri geliştirildi. Temiz içme suyu mikrobiyolojisi gelişti.

Virüsler bulundu ve araştırmalarda bakteriyofajlar kullanıldı. Genetik çalışmalarda bakterilerin kullanılmasıyla gen mühendisliği gelişti. Dolayısıyla biyoteknoloji ve moleküler biyoloji, insanlığın refahı ve sağlığı için kullanılmaya başlandı. Evrim çalışmalarında moleküler sekanslamada ilk kullanılan canlılar arasında mikroorganizmalar vardır.

SINIFLANDIRMA

Sınıflandırmada 5 Alem (Kingdom) vardır:

1) Monera — Bakteriler. İç yapıları oldukça basit tek hücreler. Üreticiler veya ayrıştırıcılar.
2) Protista — Protistan'lar. İç yapıları oldukça karmaşık tek hücreliler. Üreticiler veya tüketiciler.
3) Fungi — Fungus'lar. Genellikle çok hücreliler. Ayrıştırıcılar.
4) Plantae — Bitkiler. Genellikle çok hücreliler. Genellikle üreticiler.
5) Animalia — Hayvanlar. Çok hücreliler. Tüketiciler.

Bakteriler çok küçük ve yapısal çok az özellikleri olduğu için prokaryotlardaki filogenetik ilişkiler fenotip analizi yerine genotipik analizlere dayanmaktadır. Eskiden fenotip kullanılıyordu.

Mikrobiyolojide de temel taksonomik birim tür'dür. Bir tür genellikle birkaç suş veya klon'un tanımlanmasıyla yapılır. Buradaki anlamıyla klon: tek hücreden gelen, genetik olarak benzer hücre

popülasyonudur. Türler genus'da grup olarak toplanmışlardır. Genellikle genuslar (genera) grubu olan familia'lar, prokaryot taksonomisindeki en yüksek taksonomik birimdir.

Yani bir genus veya tür için resmî işlem ancak organizmanın saf kültürünün tasdik olunmuş ATCC (American Type Culture Collection) veya DSM (Alman Mikroorganizmalar Kolleksiyonu: German Collection for Microorganisms)e yatırılması ve yeni türün tip suş'unu temsil etmesi gerekmektedir. Diğer türler buna göre karşılaştırılabilir. Artık fenotipik tanımlanması ile birlikte **16*S* rRNA sekansının** da yayımlanması istenmektedir. Bu metod 1987 yılında **Woese** tarafından geliştirilmiştir. Yeni tür veya izolat için 16*S* rRNA'da %1.5-2.0'lik veya daha büyük sekans farkı olması gerekmektedir. Teşhis için her zaman canlı tip suş gerekmektedir. Eukaryotlarda aynı analiz 18S rRNA ile yapılmaktadır.

Mikroorganizmalardaki çeşitlilik, evolüsyon sonucu: mutasyon ve genetik rekombinasyonlarla ortaya çıkmış; böylece çeşitli habitatlarda üreyebilmişlerdir. Yeni mikrobiyolojik habitatlar ortaya çıktıkca; ya mevcut organizmalar veya genetik yollarla meydana gelen yeni organizmalar tarafından mikropların işgaline uğramaktadır. En iyi üreyebilen ve rekabet edebilen organizmalar bu habitatlarda yerleşirler. Yani, çevre, devamlı "en iyi adapte olan organizmaları" seleksiyona tabi tutmaktadır. Dünya üzerindeki habitatların fiziki ve kimyasal çeşitliliği sonucunda bugünkü çok zengin mikrobiyolojik çeşitlilik ortaya çıkmıştır. Bilindiği gibi, Dünya'nın yaşı 4.5 Milyar yıl olarak hesaplanmaktadır. Mikrobiyolojik hayata ait ilk deliller kayalarda bulunmuştur ve yaklaşık 3.5 Milyar yıl yaşındadır. Uzun süre Dünya üzerindeki hayatın sadece mikoorganizmalardan meydana geldiği teorisi ileri sürülmüştür.

Yeni Metodlar, Moleküler Analiz:

Günümüzde klinik örneklerde tespit edilen bakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonu amacıyla biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. 16S rRNA çok iyi korunmuş diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. Elde edilen bakteri sekanslarının bilgisayar ortamında karşılaştırılması gereken standard sekanslara ihtiyaç vardır. İdeali bakterinin kromozom DNA'sının tamamının sekansını karşılaştırmaktır, ancak günümüzde bu fizibil değildir. Her suş için milyonlarca nükleotidin sekansının çıkarılması gerekmektedir. Geçmişte sadece birkaç bakteri için tüm DNA sekansı çözümlenebilmiştir.

Gelişim olarak bakıldığında, genomik benzerlik guanin (G) artı sitozin (C) ile, genellikle %GC olarak yapılmaktaydı. Bunu yerini iki yeni ve alternatif metod almaktadır: hibridizasyon ve 16S rRNA'yı kodlayan genin sekanslanması. Bakteri suşarı/türleri için yakınlık derecesini tespit amacıyla **DNA-DNA homolojisi** (farklı bakterilerden iki DNA ipliği ne derece hibritleşebiliyor) kullanılmaktadır. Eğer iki bakteri suşunun DNA'ları yüksek derecede homoloji gösterirse (yani iyi bağlanırsa) bu suşların aynı türün üyeleri olduğu kanaatine varılır. Farklı bakteri türlerinden DNA (çok yakın ilişkili değilse) homoloji göstermez. 16S rRNA analizi DNA-DNA hibridizasyon verilerini tamamlayıcı niteliktedir.
(http://pathmicro.med.sc.edu/fox/culture.htm)

İki mikroorganizma türü arasındaki evrim mesafesi her iki türde bulunan homolog makromoleküllerdeki nükleotid veya amino asit sekansı ile ölçülmektedir. Ortak atadan gelen moleküllerdeki farklılık (sekans farkı) atanın DNA'sındaki sabitleşen mutasyonların sayısı ile orantılıdır. Yani bu molekülleri kodlayan DNA sekansındaki mutasyonlarla. Değişik popülasyonlardaki mutasyonlar sabitleştikçe, kalıcı biyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu olayların takibi ve teşhis amaçlı kullanımı için de doğru moleküllerin sekans tayininin yapılması gerekir. Ölçülen filogenetik mesafe genişledikce; sekansın değişme hızı azalır.

Evrim ilişkilerinin incelenmesinde protein sentezindeki önemlerinden dolayı ribozomal RNA'lar kullanılır. rRNA'lar tarihî (eski = ancient) moleküllerdir; fonksiyonları sabittir, geniş yayılım gösterirler (üniversal), geniş filogenetik mesafeler arasında oldukça iyi korunurlar (sekans bakımından). İki canlı arasındaki evrim ilişkisi rRNA sekansları arasındaki benzerliğe bağlıdır.

Şekil 18.10 s. 704 (rRNA sekanslamasına göre mikoorganizmaların tasnifi)

Prokaryotlarda 3 ribozomal RNA molekülü var: 5*S*, 16*S* ve 23*S*. Bakterilerdeki 16*S* (~ 1600 nükleotid) ve 23*S* (~ 3000 nükleotid) rRNA'larda, sekans analizi yapmaya yarayan çok iyi korunmuş sekansta birkaç bölge vardır. rRNA'ların bazı korunmuş sekansları bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde, hayvanlarda ve hatta kloroplast ve mitokondrilerde hiç değişmemiştir. Bu bölgeler ribozomun yüzeyinin haritasını çıkartırlar. Çok iyi korunmuş olmaları, ribozomun fonksiyonunda hayati rolleri olabileceğini düşündürmektedir. 16S rRNA, tRNA'ların antikodon bölgesiyle direkt olarak etkileşir. rRNA'larda meydana

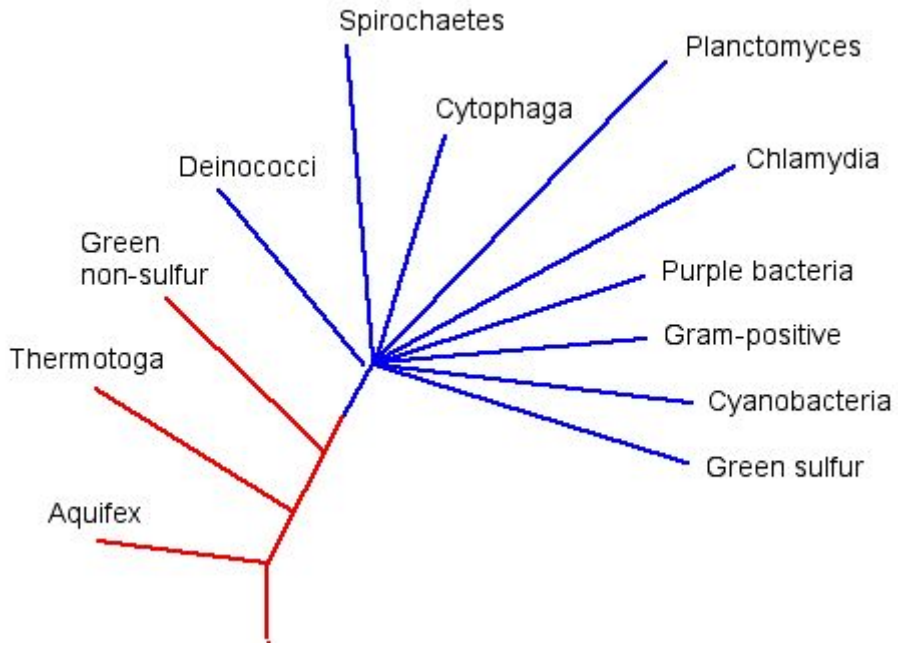
gelen mutasyonlar, protein sentezinin özgüllüğünü etkileyebilir. Molekülün, korunmuş bölgeler dışındaki yerlerinde filogenetik ilişkileri araştırmaya yarayan yeterli sekans farklılıkları mevcuttur. Deneysel olarak 16*S* rRNA daha rahat çalışılabilir. Bilgisayarla yapılan çalışmalarda, 16S rRNA'nın belirli bölgelerinde, belirli grup organizmaya has "imza sekansı" denilen kısa oligonükleotid sekansları tespit edilmiştir. Örnek mikobakterilerde 16S rRNA sekans analizi moleküler yöntemlerle idantifikasyonda kullanılmaktadır: hedef olarak seçilmiş olan en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. 16S rRNA geni, bakterilerin moleküler idantifikasyonunda altın standard olarak kabul edilen hedef bir bölgedir: hem her bakteriye özgü çok iyi korunmuş diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. 16S rRNA geninin dizi analizi tüm mikobakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayabilmektedir. Enterobacteriaceae arasındaki ilişkilerin incelenmesinde *gyr*B genisekansı karşılaştırmalarda kullanılmıştır. 16S rDNA (cDNA kütüphaneleri kullanarak) sekansları ise bu ailedeki daha uzak filogenetik akrabalıkların ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır.

Tablo 18.1 s. 703 (imza sekanslarına örnekler: CACYYG, AAACUUAAAG, CACACACCG)

Ribozomal RNA sekanslaması ile yapılan mikrobiyal filogenide fenotipik ilişkilerle yapılanlardan farklı olarak üç ana grup bulunmuştur: Prokaryotik hatta Bakteriler (daha önce eubacteri'ler deniliyordu) ve Archaea (eskiden archaebakteriler) ve Eukaryotik hatta Eukarya (Şek. 18.10, s. 704).

Bakteria

En az 12 belirgin grup mevcuttur. Her bir grup bir **phylum** olarak değerlendirilebilir. (Ş. 18.11, s706)



(http://www.sp.uconn.edu:80/~terry/229sp03/lectures/taxonomy.html)

1. *Mor fototrofik bakteriler* (enerjisini ışıktan temin eden organizmalara fototrofik denir) ve *akrabaları (Proteobakteria)*. En büyük ve en çeşitli bakteria grubudur. Bu grubun çoğu fototrofiktir. Sadece 2 subdivision'u (delta ve epsilon) nonfototrofiktir (sülfat- ve sülfür- redükleyici bakteriler, helicobacter, miksobakteriler, campylobacter gibi). *Pseudomonas* gibi enterik bakterilerden de bu grupta olanlar vardır.
2. *Yeşil kükürt bakterileri. Chlorobium* gibi fototrofik yeşil kükürt bakterileri.
3. *Kükürt bakterisi olmayan yeşil bakteriler. Chloroflexus*. İki nonfototrofik genera ve bir tarihi bakteri grubu. Çoğu termofildir (yüksek sıcaklıkta yaşayan organizma, optimum sıcaklık 45° - 80° C).
4. *Cyanobacteria.* Bitkilerdeki kloroplastın atası (öncülü) olduğu zannediliyor. Oksijenik fototroflar: klorofil a ve fikobilinleri ihtiva ederler; klorofil b yoktur. Mavi-yeşil reklidirler.
5. *Planctomyces-Pirella.* Tomurcuklanan organizmalar. Sıvı ortamda ürerler. *Planctomyces-Pirella* bakterilerin önemli bir koludur.
6. *Spiroket'ler.* Patojendirler. Serbest veya konakçı ile yaşarlar. *Leptospira* genusu önemlidir.
7. *Bacterioides-Flavobacterium.* Gr (-) bakterilerin en önemli filogenetik hattıdır. *Bakteroides* gibi anaeroblar; *Sporocytophaga* gibi aeroblar.

8. *Chlamydia.* Hücreiçi parazitidirler: *Chlamydia* çeşitli seksüel yolla geçen hastalıkların ve bir tür trahomun (körlük sebebi) meydana gelmesine sebep olan canlıdır.
9. *Deinococcus-Thermus.* Gr (+), radyasyon-direnci yüksek *Deinococcus* ve Gr (-), kemoorganotrofik termofil (organik maddelerin oksidasyonundan enerji sağlayan) *Thermus*. Her ikisi de ornitin ihtiva eden atipik hücre duvarı taşırlar.
10. *Gr (+) Bakteriler.* Çubuk ve cocci. Endospor oluşturanlar, laktik asit bakterileri, çoğu aerobik ve anaerobik cocci, corineform bakteriler, aktinomiçetesler; hatta mycoplasma'ların çoğu.
11. *Thermotoga-Thermosipho.* Sadece gruba adını veren 2 genera var. Ancak jeotermal olarak ısınan deniz sedimentinden izole edilmiş hipertermofilik bakteriler. *Thermotoga* 55^{o} - 90^{o}C'de üreyebilen anaerobik fermentatif organizma. Çok değişik lipidler üretir. İlk organizmaların termofilik oldukları hipotezi bu canlılara dayandırılmaktadır.
12. *Aquifex-Hydrogenobacter.* Aşırı termofilik organizmalar. *Aquifex* H_2 veya redükte kükürt bileşiklerini aerobik olarak oksitler. Optimum sıcaklık 85^{o} - 95^{o}C. *Hydrogenobacter* sadece H_2 'yi oksitler.

Archaea (Archaebakteria)

Çoğu aşırı çevre şartlarında yaşayan canlılar. Dört geniş gruba ayrılırlar: evrimleri belirli şekilde ayrı grup.

1. *Metanojenler. Methanobacterium*. Metan üreten prokaryotlar.
2. *Halofiller.* Üremeleri için tuza (NaCl) ihtiyaç duyan canlılar. *Halobacterium ve akrabaları.*
3. *Hipertermofiller.* Üreme optimaları > 80°C; hatta bazan > 100°C. *Pyrodictium* (optimumu 105°C). Elementer kükürt optimal üremeleri için elzemdir. Genellikle anaerobdurlar.
4. *Thermoplasma*. Sadece *Thermoplasma* genusu vardır.

MİKROORGANİZMALARIN BÜYÜKLÜĞÜ

Mikroorganizmaların büyüklüğünü ölçmede μm kullanılır (mm'nin 1/1000'i). Örnekler:
** Hücre içinde yaşayan *Rickettsia* 0.2-0.5 ilâ 1.5 μm
** Büyük basil olan *Bacillus anthracis* 1.0-1.3 X 3.0-10 μm
** En büyük virüslerden pox virüsü 250-300 nm (0.25-0.3 μm)
** En küçük virüs poliomiyelit (çocuk felci virüsü) 25 nm
** Lemfosit çapı 10 μm

BAKTERİLERİN YAPISI (MORFOLOJİ) Lab.'da detaylı işlenmektedir.

Kok'lar (sferik veya oval); çomak'lar (basil, silindirik); burgu şeklindekiler (spiral şekilli basil) ve spiroket'ler (helezonlu ve uzantılı bakteriler- tüp veya sap olarak).

1. Hücre duvarı: sert yapıdır; sitoplazma membranına destek sağlar, ozmotik lizisden korur
2. Sitoplazmik membran
3. Ribozomlar
4. İnklüzyonlar: C, N, S, P'lu bileşiklerden oluşan depo maddelerini ihtiva eden cisimler
5. Nükleoid: hakiki nükleus yoktur, tek bir DNA molekülü nükleus işini görür. Agrege formdaki bu DNA'ya nükleoid denir ve eukaryotlardaki kromozoma karşılık gelir
6. Flagellum: bazı bakterilerde hareketi sağlayan kirpik

Sitoplazmik membran lipidleri, bakteri ve eukarya'da ester bağlantısı ile birleşir (RCOOR'); archaea'da ise eter bağlantısı ile birleşir (ROR').

Bakteri hücre duvarı.

Bakteri hücresindeki çözünmüş katı maddelerin oluşturduğu turgor basıncı bir araba tekerleğindeki 2 atm basınca yakındır. Bu basınca dayanmak için bakterilerde hücre duvarı vardır; aynı zamanda hücreye sertlik ve şekil verir. Ancak elektron mikroskobu ile görülür.

Bakteriler özel bir boyama tekniğine göre Gr (+) ve Gr (-) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Gram boyası ile boyanma hücre duvarının yapısındaki farktan kaynaklanmaktadır. Her iki tip duvarın görünüşleri de birbirinden farklıdır.

Gr (-) H. duvarı	Gr (+) H. duvarı
DAP hepsinde var. Çok tabakalı kompleks yapı.	DAP bazısında var. Kalın, tek tip moleküllü yapı.

Sert (katı-rigid) tabaka: peptidoglikan = murein sadece bakterilerde vardır. Duvarın kuvvetinden bu tabaka sorumludur. Hatta, çoğu bakterilerde bunun dışında da ek tabakalar vardır. Gr (+) ve Gr (-) bakterilerin katı tabakası kimyasal yapı açısından çok benzerdir, peptidoglikan veya murein adı verilen yapıyı ihtiva eder.
Bu tabakanın kimyasal yapısında: - N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit (şeker türevleri)
- amino asitlerin küçük bir grubu (L-ala, D-ala, D-glutamik asit, lizin veya DAP.

Bu üniteler tekarlanarak glikan tetrapeptid yapı oluşur. Yapıya esas gücü veren, çapraz bağlı amino asitler. Bir tek bakteri hücre duvarı yapısında D- amino asitler bulunur, tabiatta her zaman L- amino asitler vardır.Şekerlerdeki bağlar β- 1,4 bağıdır. Gr (-)'lerde dış membran olarak, LPS tabakası denilen bir lipopolisakkarit tabaka vardır; plazma membranı gibi sadece fosfolipid değildir, polisakkarit ve protein de ihtiva eder. Gr (-)'lerin bu dış membranı genellikle hayvanlara toksiktir. Örnek: *Salmonella, Shigella, Escherichia* generası mensupları. İnsanlara ve diğer memelilere de toksik olan ve patojenite özelliği kazandıran LPS tabakası, toksisite özelliğinden dolayı endotoksin olarak da adlandırılır. Bu tabaka küçük moleküllere oldukça geçirgendir. Sadece Gr (-)'lerin membranında bulunan ve porin'ler adı verilen proteinler, membran kanalı gibi görev yaparak, hidrofilik küçük molekül ağırlıklı (maksimum 5000 MW) moleküllerin geçişine izin verirler.

Teikoik asitler: Gr (+)'lerde LPS dış membran yoktur. Buna rağmen asidik polisakkaritler (teikoik asitler) hücre duvarına bağlı olduğundan hücre yüzeyine negatif yük verirler. İyonların duvardan geçişini düzenlerler.

Hücre duvarı yapısının Gram boyası ile ilişkisi: Gr (+) bakterilerde, Gram boyası yapıldığında, alkolle h. dışına ekstrakte edilmeyen ve çözünmeyen bir hücreiçi kristal viyole-iyot kompleksi oluşur. Bu kompleks Gr (-)'lerde alkolle ekstrakte edilebilir ama Gr (+)'lerden ekstarkte edilemez çünkü alkol dehidrate olarak duvardaki porların kapanmasına sebep olur; kompleks hücre dışına çıkamaz. Yani olay, kimyasal yapı ile ilgili değildir, fiziki yapı ile ilgilidir.

PROKARYOT - EUKARYOT HÜCRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI (Sitoloji ve Genel Biyoloji Notları)