



**BAZI SUCUL BÖCEK TÜRLERİNİN  
BAĞIRSAKLARINDAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU,  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ahmet Muhammet ÇORAPÇI**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ**

**2022**

**Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI SUCUL BÖCEK TÜRLERİNİN BAĞIRSAKLARINDAN  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ahmet Muhammet ÇORAPÇI**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25 / 01 / 2022

Ahmet Muhammet ÇORAPÇI

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### BAZI SUCUL BÖCEK TÜRLERİNİN BAĞIRSAKLARINDAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet Muhammet ÇORAPÇI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Böceklerin bağırsak florası özellikle çevreye adaptasyonlarında önemli rol oynamaktadır. Son zamanlarda bu flora üyeleri, biyoteknoloji için önemli kaynaklar haline gelmiştir. Hydrophilidae ve Dytiscidae familyalarına ait böcekler, su yaşamına oldukça adapte olmaları nedeniyle mikroorganizmalar açısından zengin bir kaynak olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasında yeni antibakteriyel peptit üretici türlerin keşfi için bazı *sucul* böceklerin bağırsaklarından bakterilerin izolasyonu ve antibakteriyel peptit üretici türlerin taranması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Temmuz-Eylül 2020 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmalarında Hydrophilidae'ye ait beş, Dytiscidae'ye ait on farklı tür elde edildi. Bağırsak florasını belirlemek için böceklerin aseptik koşullar altında diseksiyonları gerçekleştirildi ve bağırsak örnekleri homojenize edilerek, TSA ortamına yayıldı. Bakterilerin moleküler karakterizasyonları 16S rDNA bölgesine göre gerçekleştirildi. Hydrophilidae üyelerinden *Aeromonas veronii*, *Bacillus pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Proteus hauseri*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas otitidis*, *Serratia fonticola* ve *S. liquefaciens*; Dytiscidae üyelerinden ise *Acinetobacter radioresistens*, *Aeromonas* sp., *A.allosaccharophila*, *A.veronii*, *B.pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Providencia rettgeri* ve *P.otitidis* türleri elde edildi. Kültür filtratları well difüzyon tekniği ile *Staphylococcus aureus* ve *P.aeruginosa*'ya karşı test edildi. Ön seleksiyon sonucunda kültür filtratlarının hiçbiri *P.aeruginosa*'da zon oluşumuna neden olmazken; 5 adet filtrat *S.aureus*'a karşı zon verdi. Bakteriler aktivitenin doğrulanması için önce Tripsin/Proteinaz K parçalama yöntemi ile tarandı. Bu deneyde seçilen iki bakteriye ait filtratlar aktiviteden sorumlu proteinin bandının belirlenmesi amacıyla Native-Page jelde yürütüldü ve jel kapatma testine alındı. Sonuçta M29 kodlu *P.otitidis*'e ait yaklaşık 12 kDa boyutundaki peptidin antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi.

2022, 77 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Sucul böcek, Bağırsak florası, Antibakteriyel peptit, Bakteri

# ABSTRACT

MS. Thesis

## ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF BACTERIA FROM INTESTINES OF SOME AQUATIC INSECT SPECIES

Ahmet Muhammet ÇORAPÇI

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Serkan ÖRTÜCÜ

The gut flora of beetles plays an important role, especially in their adaptation to the environment. Recently, these flora members have become important resources for biotechnology. Insects belonging to the Hydrophilidae and Dytiscidae families are seen as a rich source of microorganisms because they are highly adapted to aquatic life. This thesis aimed to isolate bacteria from the gut of some aquatic beetles and screen antibacterial peptide-producing species to discover new antibacterial peptide-producing species. For this purpose, five different species belonging to Hydrophilidae and ten different species belonging to Dytiscidae were obtained in field studies conducted between July- September 2020. To determine the intestinal flora, dissections of beetles were performed under aseptic conditions, and gut samples were homogenized and spread on TSA medium. Molecular characterizations of bacteria were performed according to the 16SrDNA region. *Aeromonas veronii*, *Bacillus pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Proteus hauseri*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas otitidis*, *Serratia fonticola* and *S. liquefaciens* from members of Hydrophilidae; *Acinetobacter radioresistens*, *Aeromonas* sp., *A.allosaccharophila*, *A.veronii*, *B.pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Providencia rettgeri* and *P.otitidis* species were obtained from Dytiscidae members. Culture filtrates were tested against *Staphylococcus aureus* and *P.aeruginosa* by well diffusion test. As a result of pre-selection, none of the culture filtrates caused zone formation against *P.aeruginosa*; 5 filtrates gave zones against *S.aureus*. Firstly, bacteria were screened by Trypsin/Proteinase K digestion method to confirm the activity. Secondly, the filtrates of the two selected bacteria were run on Native-Page gel to determine the protein band responsible for the activity, and a gel overlay test was performed. As a result, it was determined that the peptide of *P.otitidis* M29 with approximately 12 kDa showed antibacterial activity.

**2022, 77 pages**

**Keywords:** Aquatic beetle, Gut flora, Antibacterial peptide, Bacteria

## TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum bu tez çalışmasında bana rehberlik eden ve maddi manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye çok teőekkürlerimi sunarım.

Böcek türlerinin tanılarını yaparak bana destek sağlayan Prof. Dr. Ümit İNCEKARA ve Prof. Dr. Mustafa Cemal DARILMAZ hocalarıma ve deney aőamalarımnda bana yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Ayőenur YAZICI hocama teőekkürlerimi sunarım.

Tez süreci boyunca birlikte çok sık vakit geçirdiğim, her zaman ve her konuda bana yardım eden ve yol gösteren hocalarımdan ağabeyim Alp Giray TURGUT'a ve Ayőe ÜSTÜN'e çok teőekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan tüm çalışma arkadaşlarıma yardımlarından ve dostluklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve bu süreçte her zaman arkamda olan ve beni desteleyen babam Yüksel ÇORAPÇI'ya , annem Suzan ÇORAPÇI'ya , kardeőlerime ve tüm aileme en içten teőekkürlerimi sunarım.

Son olarak beni yaratan, yaőatan ve hayattaki tüm baőarıların gerçek sahibi olan rabbim Yüce Allah'a hamd ve sena ederim.

**Ahmet Muhammet ÇORAPÇI**  
**Ocak 2022**

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Böcekler.....	1
1.1.1. Böcek bağırsağının yapısı.....	1
1.1.2. Böcek mikrobiyotası.....	2
1.1.3. Böceklerin yaşam koşullarının mikrobiyota üzerine etkileri.....	3
1.1.4. Mikrobiyotanın böcekler için önemi ve faydaları.....	4
1.2. Mikrobiyotanın Çalışılabilmesi İçin Kullanılan Teknikler.....	10
1.2.1. Kültüre bağımlı yöntemler.....	10
1.2.2. Kültürden bağımsız yöntemler.....	10
1.2.3. Metagenomik stratejiler.....	11
1.3. Mikrobiyal Biyoteknoloji.....	11
1.3.1. Endüstriyel biyoteknoloji.....	12
1.3.2. Çevre biyoteknolojisi.....	14
1.4. Antimikrobiyal Bileşikler ve Böcek Bağırsağıyla Olan İlişkileri.....	15
1.4.1. Bakteriyosinler.....	17
1.4.2. Sideroforlar.....	18
1.4.3. Diğer antimikrobiyal bileşikler.....	18
1.5. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....	19
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	21
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Cihazlar.....	29
3.1.2. Sarf malzeme.....	30

3.1.3. Tripsin/ Proteinaz K parçalama tekniğinde kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.4. Native ve SDS PAGE tekniğinde kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.5. Gümüş boyama solüsyonları .....	32
3.1.6. Diğer solüsyonlar .....	32
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Arazi çalışmaları .....	33
3.2.2. Bakteri izolasyonu.....	33
3.2.3. Moleküler tanılama .....	34
3.2.4. AMP üretici bakterilerin ön seleksiyonu.....	36
3.2.4.1. Well difüzyon testi .....	36
3.2.5. Tripsin/ Proteinaz K parçalama yöntemi.....	36
3.2.6. SDS PAGE .....	37
3.2.7. Native PAGE ve jel kapatma testi .....	37
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
4.1. Arazi Çalışmaları ve Toplanan Böcekler .....	39
4.2. Bakterilerin İzolasyonu .....	40
4.3. Moleküler Tanı .....	42
4.4. Türlerin Analizi.....	47
4.5. Antibakteriyel Aktivite Gösteren İzolatların Ön Seleksiyonu .....	54
4.6. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi .....	57
4.7. SDS-PAGE.....	58
4.8. Native-PAGE ve Jel Kapatma Testi.....	59
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>64</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler      Açıklama

%	Yüzde
° C	Santigrat Derece
dk	Dakika
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
µl	Mikrolitre
V	Volt

### Kısaltmalar

AMP	Antimikrobiyal Peptit
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
DGGE	Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
GRAS	Generally Recognized as Safe
MHA	Müllet Hilton Agar
NGS	Yeni Nesil Sekanslama
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PES	Polieter Sulfon
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
Sp.	Tür
Spp.	Türler
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
YÜTAM	Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Böcek bağırsak yapısı .....	2
Şekil 1.2. Böceklerin yaşayış şekillerinin mikrobiyota üzerindeki etkisi.....	4
Şekil 1.3. Böcek bağırsağında bulunan bakterilerin böcek üzerindeki etkileri.....	5
Şekil 1.4. Omik çalışma yöntemleri.....	11
Şekil 4.1. Yeşildere köyüne ait yaylada sulak alanlardan yapılan örnekleme .....	39
Şekil 4.2. Toplanan sucul böceklerden bazıları .....	40
Şekil 4.3. Diseksiyon işlemine bir örnek .....	41
Şekil 4.4. Cam boncuk kullanılarak yapılan homojenizasyon sonrası mikrosantrifüj tüpleri .....	41
Şekil 4.5. Saf olarak büyütülen koloniler.....	42
Şekil 4.6. Agaroz jelde yürütülen genomik DNA'lar .....	43
Şekil 4.7. PZR sonucu çoğaltılan yaklaşık 1365 baz çifti uzunluğundaki 16S rRNA bölgelerinin jel görüntüsü .....	43
Şekil 4.8. Türlerin Evrimsel İlişkileri .....	45
Şekil 4.9. Ön Seleksiyon Denemelerinde Kültür Filtratları Kullanılarak <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya Karşı Yapılan Well Difüzyon Deneyi.....	55
Şekil 4.10. Ön Seleksiyon Denemelerinde Kültür Filtratları Kullanılarak <i>Staphylococcus aureus</i> 'a Karşı Yapılan Well Difüzyon Deneyi .....	56
Şekil 4.11. Tripsin/ Proteinaz K Uygulaması Sonucu Elde Edilen Zonlar .....	57
Şekil 4.12. Kültür Filtratlarının SDS PAGE Sonucu ve Gümüş Boyama Görüntüleri ..	58
Şekil 4.13. Kültür Filtratlarının Native PAGE Sonucu ve Gümüş Boyama Görüntüleri	59
Şekil 4.14. Kültür Filtratlarının Native PAGE Görüntüsü ve Jel Kapatma Test Sonucu	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Endüstride Kullanılan Bazı Mikrobiyal Enzimler .....	13
<b>Çizelge 1.2.</b> Biyoremediasyonda Kullanılan Bazı Mikrobiyal Enzimler .....	15
<b>Çizelge 3.1.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri.....	29
<b>Çizelge 3.2.</b> PZR Reaksiyonunda Kullanılan Maddeler ve Miktarları .....	34
<b>Çizelge 3.3.</b> PZR Reaksiyon Koşulları .....	35
<b>Çizelge 3.4.</b> %15'lik Native-PAGE Jeli .....	38
<b>Çizelge 4.1.</b> Tanımlanan Bakteri Türlerinin Böcek Türlerine Göre Dağılımı.....	46



### 1.GİRİŞ

#### 1.1. Böcekler

Böcekler hexapoda alt şubesinde, insecta sınıfının üyeleridir ve en karakteristik özellikleri altı bacağına sahip olmalarıdır. Canlı çeşitliliği bakımından ökaryotlar aleminin en kalabalık sınıfıdır (Aktümsek et al. 2009). Bilinen 950.000 türü ile ökaryotlar üst aleminin tür çeşitliliği bakımından yaklaşık olarak yarısını oluşturur (Chapman 2005).

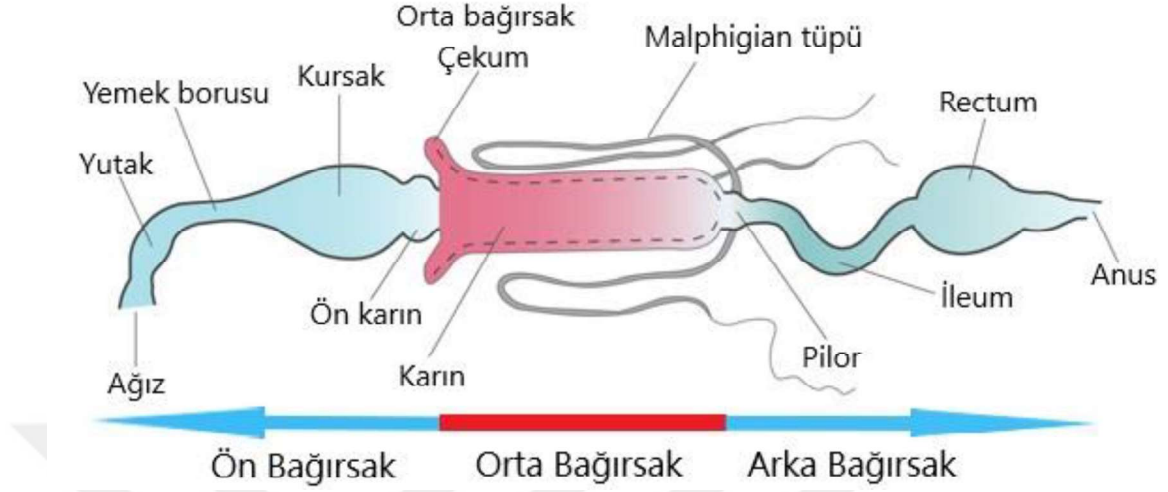
Çoğu böcek türleri doğduktan belli bir süre sonra başkalaşım geçirerek belirli fizyolojik değişimlere uğrarlar. Bu başkalaşım iki şekilde gerçekleşir. İlki yarı metamorfoz şeklinde isimlendirilir. Yarı metamorfoz geçiren böcekler deri değiştirerek ergin hale dönüşürler. Canlı yumurtadan çıktığında ergine kısmen benzerlik gösterir. İkincisi ise tam metamorfoz olarak isimlendirilir. Bu gelişim türünde ise yumurtadan çıkan canlı larva olarak isimlendirilir. Belirli bir büyüklüğe ulaştığında pulpa aşamasına geçer. Bu aşamada genelde hareketsiz haldedir ve bir koza içerisinde kapalıdır. Ardından önemli derecede şekil değiştirir ve ergin birey ortaya çıkar (Gullan and Cranston 2005).

##### 1.1.1. Böcek bağırsağının yapısı

Böceklerde farklı modifikasyonlar olsa da sindirim sisteminin temel yapısı benzerdir. Bağırsak üç ana bölgeden oluşur: ön bağırsak, orta bağırsak ve arka bağırsak (Şekil 1.1). Ön ve arka bağırsak kitin ve kütiküler glikoproteinlerden oluşan dış iskelet ile kaplıdır. Bu dış iskelet bağırsak lümenini epidermal hücrelerden ayırır. Ön bağırsakta genelde gıda deposu olarak kullanılmak için keseler bulunur. Orta bağırsak birçok böcekte sindirim ve emilim bölgesidir. Çoğu böceğin orta bağırsağında peritrofik matriks bulunur. Bu yapı epitel hücreleri tarafından sürekli olarak yenilenir. Peritrofik matriks, epitelyumu mekanik aşınmadan, gıdadaki toksin moleküllerden ve mikrobiyal istiladan koruyan bir bariyer sağlar. Ayrıca mikroorganizmaların epitel dokuyla doğrudan temasını engeller. Gıda ve sindirim enzimlerini konsantre eder. Arka bağırsakta ise malpighian tüpleri ve dışkıyı tutmak için rektum bulunur. Malpighi tüpleri ürik asit gibi atıkları emen bir uzantıdır. Burada biriken azotlu atıklar ve yiyecek atıkları bakteriler için bağırsağın diğer kısımlarından farklı bir beslenme ortamı oluştururlar. Besin emilimi genellikle orta

## 1. GİRİŞ

bağırsakta, su emilimi ise arka bağırsakta gerçekleşir. Ama bazen arka bağırsaktan besin emilimi olduğu da bilinmektedir (Engle and Moran 2013).



Şekil 1.1. Böcek bağırsağının yapısı

### 1.1.2. Böcek mikrobiyotası

Simbiyotik ilişkilerin çoğu çok hücreli bir ökaryotik organizma ile ortak bir yaşam süren bakteriler, virüsler, ökaryotik mikroorganizmalar veya arkelerin dahil olduğu bir veya daha fazla mikroorganizmanın birbirleriyle etkileşmesinden ortaya çıkar. Genellikle çok hücreli organizmaya "konakçı", mikroorganizmalara ise "simbiyont" denir (Oliver and Russell 2016). Bu şekilde böcek ve mikroorganizmalar arasında pozitif bir etkileşim tespit edildiğinde, kommensalizm veya mutualizm olarak isimlendirilir. Komensalizm, mikroorganizmanın zarar vermeden konakçıdan yararlandığı ancak karşılığında hiçbir avantaj sağlamadığı durumlarda ortaya çıkar. Mutualizm ise mikroorganizma ve konakçının karşılıklı olarak birbirlerine fayda sağladığı bir birlikteliktir (Singh et al. 2020).

Simbiyotik bir ilişki tanımlanırken ilişkinin zaman aralığı ve ortam koşullarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesinden sonra tanımlanmalıdır (Klepzig et al. 2001). Örneğin bir çekirgenin bağırsağındaki bakterilerle ilişkisinde, görünürde kommensalist olan bakteriler aslında çekirgenin bağırsağının patojenler tarafından istila edilmesini engeller (Dillon and Charnley 2002b). Bu nedenle çekirgenin patojenlerle mücadelesi süresince bu bakteriler mutualist olarak değerlendirilebilir. Doğru çevresel koşulların

## 1. GİRİŞ

---

oluştugu bazı durumlarda mutualist bakteriler fırsatçı patojenlere dönüşebilir. *Photorhabdus luminescens* bakterisi bir nematodun bağırsağında veya bir böceğin dolaşım sisteminde yaşamasına göre mutualist ya da patojen olabilir (Ffrench-Constant et al. 2003).

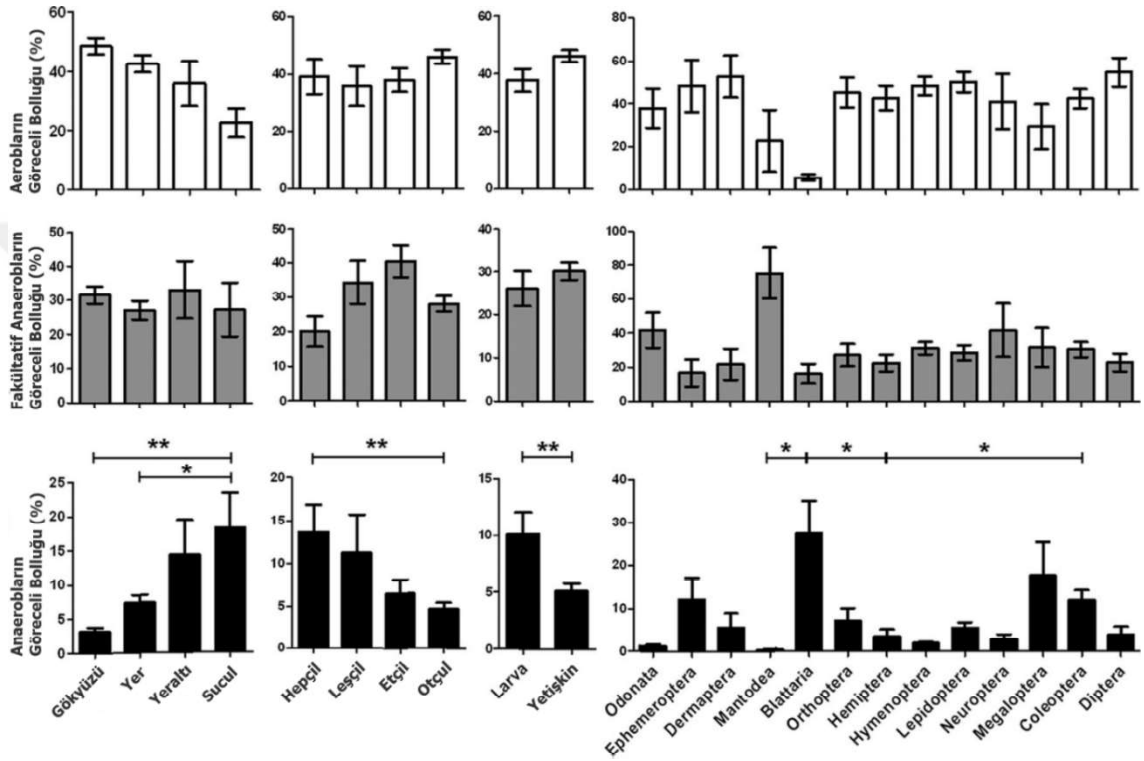
Bir mikrobiyal türün, insanların ve evcilleştirilmiş memelilerin bağırsak mikrobiyotasında kalıcı olarak var olduğunun kabul edilmesi için çeşitli kriterler geliştirilmiştir (Berg 1996). Bu kriterler, mikroorganizmaların her zaman sağlıklı yetişkinlerde bulunmasını, bağırsak üzerinde belirli alanları kolonize etmesini, genç hayvanlarda kolonize ettikleri habitatlarda kalabilmesini, yetişkinlerde popülasyonun ulaşabileceği doruk noktasında sayılarını stabil olarak sürdürmesini ve kolonize edilen bölgenin epiteliyle yakın ilişkili olmayı içerir. Oldukça karmaşık bir mikrobiyotanın olduğu ve bakterilerin nesiller arasında aktarıldığı böceklerde, kalıcı mikrobiyota için tanımlanan kriterlerin birçoğu görülür. Kalıcı bir biyota türün tüm bireylerinde bulunur ve istikrarlı bir şekilde popülasyonlarını korur. Birkaç istisna dışında çoğu böcek türünün mikrobiyal kolonizasyonu çalışılmamıştır ve kalıcı bir topluluğa sahip olup olmadıkları bilinmemektedir. Birçok organizma mikrobiyotasını, çevresindeki ortamdan elde ettiği varsayılmaktadır. Ancak alınan mikroorganizmaların konakçıdaki kalıcılık durumu bilinmemektedir. Bu mikroorganizmaların bağırsakta belirli nişleri işgal edip etmediği ve bağırsak epitelinde kolonize olup olmadığı veya aynı böcek türünün tüm üyelerinde bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Böceklerin aldığı mikroorganizmalardaki en önemli ayırım, türün bağırsak habitatını kolonize edip edemeyeceğidir. Geçici mikroplar anormal durumlar dışında bağırsağı kolonize edemezler. Kolonileşebilen bakteriler ise bağırsaktaki belirli bir nişte bulunur ve bağırsaktan atılma hızlarına eşit veya daha yüksek bir oranda çoğalır (Singh et al. 2020).

### 1.1.3. Böceklerin yaşam koşullarının mikrobiyota üzerindeki etkileri

Böcek bağırsağı mikrobiyotasındaki çeşitlilik bağırsak morfolojisi, pH ve oksijen durumu gibi fizikokimyasal koşulların değişimiyle farklılıklar gösterebilir. Bu yüzden böcek bağırsağı mikrobiyomu genellikle böceğin yaşamına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Metamorfozla değişen böceğin yaşam koşulları, bağırsak mikrobiyotasında da değişen mikrobiyal çeşitliliğe sebep olur. Aynı zamanda bağırsaktaki bakteri çeşitliliği

## 1. GİRİŞ

böceğin yaşadığı habitat ile ilişkilidir. Bu ilişki çoğunlukla oksijen üzerinden yürümektedir. Buna ek olarak beslenme, bağırsak çeşitliğini etkileyen faktörlerden bir tanesidir. Farklı yeme alışkanlıklarına sahip böceklerin bağırsak çeşitliliği de farklılık göstermektedir. Sonuç olarak böcek bağırsağındaki mikrobiyal çeşitlilik konakçının yaşadığı habitatından, beslenmesinden ve gelişiminden etkilenir (Şekil 1.2) (Yun et al. 2014).



Şekil 1.2. Böceklerin yaşayış şekillerinin mikrobiyota üzerindeki etkisi (Yun et al. 2014)

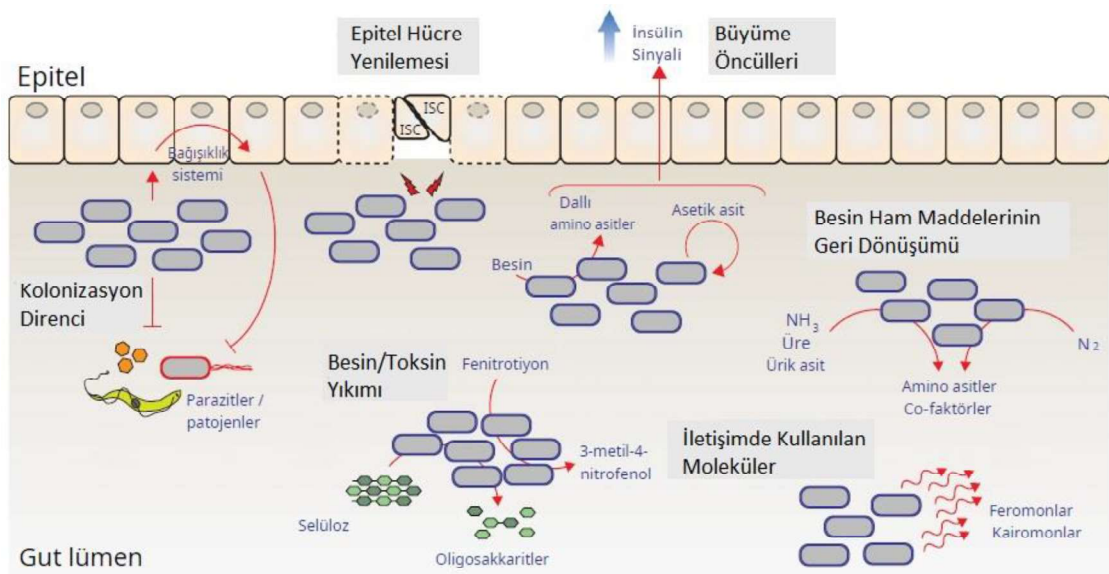
### 1.1.4. Mikrobiyotanın böcekler için önemi ve faydaları

Böcekler hem kendi içlerinde yüksek miktarda çeşitlilik barındıran, hem de çok çeşitli habitatlarda hayatta kalabilen hayvanlardır (Basset et al. 2012). Bu hayvanların bağırsak mikrobiyotası yaşamları için çok önemlidir. Böceklerin bağırsağında bulunan mikroorganizmalar besin açısından fakir gıdaları dönüştürerek konakçının faydalanabileceği besinleri üretir, katabolizması zor gıda bileşenlerinin sindirilmesine yardımcı olur, konakçıyı parazitlerden ve patojenlerden korur, böceğin diğer böceklerle iletişim kurmasında katkıda bulunur, çiftleşme ve üreme sistemlerini yönetir (Engle and Moran 2013). Mikroorganizmalar konakçı için birçok önemli rol oynamasına rağmen

## 1. GİRİŞ

bunların çoğu kommensal ve parazit yapıdadır. Az bir kısmı konakçıya fayda sağlayarak mutualist bir ilişki gösterir (Muthukalingan et al. 2014).

Mikroorganizmaların böcek bağırsağında bilinen işlevlerine birkaç örnek şu şekilde verilebilir. *Bombus terrestris*, *Schistocerca gregaria* ve çeşitli sivrisinek türlerinde patojenlere veya parazitlere karşı kolonizasyon direnci gösterdiği tanımlanmıştır. *Drosophila melanogaster*'de kommensal bağırsak mikrobiyotasının bağırsak hücre yenilenmesinde ve sistemik büyümenin desteklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Besin parçalanmasına en iyi örneklerden biri, termitlerin arka bağırsağındaki özel bağırsak mikrobiyotası tarafından selülozun parçalanmasıdır. Bağırsak bakterilerinin besinle alınan toksinleri bozduğu gösterilmiştir. Bir pestisit olan fenitrothionun, *Riptortus pedestris* böceklerinin bağırsaklarında yaşayan *Burkholderia* bakterileri tarafından 3-metil-4 nitrofenole hidrolize edildiği gösterilmiştir. Vitamin ve esansiyel amino asitlerin sentezi veya nitrojenin alınması gibi beslenme için gerekli ham maddelerin sağlandığı, birçok böcek türünün bağırsağında yaşayan bakteriler tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Termitlerin bağırsaklarında yaşayan bakterilerin bağırsaktaki atıkları değerli besinlere geri dönüştürdüğü gösterilmiş, bu gibi işlevler karıncalar ve hamamböceklerinde de belirlenmiştir. Yine bazı böceklerde bağırsak bakterilerinin feromonlar ve kairomonlar gibi tür içi veya türler arası iletişimde kullanılan molekülleri ürettikleri gösterilmiştir (Şekil 1.3) (Engle and Moran 2013).



**Şekil 1.3.** Böcek bağırsağında bulunan bakterilerin böcek üzerindeki etkileri (Engle and Moran 2013).

### ▪ Selüloz sindirimi

Özellikle odunsu bitkilerle beslenen böcekler, selüloz bozunmasında rol oynayan bağırsak mikrobiyal topluluklarını barındırabilir (Anand et al. 2010). Selüloz zengin bir karbon kaynağıdır. Ancak bitki hücre duvarlarında amorf şekilde bulunduğundan böcekler selüloza kolayca ulaşamaz (Watanabe and Tokuda 2010). Öncelikle selüloz liflerinin bağırsakta daha basit şeker kalıntılarına parçalanması gerekir, bu süreç bakterilerin tipik olarak dahil olduğu bir süreçtir (Warnecke et al. 2007). Örneğin, dut yapraklarıyla beslenen *Bombyx mori*, esas olarak pektin, ksilan, selüloz ve nişasta gibi karbonhidratları parçalamak için bağırsak bakterilerinin ürettiği sindirim enzimlerine ihtiyaç duyar (Anand et al. 2010). Normal şartlar altında bu bağırsak bakterileri sinerjik bir şekilde sindirim enzimleri sağlar ve larva büyümesine katkıda bulunur. Anaerobik kesikli reaktörlerde yapılan çalışmalar *Ergates faber*, *Potosia cuprea*, *Gromphadorrhina portentosa*, *Locusta migratoria* ve *Gryllus bimaculatus* böceklerinin bağırsak mikrobiyotalarının lignoselülozu parçalanma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir

### • Azot fiksasyonu ve geri dönüşümü

Yapılan çalışmalarda böceklerin azot fiksasyonu için bakterilerle kurdukları simbiyotik ilişkinin hayati bir metabolik süreç olduğu bildirilmiştir (Wang et al. 2020). Çünkü bakterilerin atmosferdeki serbest azotu fikse edebilme yeteneği bulunur ve böcekler bu azotu sadece bakterilerle kurdukları simbiyotik ilişki ile alabilirler (Muthukalingan et al. 2014). Bununla birlikte böceklerin azotlu atıkları bağırsak mikrobiyotası tarafından kullanılır ve yüksek değerli besinlere dönüştürülebilir (Thongon et al. 2012). Örneğin, termitlerin, bağırsağındaki simbiyotik etkileşimlerle havadaki azotu alabildiği gösterilmiştir (Benemann 1973).

### ▪ Protein ve şeker metabolizması

Bağırsak mikrobiyomunda yaşayan bakterilerin protein alımı ve katabolizması için kullandıkları mekanizmalar hem bağırsak mikrobiyotasına hem de konakçı böceklere fayda sağlayan önemli bir metabolik süreçtir. Bağırsak mikrobiyotasında yaşayan *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. gibi birçok mikrobiyal tür

## 1. GİRİŞ

---

proteinlerin katabolizmasında yer alan proteazları içerir. (Wang et al. 2020) İyi bir şekilde karakterize edilmiş olan laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemlerinde proteinazlar, peptit taşıyıcıları ve peptidazlar birlikte çalışır. Genel olarak, laktik asit bakterileri protein hidrolizine, proteini oligopeptitlere parçalayan bir proteaz ile başlar. Bu oligopeptitler daha sonra hücreler tarafından spesifik peptit taşıyıcılar kullanılarak hücre içerisine alınır. Son olarak hücre içi peptidazlar tarafından daha kısa peptitlere ve amino asitlere indirgenir (Kunji et al. 1998). Şeker fermantasyonu bağırsak mikrobiyotası tarafından katalize edilen önemli bir diğer metabolik süreçtir. Laktik asit bakterilerinin ksiloz, selobiyoz, glikoz ve früktoz gibi şekerleri tanıma yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Carr et al. 2002).

### ▪ Amino asit üretimi

Simbiyotik bağırsak mikroorganizmaları protein hidrolizi ve şeker fermantasyonu yoluyla konakçı böcekler için esansiyel amino asitler sağlayabilir. Yapılan bir çalışmada, yaprak bitinin besinlerinde eksik olan amino asitlerin *Buchnera* bakterisi tarafından yaprak bitine sağlandığı gösterilmiştir (Birkle et al. 2002). Buna ek olarak *Anoplophora glabripennis* böceğinin bağırsağında yapılan transkriptomik çalışmalarda, bakteri ve mantarların bazı esansiyel amino asitlerin biyosentetik yollarına sahip olduğu gösterilmiştir (Scully et al. 2014). Esansiyel amino asitlerin sentezindeki asıl mekanizma azotun  $\text{NH}_4^+$  formunda geri dönüşümü ve fiksasyonudur. Daha sonra bu azot amino asitlerin üretilmesi için kullanılır. Odun zayıf bir nitrojen kaynağı olduğundan, odunla beslenen böcekler için bu çok önemlidir. Çünkü onlar esansiyel amino asitleri kendileri sentezleyemezler (Ayayee et al. 2016).

### ▪ Lipit metabolizması

Bağırsak mikroorganizmaları tarafından üretilen lipitler, konakçı böcekler için bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Böceklerin arka bağırsağındaki polisakkaritlerin mikrobiyal kullanımından sonra mikroorganizmalar tarafından büyük miktarlarda kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretilir. Yerleşik bağırsak bakterileri tarafından üretilen ana metabolitler asetat, propiyonat ve bütirat içeren SCFA'lardır (Zheng et al. 2017). SCFA'ların dışında, polyhydroxyalkanoatlar (PHA) da böceklerde

bağırsak mikropları tarafından üretilen önemli bir lipit kaynağıdır. Un kurdundaki bağırsak mikropları PHA'ları karbon ve enerji depolamak için kullanırlar ( Ong et al. 2018).

### ▪ Vitamin üretimi

Bağırsakta yaşayan mikroorganizmalar vitaminler gibi yararlı metabolitleri üreterek konakçılara iletebilirler. Bağırsak mikrobiyotası konukçu tarafından üretilmiş amonyağı olarak içerisindeki azotu düzenler ve böcek gelişimi için önemli bir rol oynayan vitaminlerin sentezinde kullanır. B vitaminleri suda çözünme özelliğinden dolayı başlıca üretilen vitaminlerdir (Salem et al. 2015). Simbiyont bir ilişki içerisinde olmayan böceklerin B vitamini eksikliği göz önüne alındığında, B vitamininin üretimi için böceklerin bakteriler ile simbiyotik ilişki içerisinde olması gerekliliği hayati önem arz etmektedir. *Glossina brevipalpis*'in bağırsağında simbiyont olarak yaşayan *Wigglesworthia glossinidia* bakterisinin pantothenate (vitamin B5), biotin (vitamin B7), tiamin (vitamin B1), riboflavin, FAD (vitamin B2), pyridoxine (vitamin B6), nicotinamide (vitamin B3) ve folate (vitamin B9) gibi birçok vitamini konakçının metabolizmasına kazandırdığı gösterilmiştir (Douglas 2009).

### ▪ Patojen direnci

Bağırsağın mikrobiyal topluluklar tarafından kolonize edilmesi konağın parazit istilasına karşı direncini artırabilir. Bununla alakalı birkaç çalışma, böceklerde farklı bağırsak mikroorganizmaları arasındaki antagonistik etkileşimlerin varlığını bildirmektedir. Bunlar, konakçı patojenlere karşı koruyucu işlevleri içerir. Örneğin, *Bombus terrestris* arılarının bağırsak mikrobiyomu bu arıları *Crithidia bombi* patojenine karşı korur. Bu çalışmada yaban arısı pupaları onlara direnç sağlayan mikrobiyal komünitelerinin dışında yetiştirilmiştir. Ortaya çıkan yetişkinler iki gruba ayrılmıştır. İlk gruba beslenme sırasında normal bireylerin dışkısı verilirken ikinci gruba sadece steril şekerli su verilmiştir. Ardından arılar yüksek dozda *Crithidia bombi* patojenine maruz bırakılmıştır. Yapılan parazit miktarı ve mikrobiyom çeşitliliği analizlerinden sonra ilk grubun normal bireylerdeki gibi bir bağırsak mikrobiyomuna sahip olduğu ve ikinci gruba

göre çok daha düşük sayıda *Crithidia bombi* bulundurduğu tespit edilmiştir (Koch and Schmid-Hempel 2011).

Bir başka çalışmada çöl çekirgesi *Schistocerca gregaria* ile yapılan deneylerde, bağırsak topluluğunun çeşitliliği ile bir patojen olan *Serratia marcescens*'in kolonizasyon başarısı arasında ters bir ilişki gözlemlenmiştir. Bu sonuç, tür açısından zengin bağırsak topluluklarına sahip böceklerin patojen istilasına karşı daha dirençli olduğu teorisini desteklemektedir (Dillon et al. 2005).

### ▪ Feromon ve sinyal molekülleri

Bazı durumlarda bağırsak mikroorganizmalarının gerçekleştirdiği biyosentez veya katabolizma olayları sonucunda konakçıda feromon veya kairomon olarak işlev gören bileşikler meydana gelir. Bunun güzel bir örneğinde, çöl çekirgesi *Schistocerca gregaria*'nın bağırsağında bulunan *Pantoea agglomerans* ve diğer yaygın bakterilerinin agregasyon feromonunun bileşenlerini ürettiği gösterilmiştir (Dillon et al. 2002a). Diğer bir örnek ise, *D. melanogaster*'de bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği çiftleşme için çekiciliği belirleyen bir durumdur. Sinekler çiftleşme tercihini benzer mikrobiyotayı barındıran bireylerden yana kullanır. Yapılan çalışmada normal sineklerin bağırsaklarından izole edilen *Lactobacillus plantarum* bakterisi steril koşullarda yetiştirilmiş sineklere enjekte edildiğinde sineklerin çiftleşme tercihlerinde değişiklikler olduğu görülmüştür. Sineklerin bağırsak mikrobiyomu *L. plantarum*'un bağırsakta baskın tür olmasına sebep olan, yüksek nişasta içeren besinlerle beslenerek yönetilebilir. Beslenmenin böceklerin çiftleşme tercihi üzerindeki bu etkisinden dolayı soyların farklılaşacağı ve türleşmenin artıracığı düşünülebilir (Sharon et al. 2011). Kimyasal iletişim için ihtiyaç duyulan sinyal bileşiklerinin miktarı düşük olduğu için üretilecek düşük hacimli bileşikler bile önemli etkilere yol açabilir. Bunun bir örneği yaprak bitinin çıkardığı ve kairomonları içeren sıvı dışkıdır. Bu kairomonlar yaprak biti avcılarını kendilerine çekerler. Her yaprak bitinde yaklaşık olarak birkaç bin *Staphylococcus sciuri* yaşar. Miktarı az olmasına karşın dişi sineklerin larvalarını kendine çeken bu bileşiklerin kaynağı *Staphylococcus sciuri*'dir. Oluşan larvalar daha fazla yaprak biti ile beslendiğinden dolayı bu bakteriyel aktivite konakçı için zararlı bir sonuç doğurur (Leroy et al. 2011).

### 1.2. Mikrobiyotanın Çalışılabilmesi İçin Kullanılan Teknikler

#### 1.2.1. Kültüre bağımlı yöntemler

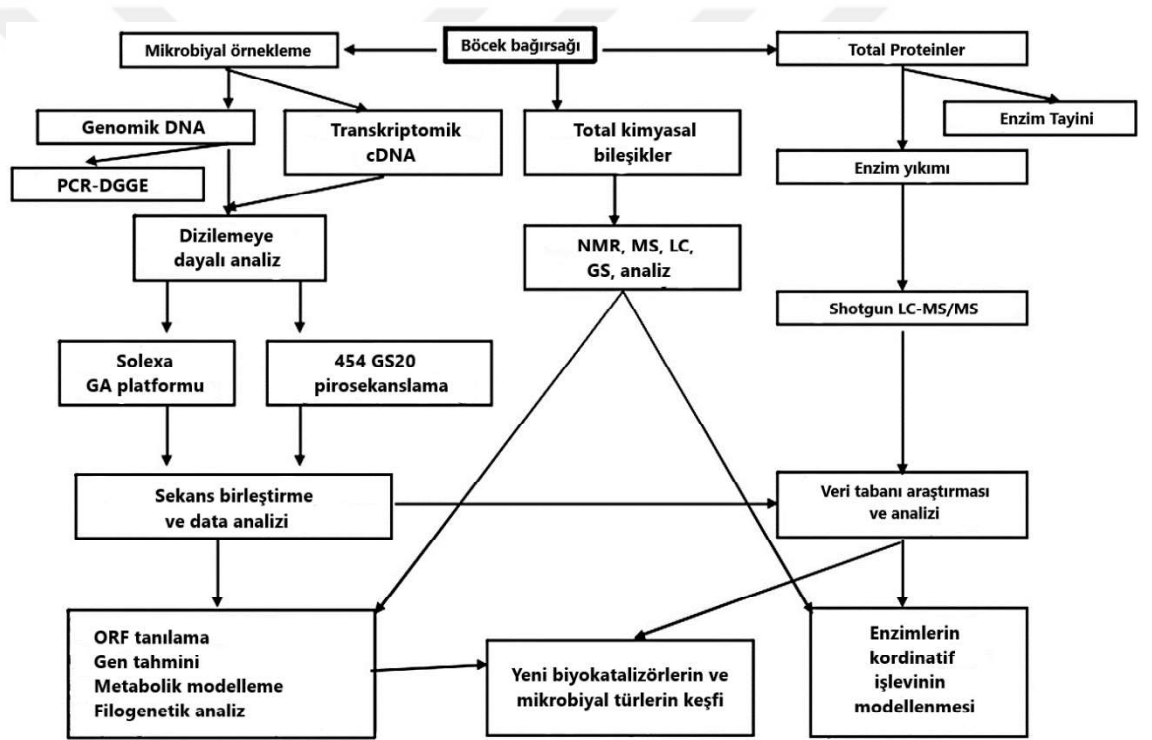
Kültüre bağımlı yöntemler bağırsak bileşimini oluşturan mikroorganizmaları ayrı ayrı izole edebilmemizi ve derinlemesine inceleme yapabilmemizi sağlar. Bu durum her parçanın ayrı ayrı konakçıyla olan ilişkisini ve işlevini anlamamıza yardımcı olur. Kültür bağımlı çalışmalar mikroorganizmaların geleneksel yöntemlerle çalışılmasını kapsar. Geleneksel yöntemlerde ilk olarak bağırsaktaki mikroorganizmalar kültüre alınır. Sonra mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri incelenerek karakterizasyon gerçekleştirilir. Bakterilerin somut olarak kültürlenmesi saf bakteri kültürlerinin var olması, bakterilerin belirli işlevler için test edilebilmesi ve spesifik patojenlerin tespiti gibi birçok açıdan avantaj sağlar. Buna ek olarak kültür koşullarının amaca göre değiştirilmesi çalışmalarda farklı yaklaşımları ortaya çıkarır (Wang et al. 2020).

#### 1.2.2. Kültürden bağımsız yöntemler

Son 20 yıldaki moleküler gelişmeler mikroorganizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda bizi önemli derecede ilerletmiştir. Yeni teknolojilerle mikroorganizmaların kültüre alınmadan çalışılabilmesi mümkün kılınmış ve mikrobiyal çeşitliliğe olan bakışımızda büyük değişikliklere yol açmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda çevredeki mikroorganizmaların %99'unun kültüre edilemediği görüşü ortaya çıkmıştır. Nükleik asitlere dayalı yapılan bu çalışmalar bize yeni bilgiler sağlamış olsa da eksik yönleri bulunmaktadır. Örneğin; nükleik asitlerin izolasyonu farklı bakteriler için değişiklik gösterebilir. Fakat alınan örnekteki tüm bakterilerin nükleik asit izolasyonu tek bir izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilir. Kültür bağımsız yöntemlerde böcek mikrobiyomu, özellikle 16S rRNA genlerinin kullanılmasıyla tanımlanır. Mikrobiyomun tanınmasında PCR tabanlı yöntemler kullanıldığı gibi denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) de kullanılır. Buna ek olarak floresan in situ hibridizasyon (FISH) türe özgü problemlerin kullanımıyla mikrobiyotanın karakterizasyonuna farklı yaklaşımlar getirir (Singh et al. 2020).

## 1.2.3. Metagenomik stratejiler

Metagenomik çalışmalar için iki temel yaklaşım vardır. Bunlar sekansa dayalı ve fonksiyonel metagenomik yaklaşımlardır. Sekansa dayalı metagenomik, dizileme ve veri analizini içerir. Sekanslamada yeni nesil dizileme (NGS) platformları kullanılır. Bu yaklaşım son yıllarda genel olarak tercih edilmektedir. Fonksiyonel metagenomik, genlerin keşfedilmesini DNA ve cDNA kütüphanelerinin taranmasıyla gerçekleştirir. Bunların haricinde yeni türlerin belirlenmesinde hem direkt hem de dolaylı olarak farklı -omik yaklaşımlar işlevsel olmaktadır. Genel olarak -omik yaklaşımların çalışma şeması Şekil 1.4'te gösterilmektedir (Govindarajulu et al. 2020).



Şekil 1.4. Omik çalışma yöntemleri (Govindarajulu et al. 2020)

## 1.3. Mikrobiyal Biyoteknoloji

Biyoteknoloji insanların canlıları veya onların ürünlerini kendi ihtiyaçları doğrultusunda kullanmasıdır. Biyoteknolojide kullanılan temel araçlardan biri de mikroorganizmalardır. Dünyadaki canlıların yüzde 50'den fazlasını mikroorganizmaların oluşturduğu tahmin edilmektedir. Onları göremesek de yaşadığımız her an ve yaşamamız için gerekli olan birçok günlük aktivitede mikroorganizmalar ile etkileşim içerisinde bir

hayat süreriz. Yine mikroorganizmalar insanların yaşayamayacağı birçok ortamda yaşayabilme, yapamayacağı birçok farklı işi yapabilme yeteneklerine sahiptir. Bu durum onları insanların kullanabileceği, potansiyeli çok yüksek bir maden haline getirir (Thieman and Palladino 2013).

### 1.3.1. Endüstriyel biyoteknoloji

Bakteriler, aktinomisetler ve mantarlar gibi birçok mikroorganizma hücre içine ve/veya dışına, çok çeşitli yapılara ve ticari uygulamalara sahip enzimler salgılar (Çizelge 1.1). Amilazlar, proteazlar, pektinazlar, lipazlar, ksilanazlar, selülazlar ve lakkazlar gibi birçok mikrobiyal enzim hücre dışı olarak üretilir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger*'den elde edilen katalaz gibi bazı enzimler ise hücre içinde bulunurlar (Venkateshwaran et al. 1999; Fiedurek and Gromada 2000). Endüstriyel enzimlerin üretiminin %50'sini mantarlar, %35'ini bakteriler ve %15'ini bitkiler gerçekleştirir (Sanchez and Demain 2011). Hayvanlar ve bitkilerden sentezlenen enzimlere göre mikrobiyal enzimlerin çeşitli avantajları vardır. Bunlardan birincisi, mikrobiyal enzimler, bitki ve hayvan enzimlerinden daha aktif ve kararlıdır. Fermantasyon süreçlerinin geliştirilmesi sayesinde seçilmiş suşlar büyük ölçekte saflaştırılmış ve iyi karakterize edilmiş enzimler üretebilmektedir. İkincisi ise, mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler yüksek verime sahiptir. Biyokimyasal ve gen manipülasyonlarına da açık oldukları için ürünün modifikasyonu ve optimizasyonu kolaydır. Enzimlerin üretimini geliştirmek ve özelliklerini değiştirmek için mikroorganizmalara genetik mühendisliği teknikleri uygulanır. (Gupta et al. 2004) Üçüncüsü, mikroorganizmalar metagenom taraması, genom madenciliği ve ekstremofil çeşitliliğinin araştırılması gibi konular üzerinden birçok mikrobiyal enzimin keşfi için zengin bir kaynağı temsil eder (Adrio and Demain 2014).

Endüstriyel enzim üretimi için mikroorganizmaları seçerken belirli özellikler aranır. Birincisi, mikroorganizma istenilen ürünü üretebilme yeteneğine sahip olmalıdır. İkincisi, ürünü yüksek verimde üretebilmelidir. Üçüncüsü hızlı bir şekilde çoğalabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Son olarak da patojen bir mikroorganizma olmamalıdır. (Martinko 2010). Halihazırda bilinen 4000 çeşit mikrobiyal enzimden yaklaşık olarak 200

## 1. GİRİŞ

tanesi ticari olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında yaklaşık sadece 20 enzim endüstriyel ölçekte üretilir (Li et al. 2012).

**Çizelge 1.1.** Endüstride kullanılan bazı mikrobiyal enzimler (Liu and Kokare 2016)

Endüstri	Enzimin adı	Uygulama
Yiyecek, süt ürünleri ve içecek	Proteaz, lipaz, laktaz, pektinaz, amilaz, lakkaz, amiloglukozidaz, fosfolipaz	Nişasta ve proteinlerin şekere yıkımı. Düşük kalorili bira üretimi. Meyve suyu işleme. Peynir üretimi. Laktozdan glikoz üretimi. Hamur şekillendirme.
Deterjan	Amilaz, selülaz, lipaz, proteaz, mannanaz	Boyama sonrası proteini uzaklaştırmak. Temizlik maddeleri. Nişasta, katı ve sıvı yağları uzaklaştırmak. Deterjanların etkinliğini arttırmak.
Tekstil	Amilaz, selülaz, pektinaz, katalaz, proteaz, peroksidaz, keratinaz	Kotlarda kumaş eskitmesi. Yün işleme. Ham ipeğin zamkının giderilmesi, parlatma. Pamuk yumuşatma.
Hayvan yemi	Fitaz, ksilanaz	Fosfor içeriğinin artırılması. Sindirimin kolaylaştırılması.
Etanol üretimi	Selülaz, ligninaz, mannanaz	Etanol yapımı.
Kağıt ve kağıt hamuru	Amilaz, lipaz, proteaz, selülaz, hemiselülaz, esteraz, ligninaz, ksilanaz	Nişastayı daha düşük viskoziteye indirmek. Selülaz ve hemiselülazdan düzgün lifler oluşturur. Ligninaz kağıdı yumuşatmak için lignini uzaklaştırır.
Deri	Proteaz, lipaz	Tüy dökümü. Yıkama.
İlaç	Penisilin açilaz, peroksidaz	Yarı sentetik antibiyotiklerin sentezi. Antimikrobikaller.
Moleküler biyoloji	DNA ligaz, kesim enzimleri, polimeraz	Genetik mühendisliğinde DNA'nın manüplasyonu. DNA'nın kesilmesi. DNA'nın çoğaltılması.

### 1.3.2. Çevre biyoteknolojisi

İnsanoğlu yaşadığı ortamdaki üretim faaliyetlerinden dolayı çevresine zararlar verebilmektedir. Bu zararların sonuçları olarak enerji, gıda ve su temini gibi insanın temel ihtiyaçlarını kapsayan alanlarda sorunlarla karşı karşıya gelmektedir. Bu sorunları en aza indirilebilmek için birçok kaynak ayrılmakta ve teknoloji geliştirilmektedir. Hiç şüphesiz bu teknolojilerin içerisinde çevre biyoteknolojisi en etkili araçlardan biridir. Çevreye verilen kirleticilerin azaltılmasında ve yüksek fayda ile geri kazanılmasında biyolojik süreçler önemli bir rol oynamaktadır. Bunu yaparken mikrobiyal topluluklar kullanılmaktadır. Bu topluluklar kendi kendine organize olabilir ve bir ekosistem oluşturabilir. Mikroorganizmalar doğru şekilde yönetildiğinde, su, çamur ve toprakta bulunan kirleticilerin giderilmesi, enerji ve su gibi yenilenebilir kaynakların geri kazanımı, tehlikeli patojenlerden korunma gibi sürdürülebilir hizmetler alınabilir (Öztürk 2010).

Toksik olan kirleticileri daha az veya hiç toksik olmayan forma dönüştürmek için kullanılan mikrobiyal prosedürlere biyoremediasyon denir. Kirlenmiş alanlar biyolojik araçlar kullanarak temizlenebilir. Bakteriler, mantarlar, algler ve bitkiler gibi çeşitli organizmalar bu prosedürlerde görev alabilir (Vidali 2001). Bitkiler kullanılarak çevresel kirleticilerin temizlemesine ise fitoremediasyon denir ve toksik maddelerin toprak, su ve havadan uzaklaştırılması için kullanılan bir teknolojidir (Salt et al. 1998).

Enzimler doğal çevreyi verimli ve zarar vermeden restore ettiği için çok çeşitli toprak ve su kirleticilerinin temizlenmesinde kullanılmıştır (Demnerová et al. 2005). Biyoremediasyon sürecinde mikroorganizmalar kirleticilere enzimatik olarak saldırır ve onları zararsız ürünlere dönüştürür (Singh et al. 2020).

**Çizelge 1.2.** Biyoremediasyonda kullanılan bazı mikrobiyal enzimler

Fenol, klorofenol	Yabanturpu peroksidaz	Yabanturpu peroksidaz enzimi fenolik bileşikleri bozar.
Organofosfat	Fitaz	Organofosfat içeren bileşiklerin bozunmasıyla inorganik fosfor ortaya çıkarılır.
Delor 106 poliklorlu bifenil	Lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz	Polisiklik aromatik hidrokarbonların, bir poliklorlu bifenil karışımının (Delor 106) ve bir dizi sentetik boyanın bozunması.
Malathion ve Parathion	Karboksilesterazlar	Karboksilesteraz, malathion'u malathion monokarboksilik asit ve dikarboksilik aside dönüştürür.
Antrasen ve benzo(a)piren	Lakkaz	Kirleticilerin %90 ila %100'ünün 24 saat içinde bozunması.
Fenol, klorofenol	Yabanturpu peroksidaz	Yabanturpu peroksidaz enzimi fenolik bileşikleri bozar.
Organofosfat	Fitaz	Organofosfat içeren bileşiklerin bozunmasıyla inorganik fosfor ortaya çıkarılır.
Delor 106 poliklorlu bifenil	Lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz	Polisiklik aromatik hidrokarbonların, bir poliklorlu bifenil karışımının (Delor 106) ve bir dizi sentetik boyanın bozunması.
Malathion ve Parathion	Karboksilesterazlar	Karboksilesteraz, malathion'u malathion monokarboksilik asit ve dikarboksilik aside dönüştürür.
Antrasen ve benzo(a)piren	Lakkaz	Kirleticilerin %90 ila %100'ünün 24 saat içinde bozunması.

### 1.4. Antimikrobiyal Bileşikler ve Böcek Bağırsağıyla Olan İlişkileri

Mikrobiyal topluluklar, sinerjetik veya antagonistik olarak farklı şekillerde birbirleriyle etkileşime girerler. Bakteriler yaşam için gerekli olan maddelerin bol olduğu ortamlara sahip olmak ve varlıklarını devam ettirebilmek için sürekli olarak besin ve habitat için savaşırlar (Hibbing et al. 2010). Bakteri antagonizmine baktığımızda, üretici suşlar tarafından üretilen toksik bileşikler hassas suşlar tarafından üretilemez ve aynı zamanda hassas suşların büyümelerini engeller (Russel et al. 2017). Antimikrobiyal üreticilerin, hassas ve dirençli türlerle ortak bir yaşam alanında birbirleriyle olan etkileşimlerinin antimikrobiyal biyoçeşitliliği geliştirdiği öne sürülmektedir. Örneğin

## 1. GİRİŞ

---

üreticilerin antimikrobiyalleri üretmek için harcadığı enerji, dirençliler ve hassas olanlara göre daha fazladır. Bu durum hassas olanları öldürürken dirençli olanların yaşam alanında öne geçmesine sebep olur. Aynı şekilde dirençlilerin direnç sağlamak için ürettiği metabolitlerde üreticiler kadar olmasa da enerji gerektirir. Bu sebeple hassas olanlar dirençlilere karşı bir avantaj yakalamış olurlar. Bu şekilde her tür bir diğerine avantaj sağlar. Bu durum üretici, dirençli ve hassas tür döngüsünü sürekli olarak hareketli tutar ve evrimsel açıdan canlıların ve metabolitlerinin gelişmesini sağlar (Kelsic et al. 2002).

Günümüzde antimikrobiyal direnç küresel sağlık sisteminin en büyük zorluklarından biri haline gelmiştir ve her yıl yaklaşık 700.000 ölüme neden olmaktadır. Buna karşın son 5 yılda yalnızca birkaç yeni antibiyotik geliştirilmesine rağmen bunların çoğu halihazırda direnç geliştirilmiş ilaçlardan türetilmiştir (World Health Organization 2019). Tasarlanmış sentetik antimikrobiyallerin artan popüleritesine rağmen doğa, yeni aktif bileşiklerin keşfi için değerli bir kaynaktır. Halihazırda piyasada bulunan tüm antimikrobiyallerin %69'u doğal bileşiklerden elde edilir ve bunların %97'si mikrobiyal kaynaklıdır (Patridge et al. 2016). Yeni etki biçimlerine sahip aktif molekülleri bulma şansını artırmak için toprak bakterileri gibi sıklıkla çalışılan doğal kaynaklardan ziyade daha az çalışılmış doğal kaynaklara yönelmek gereklidir (Challinor and Bode 2015). Yeni antimikrobiyallerin keşfedilebileceği bu potansiyel kaynaklardan biri de böceklerdir. Halihazırda böceklerden türetilen antimikrobiyal bileşikleri kapsayan yayınlanmış makalelerin miktarı son on yılda istikrarlı bir şekilde artmıştır (Xie et al. 2019).

Yeni ilaç adaylarını keşfetmek için böceklerle ilişkili simbiyotik mikroorganizmaların değerli bir kaynak olduğunu gösteren iki argüman vardır. Birincisi yetişkin böceklerin patojenlere karşı fiziksel ve biyolojik bağışıklık elamanları olsa bile (Kaltenpoth and Engl 2014) yumurta ve larva evreleri gibi yaşam evrelerinde çevresel tehditlere karşı çok savunmasızdırlar (Van Arnam et al. 2018). Çeşitli böceklerde savunmacı simbiyontların bu gelişim aşamalarında çok önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, yalnız yaban arıları, kuluçka odalarındaki pupalarını korumak için *Streptomyces* bakterilerini kullanır (Van Arnam et al. 2018). İkincisi ise şu ana kadar yetişkin böcekler için de birçok simbiyont mikroorganizmanın koruyucu etkileri tanımlanmıştır (Kaltenpoth and Engl 2014). Böcekler, çeşitli ekolojik nişleri kolonize etmede oldukça başarılıdır ve yaşamları boyunca yırtıcı böcekler, parazitler ve

entomopatojenler dahil olmak üzere birçok farklı tehdide maruz kalırlar (Van Arnam et al. 2018). Simbiyotik mikroorganizmalar, böceklerin bu yabancı istilacılara karşı savunma sistemlerinde önemli roller oynar ve zorlu ortamlarda gelişmelerine yardımcı olur (Engle and Moran, 2013; Van Arnam et al. 2018).

Günümüze kadar bakteriler tarafından üretilen farklı antimikrobiyal maddeler bildirilmiştir.

### 1.4.1. Bakteriyosinler

Genel olarak bakteriyosinler, belirli konsantrasyonlarda belirgin antimikrobiyal aktiviteye sahip, çok işlevli, ilişkili olduğu diğer bakteri suşlarının büyümesini engelleyen ve ribozomal olarak üretilen protein yapılı maddelerdir (Bemena et al. 2014; Chikindas et al. 2018). Bu moleküller hedef aldıkları bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve bu sebeple biyoteknolojik bir potansiyel taşırlar. Bir bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler aynı türe ait diğer bakterileri inhibe ediyorsa genellikle dar spektrumlu bakteriyosinler, başka bir cinse ait bakterileri inhibe ediyorsa da geniş spektrumlu bakteriyosinler olarak kabul edilirler (Juturu and Wu, 2018).

İlk bakteriyosin üretimine ilişkin raporlar 1925 yılında *Escherichia coli*'den alınmış ve bu peptit mikrobiyal kaynağını yansıtmaları için "kolisin" olarak adlandırılmıştır (Gratia 1925). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler özellikle önemlidir, çünkü bu bakteriler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilen) statüsü almıştır (Zacharof and Lovitt 2012). Böylece, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin yaygın ticari uygulamaya sahip olan ilk bakteriyosin olmuştur. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri doğal olarak yüksek ısıya toleranslıdır ve geniş bir pH aralığında etkinliğe sahiptir. Aynı zamanda renksiz, kokusuz ve tatsızdır. Bu özellikler onların potansiyel kullanılabilirliklerini artırır. Ayrıca proteinli yapıları nedeniyle proteolitik enzimler tarafından kolayca parçalanırlar. Bu sebeple bakteriyosinler insan vücudunda veya çevrede çok uzun süre aktivitesini koruyamazlar (Perez et al. 2014).

### 1.4.2. Sideroforlar

Demir, redoks tepkimelerinin ve birçok enzimin ayrılmaz bir bileşenidir ve bu nedenle metabolizma, enerji transferi ve diğer işlemler için vazgeçilmezdir (Wandersman and Delepelaire 2004). Aslında demir, yalnızca çok hücreli organizmalar için değil, aynı zamanda çoğu mikroorganizma için de temel bir elementtir. Tipik bir bakteri ortamında serbest demir iyonlarının mevcudiyeti ferrik iyonunun çok sınırlı çözünürlüğünden dolayı oldukça düşüktür. Bununla birlikte mevcut olan demirin bazı organizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenerek kontrol edilmesi, potansiyel patojenlerin bu temel elemente erişimini kısıtladığı için bir antimikrobiyal strateji olarak kullanılabilir. Demiri tedarik edebilmek için mikroorganizmalar bir strateji olarak sideroforları geliştirmiştir (Golonka et al. 2019). Sideroforlar, demirin sınırlı olduğu ortamlarda üretilen ve çevredeki demiri şelatlamak için salgılanan küçük moleküllerdir. Sideroforlar yüksek afinite gösterdikleri ferrik iyonunu difüzyon yoluyla hücre içine çekebilir (Aguado-Santacruz et al. 2012). Sideroforların üretimi, demire ulaşamayan mikroorganizmaları ekolojik nişlerinden dışlayarak, çevredeki diğer bakterilere göre üretici bakteriye rekabet avantajı sağlar (Beneduzi et al. 2012).

### 1.4.3. Diğer antimikrobiyal bileşikler

Bakteriler ayrıca uçucu bileşikler ve geniş spektrumlu antibiyotikler gibi başka metabolitler de üretir. Uçucu bileşikler bakteriyel iletişim süreçlerinde hayati öneme sahiptir, ancak araştırmalar bu bileşiklerin bakteriler tarafından salgılandığında diğer mikroorganizmalar üzerinde antagonizma gerçekleştirebileceğini göstermektedir (Chaurasia et al. 2005). *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen uçucu bileşiklerden biri hidrosiyanik asittir ve çeşitli antibiyotik aktivitelerine katıldığı gösterilmiştir. *Thielaviopsis basicola*'nın biyolojik kontrolü üzerindeki etkileri, hidrosiyanik asitin antibakteriyel özelliklerini kanıtlamaktadır (Matilla and Krell 2017).

Geniş spektrumlu antibiyotikler gibi bazı metabolitler hem antibakteriyel hemde antifungal özelliklere sahip olabilir. Bunlardan bazıları genellikle *Bacillus* cinsinin suşları tarafından üretilen lipopeptitleri içerir. Bu moleküller, hidrofilik bir siklik peptidin 12 ila 14 karbon atomu arasında değişebilen bir yağ asidi zincirine bağlanmasından oluşan

amfipatik bir yapıya sahip olmaları ile karakterize edilmiştir (Meena and Kanwar 2015). Aslında, mikroorganizmaların büyümesini engellemedeki etkinlikleri kanıtlanmıştır. Lipopeptitlerin bazıları yalnızca mantarlara karşı etkinliğe sahip iken (Rojas-Solis et al. 2013) surfaktinler gibi lipopeptitlerin hem bakterilere hem de mantarlara karşı etkinliği vardır (Meena and Kanwar, 2015). Benzer diğer antibiyotikler ise yapılarında fonksiyonel gruplar olarak çoklu  $\beta$ -hidroksiketon veya  $\beta$ -hidroksialdehit içeren poliketidlerdir. Andrimid gibi bazıları geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip iken (Matilla et al. 2016), bazıları yalnızca mantarlara karşı etkilidir (Matilla and Krell 2017).

Yakın zamanda, lektin benzeri bakteriyosinler olarak tanımlanan yeni bir antibakteriyel protein ailesi keşfedilmiştir. Bu moleküller monokot mannoz bağlayıcı lektin ailesinin karbonhidrat bağlayıcı iki bölgesini içerir. Bu lektin benzeri bakteriyosinler birkaç *Pseudomonas* türlerini öldürebilir ancak bu cins dışında aktif değildirler (Parret et al. 2005).

### 1.5. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Böcekler birçok farklı ekosistem içerisinde yer alan ve tür çeşitliliği itibarıyla çok zengin olan canlılardır. Bu sebeple farklı beslenme şekillerine ve fizyolojik yapıya sahip birçok böcek türü vardır. Aynı zamanda mikroorganizmalar ile yakından ilişki içerisinde olan böcekler, farklı mikroorganizmalar ile simbiyotik ilişkiler kurarlar. Bu ilişkiler de genelde bahsi geçen durumlarla bağlantılı olduğu için her böcek türü kendine ait olan özel bir mikrobiyom barındırır.

Bağırsak mikrobiyomu canlıların mikroorganizmalar ile en fazla etkileşime geçtiği ve dış etkenlerle değişebilen bir habitattır. Bu sebeple konakçı canlı ile bağırsak mikrobiyomu karşılıklı olarak birbirini etkiler. Konakçının yaşam koşulları mikrobiyomdaki mikroorganizma çeşitliliğini değiştirirken, mikrobiyomdaki mikroorganizmalar konakçı canlı için sindirim, koruma ve beslenme gibi birçok fayda sağlar. Hem böcek bakımından hem de mikroorganizmalar bakımından böcek bağırsağı seçici bir yapıya ve çeşitliliğe sahiptir. Bu seçicilik ve çeşitlilik böcek bağırsağını işlevsel mikroorganizmaların kazanılması için çok değerli bir kaynak haline getirir.

## 1. GİRİŞ

---

Bugüne kadar birçok çalışmada böcek bağırsakları mikroorganizmaların madenciliği için kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar çeşitli endüstriyel enzimlerin üretimi, yeni antimikrobiyal peptitlerin keşfi, çevresel kirliliklerin giderilmesi veya zararlı böceklerle mücadele edilmesi gibi birçok biyoteknolojik alanda kullanılmaktadır. Bu sebeple böcek bağırsaklarındaki mikrobiyom çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Ancak bu çalışmalar özellikle sucul ekosistemde yaşayan böcekler açısından hala yetersizdir. Bataklıklar gibi hem sucul hem de karasal ekosistemlerin bir birleşim noktası olan ekosistemler her iki ekosistemin özelliklerini taşıyabileceğinden tür çeşitliliği açısından zengin bölgelerdir. Bu sebeplerle bu alanlarda yaşayan böceklerin mikrobiyomlarının araştırılması dikkate değer bulguların ortaya çıkarılmasıyla sonuçlanabilir.

Aynı zamanda bu habitatlarda yaşayan mikroorganizma bolluğu da çok fazladır. Bu durum bu habitatlarda yaşayan böceklerin farklı mikroorganizmalar ile yakından ilişki içerisinde olmasını sağlar. Farklı mikroorganizmaların yaşadığı bu habitatlarda mikroorganizmalar arasında rekabet kaçınılmazdır. Bu rekabette kullanılan silahlardan birisi de antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerin üretilerek diğer mikroorganizmaların habitatтан eliminasyonudur. Bu sebeplerle sucul ekosistemlerde yaşayan böceklerin bağırsak mikrobiyomunun antimikrobiyal aktif bileşiklerin taranması için uygun bir habitat olduğunu düşünmekteyiz.

Yukarıda bahsi geçen nedenlerden dolayı yapmış olduğumuz bu çalışmada Erzurum ve çevresinde sulak alanlarda yaşayan sucul böceklerin bağırsak mikrobiyomundaki bakterilerin kültüre bağlı yöntemlerle taranması ve antimikrobiyal bileşikleri üretme yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu durum bakteri kaynaklarının belirlenmesi veya yeni türlerin keşfi için önemlilik arz etmektedir. Bu tarama çalışması bir ön çalışma niteliğine sahip olup, bulunan her bakteri türü yeni çalışmaların başlaması için bir potansiyel taşımaktadır.

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lui ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Güney Çin'deki Okaliptüs zararlısı *Leptocybe invasa* türüne ait safra arısının bağırsak mikrobiyomu kültüre bağlı yöntemler kullanarak incelenmiştir. 27 familya ve 44 cinse ait toplam 88 adet bakteri türünün tanımlandığı çalışmada farklı gelişim aşamalarında mikrobiyal çeşitliliğin ve miktarın farklı olduğu ortaya çıkarılmış ve *Leptocybe invasa* ile ilişkili bakterilerin olası ekolojik rolleri belirlenmiştir (Liu et al. 2021).

Dugas ve arkadaşları tarafından amerikan hamamböceği (*Periplaneta americana*) bağırsaklarından yapılan çalışmada, sarı pigmentli bakteri suşları değerlendirilmiştir. İzole ettikleri 54 sarı pigmentli bakterinin 16S rRNA dizi analizi sonucunda Flavobacterium grubuna ait *Chryseobacterium* spp. oldukları ortaya konulmuştur. Ardından bu bakterilerin bağırsak ile simbiyotik ilişkileri incelenmiştir (Dugas et al. 2001).

Brennan ve arkadaşları tarafından termitler (Isoptera) ve güveler (Lepidoptera) üzerinde yapılan çalışmada, bağırsaklarındaki bakteriler ksilanaz aktivitesi varlığı bakımından incelenmiştir. Bu bakterilerde ksilanaz proteinlerini kodlayan genin varlığı taranmıştır. Proteinlerde alışılmadık birincil dizilere ve yeni fonksiyonel kısımlara rastlanmıştır. Yeni keşfedilen bu enzimlerin bilinen ksilanaz enzimlerinden farklı olduğu yönler ve işlevsel özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Brennan et al. 2004).

Broderick ve arkadaşları tarafından *Lymantria dispar* larvalarının orta bağırsakları üzerinde yapılan çalışmada, bağırsak bakterileri kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemler kullanarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda beslenme şekillerinin mikrobiyom üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Yapılan analizlerde *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus*, *Paenibacillus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Rhodococcus* sp. ve *Microbacterium* sp. suşları tespit edilmiştir. Beslenmede kullanılan bitki türüne göre bağırsak mikrobiyomunda değişimlerin olduğu ortaya konulmuştur (Broderick et al. 2004).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Geissinger ve arkadaşlar tarafından *Pachnoda ehippiata* böceğinin bağırsaklarında yapılan çalışmada, bağırsak bakterileri PCR tabanlı tarama ve 16S rRNA dizi analizi teknikleriyle incelenmiştir. Yapılan taramalarda gram-negatif, zorunlu anaerob ve çubuk şeklinde olan yeni bir tür ultramikrobakteri keşfedilmiştir (Geissinger et al. 2009).

Ateyyat ve arkadaşları tarafından *Bemesia tabaci* üzerinde yapılan çalışmada *Erwinia persicinus*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Brevibacterium casei*, *Staphylococcus gallinarum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Exiguobacterium undue* ve *Micrococcus caseolyticus* olarak toplam 11 adet bakteri türü izole edilmiştir. Bu türler 16S rRNA dizi analizi ve floresan in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır (Ateyyat et al. 2010).

Geiger ve arkadaşları tarafından *Glossina palpalis gambiensis* orta bağırsağı üzerinde yapılan çalışmada, *Serratia glossinae* türüne yakın bir akraba olan zorunlu anaerob ve çubuk şeklinde yeni bir bakteri keşfedilmiştir (Geiger et al. 2010).

Patil ve arkadaşları tarafından bal arılarının bağırsakları üzerinde yapılan çalışmada, bağırsakta bulunan ve aktinomiset üreten bakterilerin varlığı incelenmiştir. Bu aktinomisetlerin bal arısının bağırsak mikrobiyomunda olan ve olmayan bakteriler üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Patil et al. 2010).

Feng ve arkadaşları tarafından ipek böceği *Bombyx mori* üzerinde yapılan çalışmada, farklı yapraklarla beslenen ipek böceklerinin mikrobiyomlarındaki farklılıklar ve bu farklılıklardan meydana gelen böceğin patojenlere karşı olan direnci incelenmiştir. İpek böcekleri dut veya *Tricuspida data cudrania* yapraklarıyla beslendiğinde, *T. cudrania* yapraklarıyla beslenen böceklerin patojen enfeksiyonlarına karşı daha hassas olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bağırsak mikrobiyom çalışmalarında lipaz üreten bakteri çeşitliliği tespit edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Farklı beslenme şekillerinin bakteri çeşitliliği üzerindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Oluşan farklı mikrobiyomların hastalık direncine etkileri olabileceği bildirilmiştir (Fenga et al. 2011).

Geiger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Güney Kamerun'da uyku hastalığı bulunan üç köydeki çeçe sineklerinden örnekler alınmış ve kültüre bağlı teknikler kullanarak sineklerin bağırsak bakteri kompozisyonu araştırılmıştır. Yapılan 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik analiz sonucu dört adet *Acinetobacter* spp., dört adet *Enterobacter* spp., iki adet *Enterococcus* spp., ve birer adet *Providencia* sp., *Sphingobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Lactococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. bakteri türleri bulunmuştur (Geiger et al. 2011).

Lu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Lissorhoptrus oryzophilus*'un orta bağırsağındaki bakteriler kültüre bağlı yöntemlerle izole ve karakterize edilmiştir. Yapılan 16S rRNA dizi analizleri sonucunda bu bitlerin bağırsaklarında *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter oryzae*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve *Enterococcus faecalis* olmak üzere altı çeşit bakteri türü izole edilmiştir (Lu et al. 2013).

Podgwaite ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Anoplophora glabripennis* böceğinin deri ve sindirim sisteminde yaşayan bakteri çeşitliliği incelenmiştir. *Staphylococcus sciuri* incelenen 19 yetişkin böceğin 13'ünde en yaygın izolat iken, Enterobacteriaceae üyeleri larvalardan yapılan izolasyonlarda baskın çıkmıştır. Genel olarak yetişkin ve larvaların bağırsaklarından *Enterobacter nimipressuralis*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia rubidaea*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Leclercia adecarboxylata*, *Rahnella aquatilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus casseliflavus*, *Micrococcus luteus*, *Dienococcus radiodurans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Macrococcus equipercicus*, *Staphylococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium citreum* ve *Tsukamurella inchoensis* bakterileri izole edilmiştir (Podgwaite et al. 2013).

Govindarajan ve arkadaşları tarafından gıda atıklarıyla beslene *Gryllotalpa krishnani* böcek türüyle yapılan çalışmada, böcek bağırsağından 40 bakteri suşu izole edilmiş ve tannaz aktivitesi bakımından taranmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonuçlarına bakılarak tanımlanan *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacteriaceae*

*bacterium* ve *Bacillus cereus* suşlarının, yüksek düzeyde tannaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Govindarajan et al. 2016).

Haloı ve arkadaşları tarafından ekonomik olarak önemli bir ipek böceği olan *Antheraea assamensis* (Helfer) üzerinde yapılan çalışmada, hastalıklı ve sağlıklı böceklerdeki bağırsak mikrobiyomu karşılaştırılmıştır. 16s rRNA dizi analiziyle belirlenen *Staphylococcus pasteurii*, *Bacillus pumilus*, *Achromobacter marplatensis*, *Paucisalibacillus globulus*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus* sp. ve *Bacillus subtilis* suşları sağlıklı bireylerde baskın olduğu bulunurken, *P. aeruginosa*, *Ornithinibacillus bavariensis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *S. aureus* ve *B. thuringiensis* suşlarının hastalıklı bireylerde baskın olduğu belirlenmiştir (Haloı et al. 2016).

Malele ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, afrika tripanosomiyazisine neden olan *Glossina pallidipes* sineğinin bağırsak mikrobiyomu incelenmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda üç *Bacillus* spp., *Vagococcus* sp., *Enterococcus* sp., otuzdört *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* sp., *Mesorhizobium* sp., *Paracoccus* sp., iki *Psychrobacter* spp., dört *Microbacterium* spp., üç *Micrococcus* spp., dört *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Dietzia* sp. ve *Flavobacterium* sp. suşları izole edilmiştir. *Glossina pallidipes*'in zengin bir bakteriyal çeşitliliğe sahip olduğu ve bu çeşitliliğin afrika tripanosomiyazi epiemiyolojisine etkileri ortaya konulmuştur (Malele et al. 2018).

Wiater ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Laetiporus sulphureus* mantarı ile beslenen *Diaperis boleti* böceğinin bağırsağında alfa-(1 -> 3)-glukanı parçalayabilen bir bakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen bu bakteri suşunun 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Paenibacillus* sp. olarak tanımlandığı belirtilmiştir (Wiater et al. 2019).

Callegari ve arkadaşları tarafından hayvan beslenmesi için alternatif bir protein kaynağı veya biyodizel üretimi için hammadde olarak kullanılabilecek yüksek besin değerine sahip olan *Hermetia illucens* böcek larvaları üzerinde yapılan araştırmada, bu larvaların bağırsak mikrobiyomu tanımlanmış ve mikrobiyomun böceğin biyokütlesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İzole edilen 193 suşdan baskın olanların %22'si

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

*Providencia* spp., %6'sı *Morganella* spp., %21'i *Klebsiella* spp., %7'si *Escherichia* spp., %8'i *Acinetobacter* spp., %7'si *Stenotrophomonas* spp., %6'sı *Pseudomonas* spp. ve %6'sı *Enterococcus* spp. cinslerine ait olduğu gösterilmiştir. *Bacillus licheniformis* suşunun beslenme açısından böceğin gelişimine pozitif yönde katkısı olduğu tespit edilmiştir (Callegari et al. 2020).

Karthi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, önemli bir zirai zararlı böcek olan *Spodoptera litura* bağırsaklarından mikrobiyom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların 16s rRNA dizi analiziyle *Clostridium butyricum*, *Pseudomonas putida*, *Clostridium botulinum* türleri olduğu tanımlanmıştır. *C. botulinum*'un böceği sipermetrin toksisitesine karşı koruduğu ortaya çıkarılmıştır (Karthi et al. 2020).

Msango ve arkadaşları tarafından *Samia ricini* bağırsaklarından yapılan araştırmada, 16S rRNA dizi analizi, metagenomik analiz ve kalitatif enzimatik testler ile bağırsak mikrobiyomu incelenmiştir. Kültüre bağlı olarak izole edilen 60 aerobik bakterinin %54'ü Firmicutes ve %46'sı Proteobacteria şubesine ait iken 12 fakültatif anaerobik bakterinin %92'si Proteobacteria ve %8'i Firmicutes şubelerine ait olduğu gösterilmiştir. Metagenomik analizin sonuçlarına göre ise hem kültürlenebilir hem kültürlenemeyen bakterilerin %60'ı Proteobacteria ve %20'si Firmicutes şubelerine ait olduğu gösterilmiştir. Yapılan enzimatik aktivite testlerinde ise selüloolitik, lipolitik ve nitrat redüktaz aktivitelerine sahip enzimlerin bakteriler tarafından sentezlendiği gösterilmiştir (Msango et al. 2020).

Skowronek ve arkadaşları tarafından *Melolontha melolontha* larvalarının orta bağırsağından elde edilen 900 bakteri izolatıyla yapılmış olan çalışmada, bu bakterilerin *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine karşı antimikrobiyal etki gösterip göstermediği test edilmiştir. Uygulanan testlerde *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakterilere antibakteriyel etki gösteren 12 suş izole edilmiştir. Bu suşların 16S rRNA, rpoB, rpoD veya recA gen dizi analizlerine göre *Pseudomonas chlororaphis*, *Citrobacter murlinae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Chryseobacterium lathyri*, *Chryseobacterium* sp., *Serratia liquefaciens* ve *Serratia* sp. türleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Skowronek et al. 2020).

Vilcinskas ve arkadaşları tarafından *Tineola bisselliella*'nın bağırsaklarından yapılan çalışmada, keratinaz aktivitesine sahip bakteriler araştırılmıştır. Keratinaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp. cinsi yeni bir bakteri suşu tanımlanmıştır. Bu bakteriden keratinin parçalanmasından sorumlu birkaç aday enzim ortaya çıkarılmıştır (Vilcinskas et al. 2020).

Shumo ve arkadaşları tarafından *Hermetia illucens* larvalarının bağırsakları üzerinde yapılmış olan çalışmada, atıklarla beslenen ve hayvan yemi olarak kullanılan *Hermetia illucens* larvalarının bağırsaklarında patojenik bakterilerin olup olmadığı taranmıştır. Kültüre bağlı yöntemlerle izole edilen bakterilerin *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Brevibacterium luteolum*, *Staphylococcus* sp. ve *Bordetella* spp. suşları olduğu moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur. Bağırsak üzerinde yapılan metagenomik çalışmada ise bağırsak mikrobiyomunda patojenik suşların varlığı tespit edilmiştir (Shumo et al. 2021).

Bitkilerle beslenen termitler (*Cryptotermes* spp.), yeşil kurtlar (*Helicoverpa armigera*) ve ipek böcekleri (*Samia ricini*) gibi birçok böcek türü yaşamak için selüloz gibi sindirimi zor olan karbon kaynağını kullanabilmek zorundadır. Bu böcekler bitkilerle beslendikleri için bağırsak mikrobiyomlarında selülaz aktivitesine sahip bakterilerin bulunması olasıdır. Bu sebeple bu böceklerin mikrobiyomlarında yapılan birçok çalışmada lignoselüloz veya selülozu parçalayabilen simbiyont bakterilerin varlığı taranır. Selülaz, hemiselülaz ve ligninaz gibi enzimlerin izolasyonu için birçok çalışmada bu böceklerin mikrobiyomu incelenmiş ve bu enzimler izole edilmiştir (Rehman et al. 2009; Shil et al. 2014; Bajya et al. 2015; Dantur et al. 2015; Dar et al. 2018; Peristiwati et al. 2018; Dar et al. 2021a, 2021b ; Msango et al. 2021a; Msango et al. 2021b).

Kim ve arkadaşları tarafından akuatik bir böcek olan *Cincticostella levanidovae*'nin bağırsağından yapılan çalışmada, yeni bir tür bakteri keşfedilmiştir. Yapılan analizler sonucu *Ephemeropterocola* cinsine ait olan yeni suş *Ephemeropterocola cinctiostellae* olarak isimlendirilmiştir (Kim et al. 2019).

Receveur ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, İtalya'da bulunan bir Alp nehri boyunca sucul böceklerin bağırsak mikrobiyomu metagenomik yöntemler

kullanarak incelenmiştir. Değişken beslenme koşulları ve farklı habitatların bağırsak mikrobiyomundaki etkileri belirlenmiştir. Aynı zamanda böcek mikrobiyomunun nehirdeki ekosisteme olan etkileri gösterilmiştir (Receveur et al. 2020).

Bektaş ve arkadaşları tarafından Zökün gölündeki *Hydrochara caraboides* akuatik böcek türünün bağırsaklarından yapılan çalışmada, metagenomik yöntemlerle bağırsak mikrobiyomu tanımlanmıştır. Toplamda 803 bakteri türünün tanımlandığı çalışmada aynı zamanda ağır metallerin mikrobiota üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Bektaş et al. 2021a).

Bektaş ve arkadaşları tarafından yenilebilir bir akuatik böcek olan *Cybister laterimarginalis torquatus* türü üzerinde yapılan çalışmada, böcek bağırsak mikrobiyotası kültüre bağlı metotlar kullanılarak izole edilmiştir. Yapılan moleküler tanıma *Lelliottia amnigena* ve *Citrobacter freundii* bakterileri tanımlanmıştır (Bektaş et al. 2021b).

Chellaram ve arkadaşları tarafından kısa antenli çekirge bağırsakları üzerinde yapılan çalışmada, insan patojen bakteri türü olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahemolyticus* ve bir mantar türü olan *Candida albicans* üzerinde antagonistik etki gösteren bakteriler taranmıştır. *Pseudomonas otitidis*'in, *E. coli* ve *C. albicans* üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Chellaram and Praveen, 2015).

Poulsen ve arkadaşları tarafından *Sceliphron caementarium* ve *Chalybion californicum* türü yaban arılarının üzerinde yapılan çalışmada, zenginleştirme kültürü kullanılarak 200'den fazla *Streptomyces Actinobacteria* izolatu elde edildi. Bu izolatlardan scelifrolaktam adı verilen ve yeni bir antimikrobiyal bileşik olan makrosiklik laktam da dahil olmak üzere 11 adet ikincil metabolit izole edildi (Poulsen et al. 2011).

Wu ve arkadaşları tarafından koleopteran (*Holotrichia parallela*) larvasının bağırsağında bulunan *Pseudallescheria boydii* mantarı üzerinde yapılan çalışmada, iki yeni seskiterpen boydine A ve B izole edildi. Boydine B'nin *Bifidobacterium* sp., *Veillonella parvula*, *Anaerostreptococcus* sp., *Bacteroides vulgatus* ve *Peptostreptococcus* sp. klinik suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu

gösterilmiştir. Boydine A'nın ise benzeri görülmemiş bir karbon iskeletine sahip olduğu ve mantarlarda molekül içi aldol ilavesine izin veren bir biyokimyasal bileşik olduğu tespit edilmiştir (Wu et al. 2014).

Akbar ve arkadaşları tarafından iki hamamböceği türü olan *Gromphadorhina portentosa* ve *Blaptica dubia* bağırsakları üzerinde yapılan çalışmada, bu türlerden bağırsak bakterileri izole edilmiş fakat karakterize edilmemiştir. İzole edilen bakteriler, gram pozitif olan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus* ve gram negatif negatif olan *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite bakımından incelenmiştir. Hamamböceklerinin bağırsak bakterilerinin güçlü antibakteriyel özelliklere sahip aktif moleküller ürettiği belirlenmiştir (Akbar et al. 2018).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında (YÜTAM) yapılmıştır. Kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Cihaz Adı	Modeli
+4 Soğutucu	Edesa SESC-17
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini Protean Tetra Cell
Hassas Terazî	Weightlab Instruments WL-3002L
Homojenizatör	Qiagen TissueLyser LT
Isıtıcı Blok	Bioer CHB-202
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Magnetik Isıtıcı	WiseStir MSH-20D
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
Otoklav	Hirayama HV 50-L, Tomy SX-500E
PZR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
pH Metre	OHAUS ST 3100F
Santrifüj	Wise Spin CF-10
Spektrofotometre	ThermoScientific Multiskan GO
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

#### 3.1.2. Sarf malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck, Sigma, BioLab ve Honeywell firmalarından temin edilmiştir. Besiyerleri Merck firmasından temin edilmiştir. Genomik DNA izolasyon ve PCR Purifikasyon kiti ile 2x PCR master mix EcoTech Biyoteknoloji firmasından temin edilmiştir.

#### 3.1.3. Tripsin/ Proteinaz K parçalama tekniğinde kullanılan çözeltiler

- **Tripsin/ Proteinaz K çözücü tamponu**

Son konsantrasyonları 1 mM HCl ve 1 mM CaCl<sub>2</sub> olacak şekilde 5 ml son hacimde ve distile su içerisinde solüsyon hazırlanır.

- **Tripsin/ Proteinaz K solüsyonu**

3ml tripsin/ proteinaz K çözücü tamponu içerisine 3 mg tripsin ve 22,5 mg proteinaz K eklenerek çözülür. -20°C'de saklanır.

#### 3.1.4. Native ve SDS PAGE tekniğinde kullanılan çözeltiler

- **Native PAGE Yürütme tamponu**

3 gr Tris Base ve 14,4 gr Glisin, 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

- **2X yükleme boyası**

0,5 M, pH 6,8 olan 2,5 ml Tris-Base, 2 ml Gliserol, 0,01 gr Bromofenol Mavisi ve 5,5 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **%30 akrilamid karışımı**

29 gr akrilamid ve 1 gr N,N' metilbisakrilamidi 60 ml distile su içinde çözüldükten sonra son hacim distile suyla ile 100 ml'ye ayarlanmıştır. Çözelti filtrelenerek (0,45 µm) karanlık ortamda +4 °C'de saklanmıştır.

- **%10'luk Amonyum Persülfat**

1 gr Amonyum Persülfat distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 ml' ye tamamlanmıştır.

- **1,5 M Tris tamponu (pH:8.8)**

11,82 gr Tris-Base 30 mL distile suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH 8,8'e getirilerek distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

- **0,5 M Tris tamponu (pH:6.8)**

3,94 gr Tris-Base 30 ml distile suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH 6,8'e ayarlanarak distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (Shukolyukol 2011).

- **SDS PAGE yürütme tamponu**

3 gr Tris, 14 gr Glisin, 1 gr SDS tartılarak 900 ml distile suda ile çözüldürülmüş ve pH 8,8'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **%10 SDS**

10 gr SDS 100 ml distile suda çözüldürüldükten sonra steril filtreden (0,45µm) geçirilerek hazır hale getirilmiştir.

### 3.1.5. Gümüş boyama solüsyonları

- **Jel fiksasyon çözeltisi**

40 ml etanol ve 10 ml asetik asit karıştırılmış, son hacim 100 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

- **Hassaslaştırıcı/sensitizer çözelti**

0,04 gr sodyum tiyosülfat 200 ml distile su ile çözülmüştür.

- **Gümüş boyama çözeltisi**

0,2 gr gümüş nitrat ve 40 µl formaldehit son hacim 200 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

- **Geliştirici/developer çözeltisi**

7,5 gr sodyum karbonat ve 125 µl formaldehit son hacim 250 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

- **Durdurucu çözelti**

0,5 ml asetik asit son hacimi 100 ml oluncaya kadar distile suyla tamamlanmıştır.

### 3.1.6. Diğer solüsyonlar

- **PBS**

Son konsantrasyonları 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olacak şekilde, istenilen hacimde steril distile su ile hazırlanır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Arazi çalışmaları

Tez çalışmasında sucul böcek olarak bölgemizde yaygın olması, toplanmasının kolay olması ve bu türlerin birçoğu üzerinde literatürde mikrobiyota çalışmasının olmaması nedenleriyle Hydrophilidae ve Dytiscidae familyasına ait türler seçilmiştir.

Böcek numuneleri, Erzurum ve çevresindeki bataklık ve sulak alanlardan gözenek çapı 2 mm olan elek kullanılarak toplanmıştır. Büyük olan türler cımbız yardımıyla; küçük olan türler ise aspiratör yardımıyla daha önceden otoklavda steril edilmiş cam şişelere konularak laboratuvara getirilmiş ve izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Hydrophilidae familyasına ait böcekler Prof. Dr. Ümit İNCEKARA tarafından; Dytiscidae familyasına ait böcekler ise Prof. Dr. Mustafa Cemal DARILMAZ tarafından teşhis edilmiştir.

##### 3.2.2. Bakteri izolasyonu

Laboratuvara getirilen böcekler ilk olarak %70'lik alkol içerisinde 15-20 saniye süreyle bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildi. Boyutları nedeniyle diseksiyon işlemine yatkın olan *Agabus bipustulatus*, *Cybister lateralimarginalis*, *Dytiscus marginalis*, *Enochrus fuscipennis*, *Hydrochara dichroma* ve *Ilybius fuliginosus* türlerinin bağırsakları steril şartlar altında çıkarıldı ve içerisinde PBS bulunan bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bağırsak florasındaki mikroorganizmaların steril fizyolojik su içerisine geçmesi için her bir tüpe 1mm cam boncuk konuldu. Mikrosantrifüj tüpleri homojenizatöre konularak 50 vuruş/saniyeye ayarlandı ve 10 dakika boyunca dokular parçalandı. Diğer türler ise bütün olarak homojenizasyon işlemine tabi tutuldu.

Homojenizasyon sonucu elde edilen süspansiyonlardan seri dilüsyonlar hazırlanarak; 0,1 ml izolasyon amaçlı kullanılan TSA besiyeri üzerine yayma plak yöntemiyle yayıldı. Besiyerleri 37°C'de inkübe edildi. İnkübatörde büyütülen bakteri kolonilerinden farklı olanlar arka arkaya yapılan pasajlar sonucu saflaştırıldı.

#### 3.2.3. Moleküler tanılama

##### ▪ Genomik DNA izolasyonu

İzole edilerek saflaştırılan bakterilerin moleküler karakterizasyonu için bakteriler 15ml'lik santrifüj tüpleri içerisindeki 3 ml sıvı TSB besiyerine aktarılarak 37°C'de 16 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. gDNA izolasyonu için kültürlerden 1,5 ml alınarak 6000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Ardından peletlerden EcoTech firmasının EcoSpin Bacterial Genomic DNA Kiti kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre gDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen gDNA'ların miktar ve saflıkları ThermoScientific Multiskan GO cihazıyla belirlendi. Ayrıca gDNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde 20 dk yürütülerek izolasyonları doğrulandı.

##### ▪ 16S rRNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Saf olarak elde edilen gDNA'dan 16S rRNA bölgesinin çoğaltılması için 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1392R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' primerleri kullanıldı. PZR reaksiyonu karışımı Çizelge 3.2'deki oranlarda ve Çizelge 3.3'teki koşullarda gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.2.** PZR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları

PZR Reaksiyonu	Miktar
dH <sub>2</sub> O	19 ul
PCR Master Mix (2X)	25 ul
Forward Primer	2 ul
Reverse Primer	2 ul
gDNA	2 ul

**Çizelge 3.3.** PZR reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
98°C	30 sn	1
94°C	10 sn	
53°C	20 sn	30
72°C	30 sn	
72°C	60 sn	1
4°C	∞	

#### ▪ Agaroz jel elektroforezi

PZR reaksiyonu sonucu çoğaltılan 16S rRNA bölgelerinin görüntülenmesi için PZR ürünlerinden 5µl alındı ve 1 µl 6x yükleme boyasıyla karıştırıldı. 100 ml 1x TAE içerisine 1 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırınında kaynayana kadar ısıtıldı. Agar çözüldükten sonra içerisine 3 µl etidyum bromür eklendi. Sıvı haldeki jel önceden tarakları takılarak hazırlanmış küvet içerisine dökülerek jelin donması için beklendi. Hazırlanan jel yürütme tankının içerisine alınarak PZR ürünleri kuyulara yüklendi. 90V'da 50 dk boyunca yürütüldü. Ardından BioRad ChemiDoc™ MP cihazı kullanılarak jel görüntülendi.

#### ▪ PZR ürünlerinin saflaştırılması ve DNA dizi analizi

PZR ürünleri DNA dizi analizi için EcoTech firmasının temin edilen EcoPure PCR/Gel Purification Kit kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler Ankara'da bulunan BM Labosis firması aracılığıyla her iki primer kullanılarak çift yönlü şekilde okutuldu. Elde edilen sekans verileri Bioedit software programı kullanılarak birleştirildi ve BLASTN+ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) veritabanı kullanılarak analiz edildi (Zhang et al. 2000).

#### 3.2.4. AMP üretici bakterilerin ön seleksiyonu

Tez çalışmasında ilk olarak araziden toplanan sucul böceklerin bağırsak floraları ortaya çıkarıldı. Daha sonra bu flora üyeleri AMP üretme yetenekleri bakımından değerlendirildi. Bu amaçla kültürler 15ml'lik santrifüj tüpleri içerisindeki 3ml sıvı TSB besiyerine aktarılarak 37°C'de 16-18 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Ardından kültürler 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak 0,22 µm'lik PES filtreden geçirildi.

##### 3.2.4.1. Well difüzyon testi

Elde edilen kültür filtratlarının antibakteriyel aktivitesi well difüzyon tekniği ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya (ATCC 27853) karşı test edildi. Bu amaçla %0,8 agar içeren MHA besiyeri hazırlanarak test organizmaları swap ile besiyeri yüzeyine yayıldı. Ardından, 6 mm mantar delici iğne ile besiyerine kuyular açılarak, bu kuyulara kültür filtratları eklendi. Sonra petriler düz bir şekilde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçüldü (Wiegand et al. 2008). Bu deney sonucunda test organizmalarının en az birine karşı etkili olan izolatlar bir sonraki çalışma için seçildi.

#### 3.2.5. Tripsin/ Proteinaz K parçalama yöntemi

Bir önceki ön seleksiyon çalışmasında seçilen bakteriler, antibakteriyel etkinin peptit kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla bu yöntem tabii tutuldu. Bu amaçla öncelikle kültür filtratlarının proteazların çalışmasına uygun hale getirilmesi için pH'ları 7'ye ayarlandı. Ardından her bir tür için kültür filtratları 3'e ayrıldı. Kontrol grubunda bulunan 2 kültür filtratına enzimsiz tampon ilave edilirken; deney grubuna 100µl/ml olacak şekilde tripsin/proteinaz K karışımı eklendi ve 37 °C'de 6 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra deney grubu ve kontrol grubunun biri 100°C'de 5 dakika bekletilerek, proteazlar inaktivasyonu sağlandı. Elde edilen kültür filtratları yayma plak yöntemiyle hazırlanan MHA besiyerine açılan kuyulara ilave edilerek well difüzyon testi gerçekleştirildi (Dusane et al. 2013; Yazıcı 2018).

#### 3.2.6. SDS PAGE

Bir önceki basamakta seçilen ve antibakteriyel etkinin peptitlerden kaynaklandığı doğrulanan izolatlarla ait kültür filtratlarından SDS PAGE yapılarak protein bantları görüntülendi. Bu amaçla kültür filtratları, 4X yükleme boyası ile karıştırılarak 95 °C'de 10 dakika kaynatıldı. Süre sonunda yeniden oluşabilecek sekonder yapıların oluşmasını engellemek için buza alındı. Örnekler hazırlanmış olan %15'lik jelle aralarında boşluk olacak şekilde iki kez yüklendikten sonra 80 V'da 2 saat yürütüldü. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, proteinleri görünür hale getirmek için 1 saat boyunca fiksasyon çözeltisinde bekletildi. Ardından 30 dakika boyunca distile suyla yıkandı ve hassaslaştırıcı çözelti ile 1 dk muamele edildi. Jel 3 kez distile suyla yıkanmasının ardından gümüş boyama çözeltisiyle 20 dakika boyandı. Jel tekrar distile suyla 3 kez yıkandıktan sonra üzerine geliştirici çözelti eklenip yeni kasete alındı ve görüntü çıkana kadar gözlemlendi. Proteinler görünür duruma gelince durdurma solüsyonuyla muamele edilip Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekildi (Grimaud et al. 2008).

#### 3.2.7. Native PAGE ve jel kapatma testi

Native PAGE, proteinlerin doğal yapısını bozan ajanların (merkaptotanol ve SDS) kullanılmadığı PAGE yöntemidir. Native PAGE'de proteinler, doğal yapılarının net yüküne, boyutuna ve şekline göre ayrılır (Shukolyukol 2011). Bu yöntem kullanılarak, proteinleri görünür hale getirmek için %15'lik poliakrilamid jel hazırlandı (Şekil 3.4). Protein örnekleri, 2X yükleme boyası ile pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hazırlanan jelle yüklenen örnekler, 150 V'da 1 saat yürütüldü. Native-PAGE için 2 jel hazırlanmış olup bunlardan birincisi bir önceki basamakta verilen yöntemle gümüş boyama işlemine tabi tutulurken; ikincisi jel kapatma testi için kullanıldı. Jel kapatma testi yapılacak olan jelle boyama yapılmamış olup distile suyla 20 dakika boyunca yıkandı. Ardından Native PAGE jeli kesilerek, soft MHB besiyeri (bakteri ekimi yapılmış) içeren petriye yerleştirildi. Bir gecelik inkübasyon sonucu gelişmenin olmadığı zon bölgesine denk gelen proteinin antibakteriyel aktiviteden sorumlu olduğu bulundu (Liu et al. 2012).

**Çizelge 3.4.** %15'lik Native PAGE jeli

Native PAGE	(%15) Ayırma jeli	(%5) Yükleme jeli
dH <sub>2</sub> O	2,2 ml	2,93 ml
1,5 M Tris (pH:8.8)	2,6 ml	-
0,5 M Tris (pH:6.8)	-	1,3 ml
% 30 Akrilamid Karışımı	5 ml	0,67 ml
% 10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

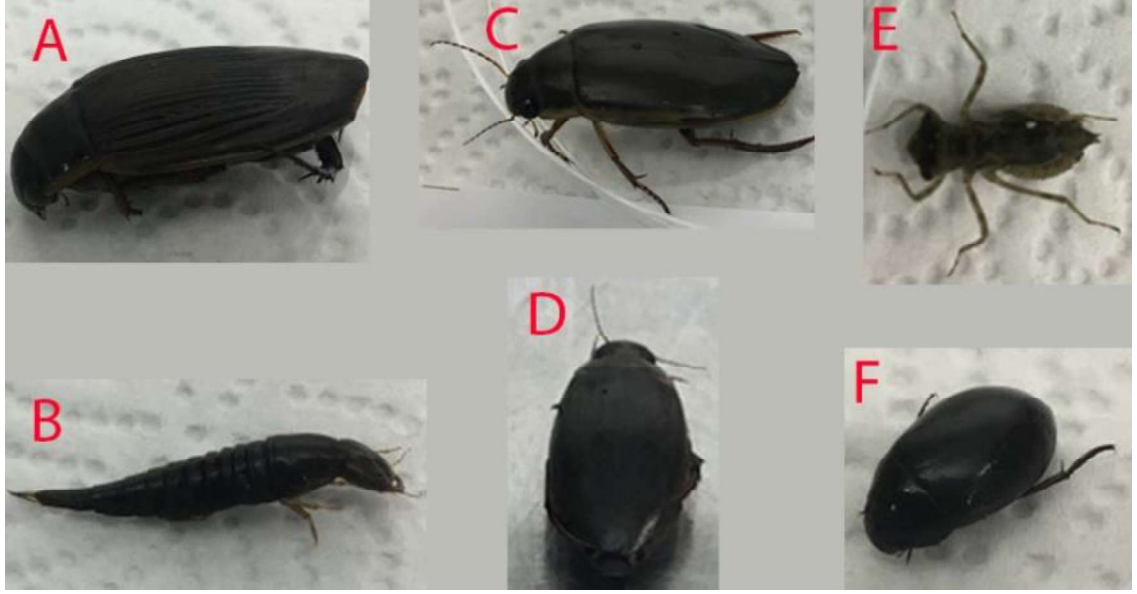
#### 4.1. Arazi alıŐmaları ve Toplanan Böcekler

Projede 5 farklı arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda 1. arazide at-Bingl yolu 1. km.; 2. arazide Yeşildere köyü yaylası (Erzurum) (Şekil 4.1); 3. arazide Erzurum-Tortum yolu 5. km; 4. arazide Erzurum- Ilıca yolu ve 5. arazide ise Erzurum-AŐkale yolu 35. km'den örnekleme yapılmıştır.



**Şekil 4.1.** Yeşildere köyüne ait yaylada sulak alanlardan yapılan rnekleme

Arazi çalışmalarında gözenek çapı 2 mm olan elek kullanılarak böcek numuneleri toplanmıŐ ve daha önceden otoklavda steril edilmiş kaplara cımbız ya da aspiratör yardımıyla konarak laboratuvara getirilmiştir. Numuneler tanılama ve izolasyon amaçlı olarak kullanılmak üzere ikiye ayrılmıştır. Tanılama amacı ile her bir türden (varsa diŐisi ile beraber) birer örnek %70'lik EtOH içerisine alınarak konvensiyonel tekniklerle tanılmak üzere uzmana gönderilmiŐtir. DiŐer rnekler ise izolasyon işlemlerinde kullanılmıŐca kadar +4°C'de saklanmıştır.



**Şekil 4.2.** Toplanan sucul böceklerden bazıları A. *Dytiscus marginalis* B. *Dytiscus marginalis* larva C. *Cybister lateralimarginalis* D. *Ilybius fuliginosus* E. *Ilybius fuliginosus* larva F. *Hydrochara dichroma*.

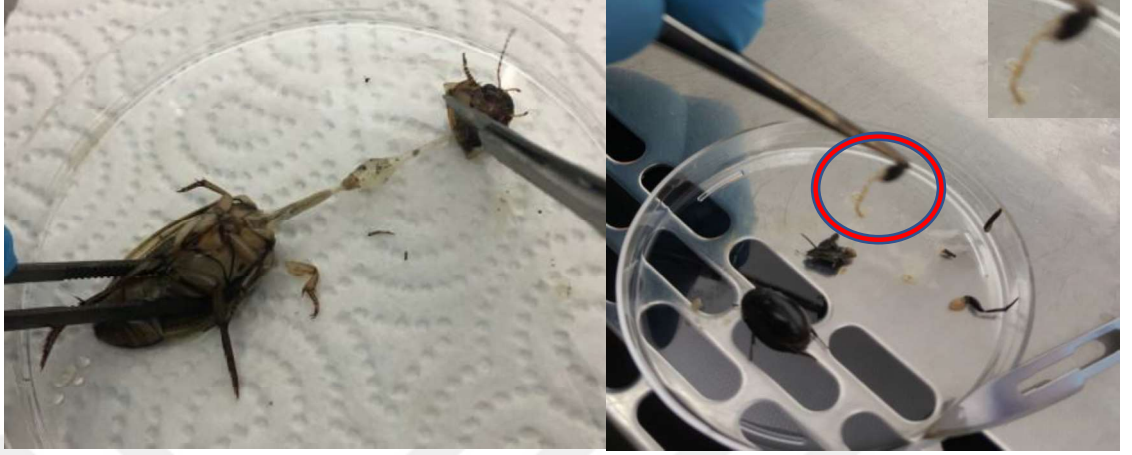
Yapılan arazi çalışmaları sonrasında laboratuvarında incelenen örneklerden Hydrophilidae familyasına ait *Berosus luridus*, *Enochrus fuscipennis*, *Hydrobius fuscipes*, *Hydrochara dichroma*, *Laccobius syriacus*; Dytiscidae familyasına ait *Agabus biguttatus*, *Agabus bipustulatus*, *Agabus labiatus*, *Colymbetes fuscus*, *Cybister lateralimarginalis*, *Dytiscus marginalis*, *Hygrotus saginatus*, *Laccophilus minutus*, *Graphoderus cinereus* ve *Ilybius fuliginosus* olmak üzere 13 cinse ait 15 farklı tür teşhis edildi (Şekil 4.2).

#### 4.2. Bakterilerin İzolasyonu

Bu floranın ortaya konulabilmesi için kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler kullanılmaktadır. Ancak kültür bağımlı yöntemlerde ilk olarak bağırsaktaki mikroorganizmalar kültüre alınır. Sonra mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri incelenerek karakterizasyon gerçekleştirilir. Bakterilerin somut olarak kültürlenmesi saf bakteri kültürlerinin var olması, bakterilerin belirli işlevler için test edilebilmesi gibi birçok açıdan avantaj sağlar (Wang et al. 2020). Tez çalışmasında AMP üretici türlerin seleksiyonu hedeflendiği için kültür bağımlı yöntem tercih edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Dış yzeyleri etil alkol içerisinde sterilize edilmiş ve diseksiyon işlemine mősait olan bőseler Şekil 4.3’de gősterildiĐi gibi diseksiyon işlemine tabi tutuldu.



**Şekil 4.3.** Diseksiyon işlemine bir örnek

Daha kősuk boyutlu olan tőrler ise yzey sterilizasyon iŐleminde sonra bőtun olarak homojenizasyon işlemine tabi tutuldu.



**Şekil 4.4.** Cam boncuk kullanılarak yapılan homojenizasyon sonrası mikrosantrifuj tőpleri.

Elde edilen sősansiyonlardan (Şekil 4.4) 0,1 ml alınarak izolasyon amaçlı kullanılan TSA besiyerinin üzerine yayma ekim yapıldı ve besiyerleri 37°C’de aerobik Őartlarda inkübasyona bırakıldı.

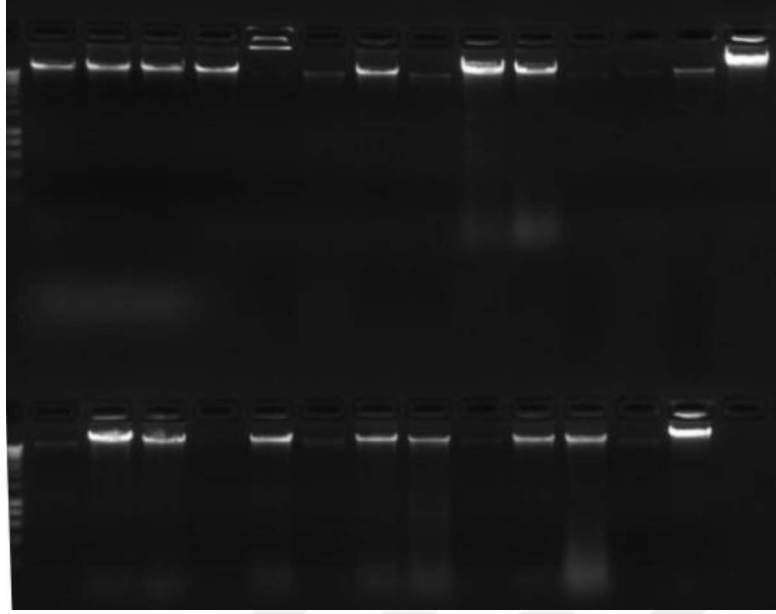


**Şekil 4.5.** Saf olarak bŸyŸtŸlen koloniler

24-48 saatlik inkŸbasyon periyodu sonunda petrilerde geliŐen koloniler mikroskopta incelenerek farklı olduğu dŸŐnŸlen koloniler alt kŸltŸre alınmak suretiyle saflaştırıldı (Şekil 4.5). İzolasyon alıŐmaları sırasında toplamda 106 adet bakteri kolonisi seçilerek saflaştırıldı.

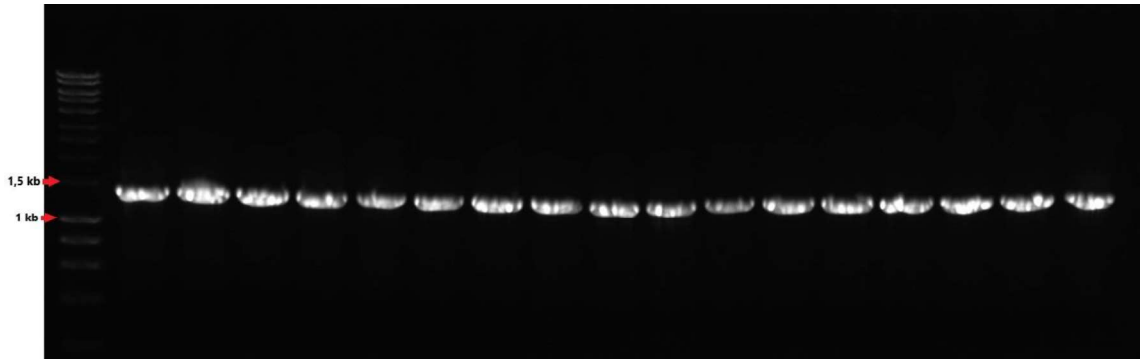
### **4.3. MolekŸler Tanı**

Saflaştırılan bakteriler TSB besiyerinde bir gece inkŸbasyona bırakıldıktan sonra ‘‘EcoSpin Bacterial DNA’’ kit ile Ÿretici firmanın talimatları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardında elde edilen genomik DNA’lar %1’lik agaroz jelde yŸrŸtŸlerek DNA’nın kontrolŸ sağlandı (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Agaroz jelde yürütülen genomik DNA'lar

Elde edilen gDNA'lardan 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması için 27F ve 1392R evrensel primerleri kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. Çoğaltılan 16S rRNA bölgesi kalite kontrolü için agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve ardından görüntüledi (Şekil 4.7).



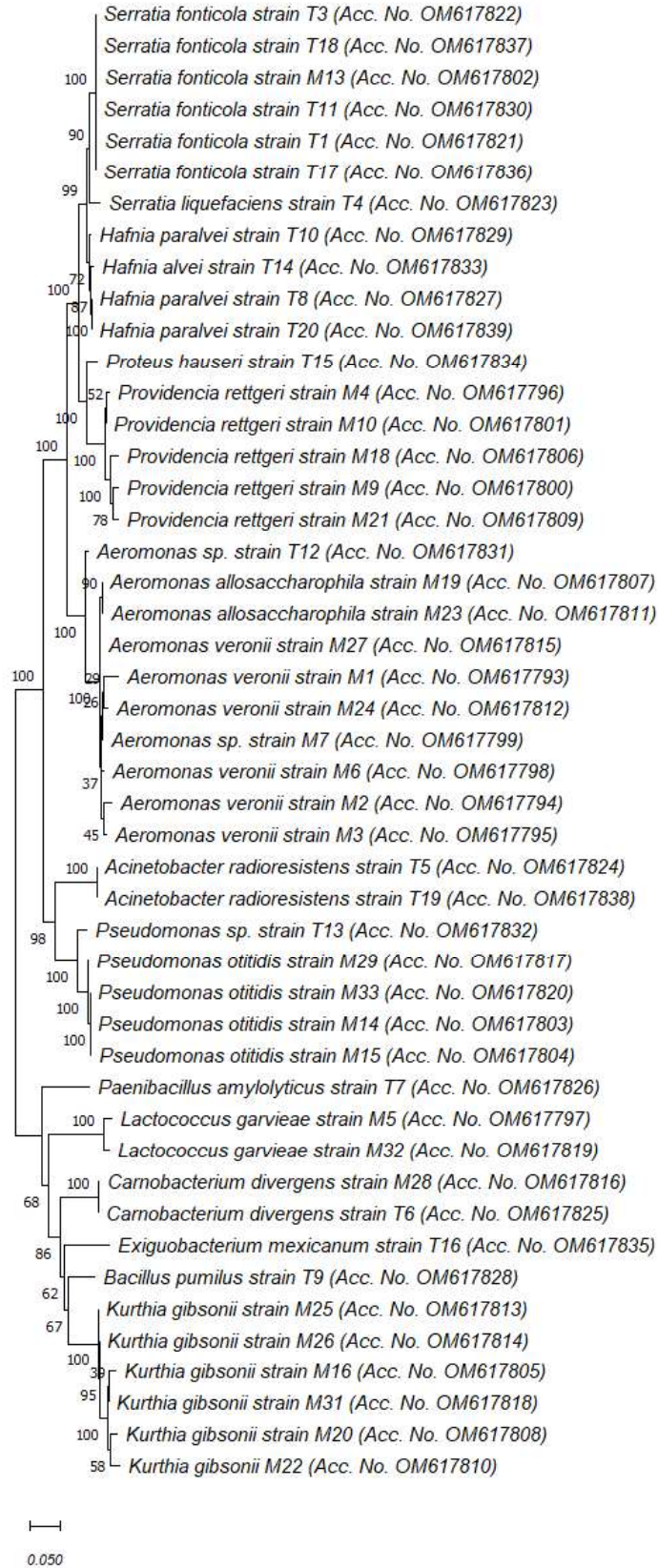
**Şekil 4.7.** PZR sonucu çoğaltılan yaklaşık 1365 baz çifti uzunluğundaki 16S rRNA bölgelerinin jel görüntüsü

Elde edilen PZR ürünlerinden tuzların, primerlerin ve polimeraz enziminin uzaklaştırılması için EcoPure PCR/Gel Purification Kit kullanılarak PZR ürünleri saflaştırıldı ve dizi analizine hazır hale getirildi. Elde edilen PZR ürünleri BM Labosis firması aracılığıyla her iki primer ile çift yönlü olarak okutuldu. Okuma sonrası diziler BioEdit programında birleştirilerek tek bir dizi haline getirildi. Ardından BLASTN+ programı aracılığıyla veri tabanında bulunan diğer türlerle karşılaştırıldı ve tanılamaları

gerçekleştirildi. Sekanslar GenBank'a yüklenerek eriŐim numaraları alındı (OM617793-OM617839).

Tanılanan türlere ait sekans verileri MEGA11 Versiyon 11.0.10 programı kullanılarak hizalandıktan sonra komŐuluk analizi yapılarak türlerin evrimsel iliŐkilerini ortaya çıkarmak için filogenetik ağaç oluŐturuldu. Bu bakterilerin birbirleri ile olan filogenetik ilişkileri Şekil 4.8'de; familya ve türlere göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir.





Şekil 4.8. Türlerin evrimsel ilişkileri (Bootstrap 1000)

**Çizelge 4.1:** Tanımlanan bakteri türlerinin böcek türlerine göre dağılımı

<b>Hydrophilidae</b>	<b>Bacteria</b>
<b><i>Dytiscus marginalis</i></b>	<i>Serratia liquefaciens</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Kurthia gibsonii</i>
<b><i>Graphoderus cinereus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
<b><i>Colymbetes fuscus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Kurthia gibsonii</i>
<b><i>Hygrotus saginatus</i></b>	<i>Carnobacterium divergens</i> <i>Serratia fonticola</i>
<b><i>Ilybius fuliginosus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Aeromonas rivuli</i> <i>Proteus hauseri</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Kurthia gibsonii</i> <i>Pseudomonas otitidis</i>
<b><i>Laccophilus minutus</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia fonticola</i>
<b><i>Agabus labiatus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Proteus hauseri</i>
<b><i>Agabus bipustulatus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Kurthia gibsonii</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
<b><i>Agabus biguttatus</i></b>	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Kurthia gibsonii</i> <i>Pseudomonas otitidis</i>
<b><i>Cybister lateralimarginalis</i></b>	<i>Aeromonas veronii</i> <i>Kurthia gibsonii</i> <i>Pseudomonas otitidis</i>

**Çizelge 4.1:** Tanımlanan bakteri türlerinin böcek türlerine göre dağılımı (devam)

<b>Dytiscidae</b>	<b>Bacteria</b>
<b><i>Berosus luridus</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia fonticola</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Paenibacillus amylolyticus</i> <i>Pseudomonas helmanticensis</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Kurthia gibsonii</i>
<b><i>Hydrochara dichroma</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Kurthia gibsonii</i>
<b><i>Laccobius syriacus</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Exiguobacterium mexicanum</i> <i>Aeromonas rivuli</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>Pseudomonas otitidis</i>
<b><i>Enochrus fuscipennis</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Aeromonas allosaccharophila</i>
<b><i>Hydrobius fuscipes</i></b>	<i>Serratia fonticola</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Aeromonas allosaccharophila</i>

#### 4.4. Türlerin Analizi

Dytiscidler geniş bir boyut aralığına sahiptir ve hem yetişkinler hem de larvalar suda yaşadığı için “gerçek su böcekleri” olarak kabul edilirler. Akarsu ortamlarından çok durgun su ortamlarında daha yaygın olmalarına rağmen hemen hemen tüm sucul habitat türlerinde bulunurlar. Akarsularda genellikle kenarlara yakın yavaş akan alanlarda bulunurlar. Bu böcekler göl kıyılarında, göletlerde, havuzlarda, barajlarda, sulak alanlarda, geçici akarsularda ve lagünlerde bol miktarda bulunur. Birkaç türün larva ve yetişkinleri yeraltı sularında, sızıntılarda bulunabilir ve aynı zamanda birkaç türü karasaldır. Dytiscidler pupa hariç tüm evrelerde suda yaşar. Pupa dönemi genellikle suya yakın yerlerde, ıslak topraklarda veya yeraltında larvaların oluşturduğu hücrelerde geçer. Yumurtadan yeni çıkan erginler suya dönerler ancak uçma yeteneğine de sahiptirler. Bu

da üremek için veya olumsuz koşullar altında kaldıklarında bir su kütesinden diğerine gitmelerine izin verir. Hem larvalar hem de yetişkinler avcı yırtıcıdır. Böcekler, kabuklular, sülükler, yumuşakçalar, iribaşlar ve küçük balıklarla beslenebilirler (Benetti et al. 2018).

Hydrophilidae familyası (su çöpçü böcekleri) yaklaşık 2500 bilinen türden oluşan Hydrophiloidea süper ailesinin en büyük grubudur. Genellikle durgun sularda yaşadığı bilinir ancak aynı zamanda akarsularda, nehirlerde ve sızıntı habitatlarında da yaşayabilirler. Sularda yaşayan türlerinin yanı sıra, hydrophilidae familyasında çoğunlukla yaprak döküntüleri ve diğer çürüyen organik madde türlerinde yaşayan karasal türleri de içerir. Palaearktik bölge içinde çoğu karasal türü, çeşitli otçul veya hepçil memelilerin dışkılarında yaşar. Sudaki türlerin çoğu Hydrophilinae alt familyasında bulunurken, karasal olanların çoğu ise Sphaeridiinae alt familyasında sınıflandırılır. Ancak her iki alt familyada da birçok istisna vardır. Yetişkin böcekler çoğunlukla çürükçül olup, farklı türde çürüyen organik maddelerle beslenirken, larvalar yırtıcıdır ve çeşitli omurgasızları avlar (Fikáček et al. 2010).

Tez çalışması sonucunda Hydrophilidae'ye ait toplam beş (*Berosus luridus*, *Hydrochara dichroma*, *Laccobius syriacus*, *Enochrus fuscipennis* ve *Hydrobius fuscipes*); Dytiscidae familyasına ait ise toplam on farklı tür (*Dytiscus marginalis*, *Graphoderus cinereus*, *Colymbetes fuscus*, *Hygrotus saginatus*, *Ilybius fuliginosus*, *Laccophilus minutus*, *Cybister lateralimarginalis*, *Agabus labiatus*, *A. biguttatus* ve *A. bipustulatus*) elde edildi.

Yapılan 16S rRNA analizlerine göre Hydrophilidae üyelerinden *Aeromonas veronii*, *Bacillus pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Proteus hauseri*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas otitidis*, *Serratia fonticola* ve *S. liquefaciens* olmak üzere 10 cinse ait toplam 11 farklı bakteri türüne; Dytiscidae üyelerinden ise *Acinetobacter radioresistens*, *Aeromonas allosaccharophila*, *A. veronii*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Providencia rettgeri* ve *Pseudomonas otitidis* olmak üzere 11 cinse ait 13 farklı türe rastlandı.

Canlı dünyasının tür çeşitliliği yönünden en geniş gruplarının başında gelen böceklerin; beslenme, metabolizma ve yaşam alanı yönünden büyük bir çeşitlilik göstermiş olması, bu organizmaların vücut florasından yeni tür ve yeni suşların izolasyon şansını yükseltmektedir. Ayrıca böcek mikroflorasının biliniyor olması onların bağırsak ekosistemleri, direnç mekanizmaları, çeşitli mikrobiyal saldırılardan etkilenme, beslenme fizyolojisi vb. konuların aydınlatılması konusunda önemli ipuçları vermektedir. Bu nedenlerle böcek bağırsağı ve diğer vücut bölümlerinin mikroflorası hakkındaki çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır (Husseneder et al. 2007; Behar et al. 2008).

Sucul böcekler dünyanın her yerinde göllerde, küçük birikintilerde ve hızlı akan suların sığ kesimlerinde bulunurlar. Su bitkileri, yosunlar ve bitkisel döküntüler ile beslenirler. Buldukları ortamlar genelde mikrobiyal floranın çok zengin olduğu bataklık kesimler olduğundan, sürekli patojen mikroorganizmalarla temas ederler. Ancak, geliştirdikleri çeşitli yöntemlerle bu sorunların üstesinden gelerek hayatta kalmayı başarırlar (Hansen 1991). Karasal böcekler ile yapılan çalışmalarda böceklerin bağırsaklarında birçok bakteri türünün yaşadığı tespit edilmiş olup, bu mikroorganizmaların böceklerin üreme, gelişme ve diğer birçok hayati öneme sahip olaylarının devam ettirilmesinde görev aldıkları belirtilmiştir. Hatta karasal böceklerde patojenlere karşı direnç mekanizmasında sadece böceklerin kendi üretmiş olduğu antimikrobiyal peptitlerin değil aynı zamanda bağırsak florasında bulunan bakterilerin üretmiş olduğu antimikrobiyal peptitlerinin de etkili olabileceği gösterilmiştir (Lehrer and Ganz, 1999). Bu çalışmalar sucul böcek bağırsak mikrobiyomlarının antimikrobiyal bileşikler açısından taranması gerekliliğini açıkça vurgulamaktadır.

Böcek bağırsağından izole edilen bakteriler, yukarıda bahsedildiği üzere böceklerin habitatındaki başarısı ve adaptasyon becerileri ve beslenme davranışları gibi konuların açıklığa kavuşturulmasının yanında biyoteknolojik uygulamalar açısından da büyük önem arz etmektedir. Özellikle bağırsak habitatına adapte olmuş bu suşlar birçok endüstriyel uygulamada avantaj sağlayabilir. Bu nedenlerle tez çalışmasında izole edilen türlerin böcekler ile ilişkilerinin yanında biyoteknolojide kullanım alanlarından da literatürde bulunan bilgiler ışığında bahsedilmiş ve bu özelliklerinin böceklerin bağırsaklarında bulunmaları ile ilişkileri tartışılmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalarda karasal böceklerin bağırsaklarında *Aeromonas*, *Chrysobacterium*, *Asaia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Proteus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Micrococcus* ve *Serratia* gibi birçok değişik bakterinin yaşadığı belirtilmiştir (Dillon and Dillon 2004; Minard et al. 2013). Araştırmacılar tarafından bu mikroorganizmaların böceklerin gelişiminde, üremesinde, sindirim (lignoselüloz ve nişasta yıkımında) sürecinde, metanogenez ve azot fiksasyonu olaylarında ve düşük redoks potansiyelinin devam ettirilmesinde görev aldıkları belirtilmiştir. Bunun yanında sucul böceklerin bağırsak mikrobiyomunun ortaya çıkarılmasına ve bu mikrobiyom üyelerinin böceklerin yaşamsal faaliyetlerine etkisi üzerine olan çalışma sayısı sınırlıdır.

Enterobacteriaceae (*Serratia*, *Hafnia* ve *Klebsiella* gibi) üyelerinin, böceklerin bağırsak mikroflorasında baskın bir grup olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. *Serratia* cinsi, böceklerden sıklıkla izole edilmiştir ve böceklerin farklı evrelerinde demir alımına önemli katkılar yaptığı gösterilmiştir (Indiragandhi et al. 2007); başka bir çalışmada ise *Melolontha melolontha* larvalarının orta bağırsağından izole edilmiş olup; antibakteriyel özellikleri bakımından incelenmiştir (Skowronek et al. 2020). *S. fonticola*'nın quorum algılama için kullandığı sinyal moleküllerinin etkisiyle bitki büyümesine teşvik edici özelliği olup; biyogübrelerin üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir (Jung et al. 2020). *S. liquefaciens*'in kitinaz, lignin peroksidaz, lipaz ve proteaz üreticisi olduğu ve enzimlerinin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğu belirtilmektedir (Joshi et al.1989; Bagliniere et al. 2017; Salgado et al. 2020). Ayrıca *S. liquefaciens*'in *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogene* ve *Yersinia enterocolitica* gibi gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin inhibitörü olarak kullanılan heliotropini yüksek verimde ürettiği bildirilmiştir (Zhao et al. 2017; Haq et al. 2016). Bunun yanında *Serratia* üyeleri patojende olabilir, çöl çekirgesi *Schistocerca gregaria* ile yapılan deneylerde, bağırsak topluluğunun çeşitliliği ile *Serratia marcescens*'in kolonizasyon başarısı arasında ters bir ilişki gözlemlenmiştir. Bu sonuç, tür açısından zengin bağırsak topluluklarına sahip böceklerin patojen istilasına karşı daha dirençli olduğu teorisini desteklemektedir (Dillon et al. 2005). Bu bilgiler ışığında bağırsak florasından sıklıkla izole edilen *Serratia* türlerinin demir alımının yanı sıra sahip olduğu enzim aktiviteleri ile de sucul böceklerin beslenme davranışlarıyla ilişkili olduğu ve sindirime yardımcı olduğu söylenebilir.

Böcek bağırsağından izole edilen *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinin de farklı enzim aktivitelerinde rol oynadığı gösterilmiştir. *A. radioresistens* önemli bir lipaz üreticisi olup (Wang and Chen 1998; Li et al. 2001); fenolik bileşiklerin yıkımını gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur (Liu et al. 2020). Ayrıca yüksek moleküler ağırlığa sahip bir polisakkarit ve protein kompleksi olan biyoemülgatör üretiminde de kullanılmaktadır. Biyoemülgatörlerin potansiyel ticari uygulamaları arasında petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyolojik olarak iyileştirilmesi, deterjan endüstrisi, herbisit ve pestisit formülasyonları, gıda ve kozmetik endüstrileri için stabil yağ-su emülsiyonlarının yapımı yer almaktadır (Toren et al. 2001). *P. otitidis*'in ürik asidi daha çözünür bir forma oksitleyen ürikaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Lee et al. 2015). *P. otitidis* sentetik asitlerin ve asidojenik atıkların substrat olarak kullanıldığı üretim koşullarında yenilenebilir kaynaklardan üretilen, biyolojik olarak parçalanabilir, saf, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve ticari değere sahip plastikler olarak bilinen polihidroksialkanoatları üretme yeteneği göstermektedir (Reddy et al. 2012). Yapılan başka bir çalışmada *P. otitidis*'den glutaminaz aktivitesi olmayan bir asparaginaz karakterize edilmiş ve saflaştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda saflaştırılmış asparaginazın antikanser aktivitesinin, ticari olarak satılan ve *E. coli*'de üretilen asparaginaz ile aynı veya daha yüksek düzeyde olduğu göstermiştir (Husain et al. 2016). Aynı zamanda bu bakterinin tek karbon ve enerji kaynağı olarak zearalenone kullanma kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiş olup, zearalenone tarafından kontamine edilmiş gıda ve yemleri detoksifiye etmek amacıyla kullanılabilmesi vurgulanmıştır. (Tan et al. 2015). Benzer bir şekilde boyama endüstrisinin atık su arıtma tesisinden elde edilen aktif çamurdan izole edilen bir *P. otitidis* yüksek boya konsantrasyonlarında hem çalkalamalı biyoreaktörlerde hem de statik koşullar altında birkaç trifenilmetan boyasına karşı dikkate değer bir renk giderme aktivitesi göstermiştir (Wu et al. 2009). *K. gibsonii*'de ürettiği lipopeptit yapılı biosurfaktan sayesinde biyoremediasyon amacıyla tekstil boyalarının gideriminde kullanılmıştır (Nor et al. 2021). *P. hauseri*'nin tekstil atık sularındaki boyaların giderimi ve ağır metallerin biyoremediasyonunda kullanılabilmesi gösterilmiştir (Ng et al. 2017).

Yukarıda bahsedilen ve çoğunlukla biyoremediasyon uygulamalarını içeren örneklerin yanı sıra *P. otitidis*'in antimikrobiyal özelliklerine dair literatürde yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. 2015 yılında yapılan bu çalışmada çekirge bağırsağından izole

edilen *P. otitidis*'in kültür filtratlarının *Candida albicans* ve *Escherichia coli*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak kültür filtratındaki bu aktif bileşen açıklığa kavuşturulmamıştır (Chellaram and Praveen 2015).

*A. veronii*, insan ve balıklarda patojen olup; tetrasiklin ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (Skwor et al. 2014). Ayrıca bu organizma biyoteknolojik uygulamalarda kitinaz ve alfa amilaz enzimlerinin üreticisi olarak değerlendirilmektedir (Samie et al. 2012; Zhang et al. 2014).

*B. pumilus* üzerindeki biyoteknolojik uygulamalar çok fazla olup birçok enzimin üretiminde kullanılmıştır. Meyve suyu üretiminde kullanımı için yeni bir pektin liyaz üretimi (Nadaroğlu et al. 2010), bitki büyüme faktörü olarak glikolipit yapıdaki bir biyosümfaktan üretimi (Marchut-Mikołajczyk et al. 2021) ve geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil bir şekilde çalışan ksilanaz ve poligalakturonaz üretimi (Geetha and Gunasekaran 2010) bu uygulamalara örnek gösterilebilir. Ayrıca *B. pumilus*'da birçok patojene karşı antimikrobiyal etkiye sahip üç adet bileşik bulunduğu 2019 yılında yapılan bir araştırmayla ortaya konulmuştur (Chu et al. 2019). Antimikrobiyal aktivitesi ile tanınan ve bu çalışmada izole edilen diğer bir bakteri ise *C. divergens*'dir. Bu bakteri antimikrobiyal peptit olan divercin üreticisi olup; gıdaların korunmasında diğer bakterilerin üremesini engelleme amacıyla kullanılmaktadır (Rihakova et al. 2009).

*E. mexicanum* ürettiği kromat redüktaz enzimiyle toksik kromun azaltılmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Das et al. 2021). Bir diğer çalışmada ise atık tuzlu sularda yaşayan *E. mexicanum*'un halofilik bir suşunun sudaki nitrojen kaynaklı kirliliklerin uzaklaştırılmasında önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Cui et al. 2021). Yapılan bir başka çalışmada ise *E. mexicanum*'un ürettiği dört bileşiğin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiş ve ikisinin *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia* ve *Salmonella enterica* gibi mikrobiyal patojenlere karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Shanthakumar et al. 2015).

*L. garvieae*, balıklarda patojen olan bir bakteri türü olup (Meyburgh et al. 2017); bir bakteriyosin olan garvicin A'nın üreticisidir (Maldonado-Barragán et al. 2013).

Bununla birlikte *L. garvieae*'nin ferrik demir, nitrat ve fumaratı indirgediği gösterilmiştir (Yun et al. 2007).

*P. amylolyticus*'un iyi bir amilaz üreticisi olduğu iki araştırma üzerinde gösterilmiştir. Bunlardan biri tarımsal yan ürünlerin ısıya dayanıklı alfa amilaz üretimi için kullanıldığı bir çalışmadır. *P. amylolyticus* 'un katı hal fermantasyonunda maksimum alfa amilaz üretimi için optimum koşullar belirlenmiş ve üretim miktarları gösterilmiştir (Ikram-ul-haq et al. 2012). Diğer bir çalışmada ise fermantör koşulları altında *P. amylolyticus* 'dan hücre dışına salgılanabilen bir glukoamilaz üretilmiştir. Bu enzimin biyoyakıt üretimi için gerekli özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Lincoln et al. 2019). Başka bir çalışmada ise *P. amylolyticus*'un pektinaz üretimi için endüstriyel açıdan değerli bir kaynak olduğu belirtilmiştir (Keggi and Doran-Peterson 2020). Ayrıca *P. amylolyticus*'tan elde edilen dipikolinik asit, hem gram pozitif hem de gram negatif patojenlere karşı ticari dipikolinik asitler ile karşılaştırıldığında dikkate değer aktivite göstermiştir (Anandan and Vittal 2019).

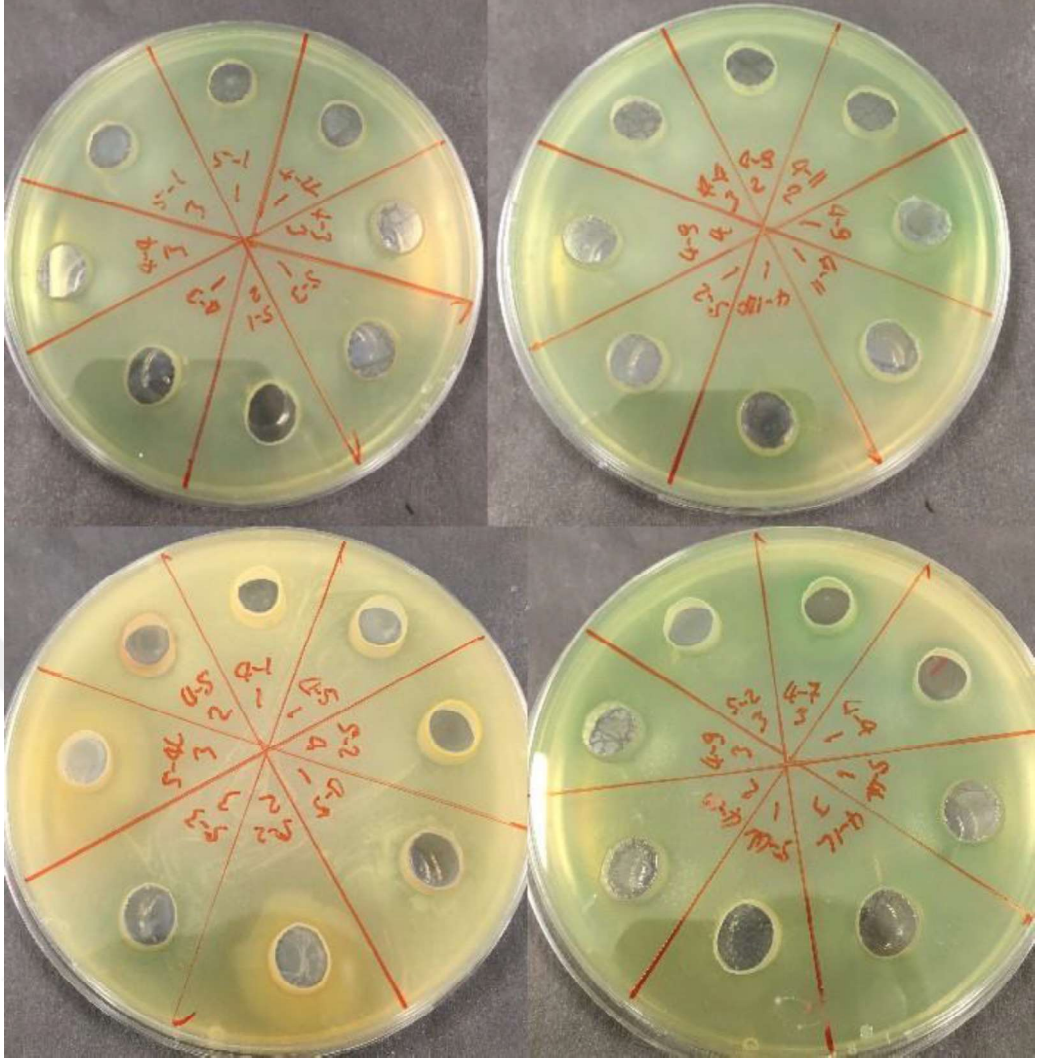
*Providencia rettgeri* atıklarla beslenen ve hayvan yemi olarak kullanılan *Hermetia illucens* larvalarının bağırsaklarından kültüre bağlı yöntemlerle izole edilmiştir (Shumo et al. 2021). *P. rettgeri*'nin bir herbisit olan glifosatu yaklaşık %71,4 oranında bozundurabildiği ve aminometilfosfonik aside dönüştürdüğü gösterilmiştir (Xu et al. 2019). Bunun yanında tekstilde kullanılan azo boya ları tek başına kısmen parçalayabilmektedir (Shi et al. 2021). *P. rettgeri* bazı nematodların bağırsağında simbiyotik olarak yaşayabilen bir bakteridir. Bu bakteri-nematod ilişkisi zararlı böcekler için öldürücü olabilir. Bu sebeple zirai zararlı böceklerle mücadelede kullanılabileceği gösterilmiştir (Jackson et al. 1995).

Bu çalışmada izole edilen tüm bakteriler su, toprak ve havada geniş çapta yayılmıştır. Bağırsak florası çevredeki ortamdan etkilendiği için böceklerin bağırsak florasında da bulunabilirler. Kaldı ki özellikle intestinal sistemin baş ve son kısımlarının açık istemler olması dış ortamın flora üzerine etkisini açıklığa kavuşturmuştur (Engel and Moran 2013). Buna paralel olarak, çoğu böcek bağırsağının, memeli bağırsaklarına kıyasla nispeten az sayıda ancak özelleşmiş bakterilerden oluşan büyük bağırsak topluluklarını barındırdığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Baskın olmayan

diğer türler ise, ortamlarında yaygın olan bakteriler tarafından yalnızca fırsatçı ve seyrek olarak kolonize edilebilir (Engel and Moran 2013). Ayrıca bazıları bağırsak florasında böceklerle simbiyotik ya da parazitik ilişki içerisinde olabilir. Bunun yanında gelişim aşaması, diyet türü, konak taksonomisi, çevre ve sosyal etkileşimler, böcek bağırsağındaki mikrobiyal toplulukların bileşimini ve çeşitliliğini etkileyen önemli faktörlerdir (Suárez-Moo et al. 2020). Böceklerin bağırsağında bulunan mikroorganizmalar besin açısından fakir gıdaları dönüştürerek konakçının faydalanabileceği besinleri üretir, katabolizması zor gıda bileşenlerinin sindirilmesine yardımcı olur, konakçıyı parazitlerden ve patojenlerden korur, böceğin diğer böceklerle iletişim kurmasında katkıda bulunur, çiftleşme ve üreme sistemlerini yönetir (Engel and Moran 2013). Yukarıda bahsi geçen bilgilerin çoğunluğu karasal böceklerden elde edilen verilerdir. Sucul böceklerde değişken beslenme koşullarının ve farklı habitatların bağırsak mikrobiyomunu etkilediği (Receveur et al. 2020) bilinmesine rağmen; birkaç istisna dışında çoğu sucul böcek türünün mikrobiyal kolonizasyonu çalışılmamıştır ve kalıcı bir topluluğa sahip olup olmadıkları bilinmemektedir. Bu ve benzeri çalışmalardan elde edilen izolasyon verileri daha fazla sucul böcek türünü, gelişim evresini ve farklı mevsimsel sonuçları kapsadıkça kalıcı floranın üyeleri daha doğru bir şekilde ortaya konulabilecektir.

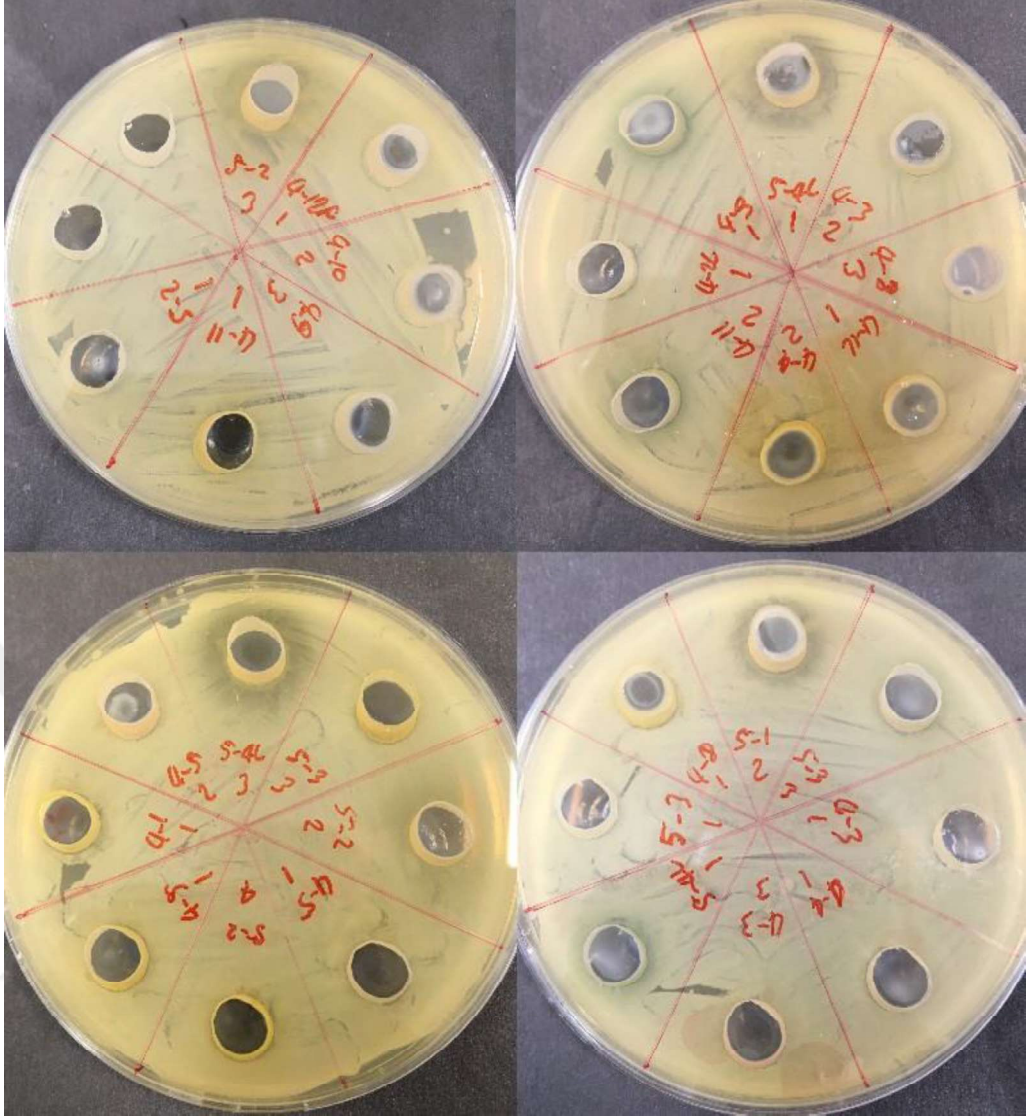
#### 4.5. Antibakteriyel Aktivite Gösteren İzolatların Ön Seleksiyonu

İzolatlara ait kültür filtratları, patojen türler kullanılarak yayma plak yöntemi ile hazırlanan soft MHA besiyeri içeren petrilere 6 mm'lik açılan kuyulara 200 µl olacak şekilde eklenmiştir. Petrilere 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonları ölçülüp, ardından zon oluşturan kültür filtratları belirlenmiştir. Sonuçta denemeye alınan türlerden hiçbiri *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı zon vermemiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Ön seleksiyon denemelerinde kültür filtratları kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı yapılan well difüzyon deneyi.

Diğer taraftan *Staphylococcus aureus*'a karşı yalnızca 5 adet izolat (5-1.2, 5-2.2, 5-4L3, 5-4L.4b,5-2.3) pozitif sonuç vermiş olup (Şekil 4.10); elde edilen zonun protein kaynaklı olup olmadığını anlaşılması için pozitif zon veren filtratlar proteazla muamele edilerek zonun varlığını sürdürüp sürdürmediğinin belirlenmesi için bir sonraki deneye alınmıştır.

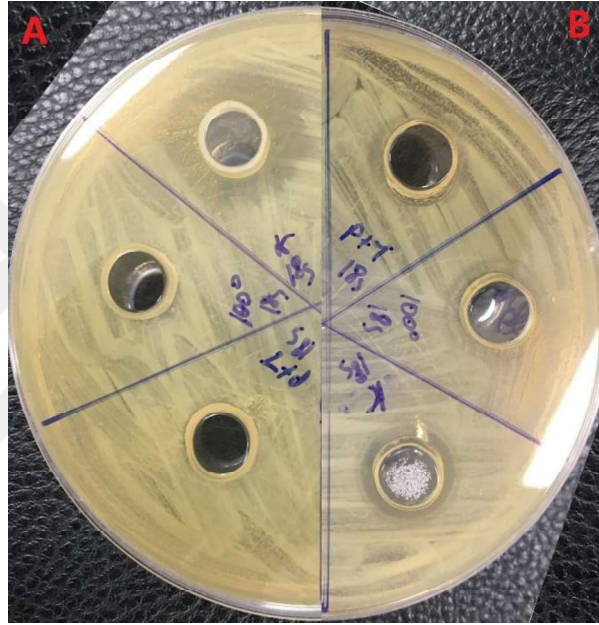


**Şekil 4.10.** Ön seleksiyon denemelerinde kültür filtratları kullanılarak *Staphylococcus aureus*'a karşı yapılan well difüzyon deneyi.

İzole edilerek saflaştırılan bakteriler arasında *S. liquefaciens* (Haq et al. 2016), *B. pumilus* (Chu et al. 2019), *C. divergens* (Rihakova et al. 2009), *E. mexicanum* (Shanthakumar et al. 2015) ve *L. garvieae* (Maldonado-Barragán et al. 2013) olmak üzere 5 bakterinin daha önceden farklı organizmalara karşı antibakteriyel etki gösterdiği bilinmektedir. İlginç bir şekilde bu bakteri türlerine ait izolatların hiçbiri ön seleksiyon çalışmalarında zon oluşumuna neden olmamıştır.

##### 4.6. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi

Bir önceki basamakta oluşan zonların protein kaynaklı olup olmadıklarını anlamak için 5 izolata ait kültür filtratları 37°C'de 6 saat tripsin/proteinaz K enzimleri ile inkübasyona maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kültür filtratlarının oluşturduğu zonlar agar difüzyon testi ile belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, kültür filtratının pozitif zon vermesi, proteazlarla muamele edilen kültür filtratlarının ise zon vermemesi, aktivitenin protein kaynaklı olduğu sonucunu doğrulamaktadır (Dusane et al. 2013).



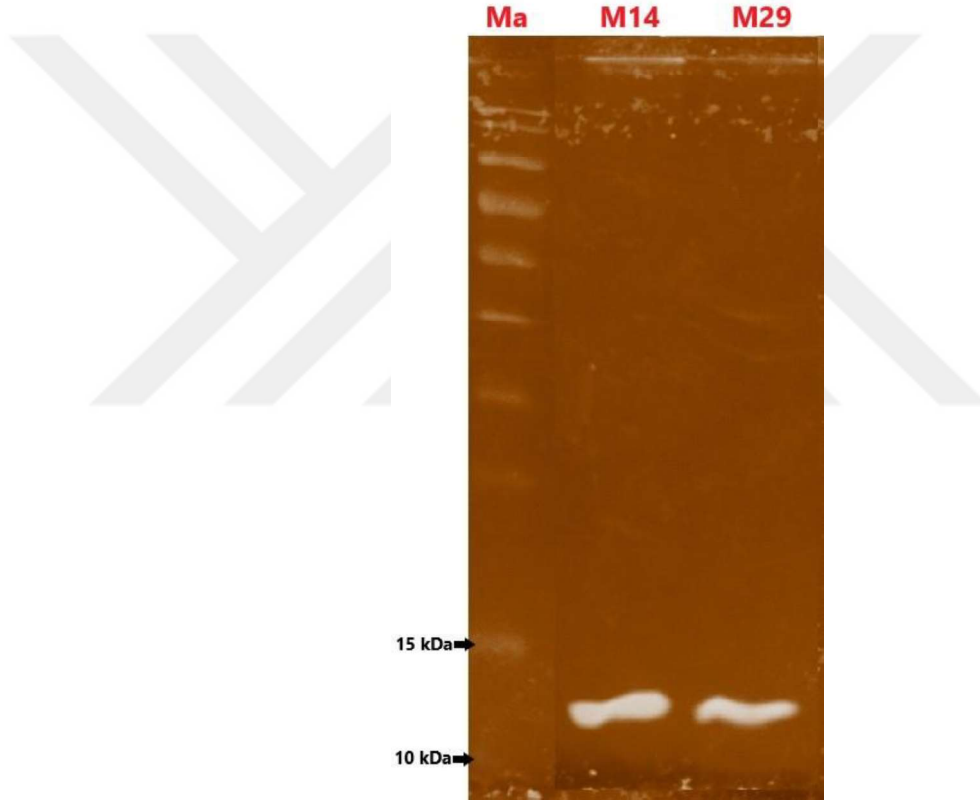
**Şekil 4.11.** Tripsin/ Proteinaz K uygulaması sonucu elde edilen zonlar. A. 5-1.2=M14 kodlu örnek. B. 5-2.2=M29 kodlu örnek.

Şekil 4.11 incelendiğinde M29 kodlu *P. otitidis* bakterisine ait kültür filtratının enzim muamelesi sonucunda zon vermediği görülmektedir. Bunun yanında kültür filtratının enzimsiz 100°C'de muamelesi ile azda olsa zon verdiği görülmekte olup aktivitenin peptit kaynaklı olduğunu göstermektedir. Diğer yandan M14 kodlu *P. otitidis* bakterisine ait kültür filtratının ise enzim muamelesi sonucunda zon vermediği görülmektedir. Ancak kültür filtratının enzimsiz 100°C'de muamelesi ile de zon oluşumu gözlenmemiştir. Kültür filtratlarının enzimsiz 100°C'de muamelesine, proteaz uygulamasında da proteazların inhibisyonu için 100°C'de muamele edilmesinden dolayı gerek duyulmuştur. Sonuç olarak bu durum aktivitenin peptit kaynaklı olmadığını ya da aktif peptidin ısıya duyarlı olmasından dolayı bu metot ile ayırım yapılamayacağını

göstermektedir. Bu nedenle ikinci bir doğrulamaya ihtiyaç olduğundan bu iki bakteri bir sonraki deney için seçilmiştir.

#### 4.7. SDS PAGE

Bir önceki basamakta seçilen ve antibakteriyel etkinin peptitlerden kaynaklandığı düşünölen M14 ve M29 kodlu *P. otitidis* izolatlarına ait költür filtratları proteinin varlığını ve boyutunu ortaya çıkarmak amacıyla %15'lik jelde yürütöldü. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, gümüş boyama ile boyandı ve fotoğraflandı (Şekil 4.12).

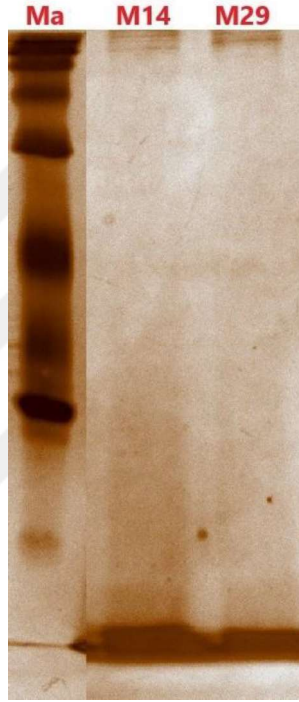


**Şekil 4.12.** Költür filtratlarının SDS PAGE sonucu ve gümüş boyama göröntüleri

SDS PAGE göröntüsü incelendiğinde her iki izolatta yaklaşık 12 kDa boyutlarında bant vermiŐtir. Jelde göröntölenen bantların antibakteriyel aktiviteden sorumlu olup olmadıklarını araŐtırmak için bir sonraki aşamaya geçilmiŐtir.

##### 4.8. NATİVE PAGE ve Jel Kapatma Testi

Bir önceki basamakta moleküler kütleleri belirlenen proteinlerin aktivitelerinin araştırılması için denatüre olmadan yürütüldükleri ve aktivite kaybına uğramadıkları Native PAGE yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla her iki izolata ait kültür filtratları jele iki tekrarlı olarak yüklenmiş ve 150 V'ta 1 saat yürütüldükten sonra jel kasetten alınarak iki parçaya ayrılmış ve jelin bir yarısı gümüş boyama ile boyanarak görüntülenmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** Kùltür filtratlarının Native PAGE sonucu ve gümüş boyama görüntüleri

Jelin diğer yarısı ise hangi protein bandının antimikrobiyal etkiden sorumlu olduğunu belirlemek için yayma ekim yöntemi ile hazırlanmış soft MHA besiyeri üzerine alınmıştır. 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra yalnızca M29 kodlu izolata ait protein bandının olduğu bölgede zon oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14:** Kültür filtratlarının Native PAGE görüntüsü ve jel kapatma test sonucu

Ancak hem SDS PAGE hem de Native PAGE jellerinde M29 kodlu izolat ile aynı boyutlarda ve yaklaşık aynı bant kalınlığında görülmesine rağmen; M14 kodlu izolata ait protein zon oluşumuna neden olmadı. 4.5 numaralı başlıkta bahsedildiği üzere tez çalışmasında izole edilerek saflaştırılan türlerden 5 tanesinin daha önceden antibakteriyel bileşenler salgıladığı bilinmektedir. Hatta bunlardan Divercin ve Garvicin peptit yapısında olduğu bilinen bakteriosinlerdir. Bu çalışmada bahsi geçen türlere ya da peptitlere ait pozitif bir sonuç alınmamıştır. Bu negatif sonuçların nedeni, bahsi geçen çalışmalar ile sunulan tez çalışması arasında test organizmalarının farklılığı olabilir. Diğer taraftan tez çalışmasının ön seleksiyon aşamasında pozitif sonuç veren örneklerin tamamının *P. otitidis* olduğu anlaşılmıştır. Bu türler tripsin/proteinaz K yöntemi ile elenmiş ve iki tür peptit kaynaklı antibakteriyel aktivite açısından ön plana çıkarılmıştır. Ardından yapılan Native-PAGE analizi ile yalnızca tek bir izolattan (M29) pozitif sonuç alınmıştır. Bu izolat *Agabus bipustulatus*'tan elde edilmiş olup; jel elektroforezinde aynı protein bandlarına sahip aynı türün diğer izolatlarından aktivite açısından önemli bir şekilde ayrılmıştır. Bu sonuç aynı zamanda farklı habitatlardan ve/veya kaynaklardan izolasyon çalışmalarının sürdürülmesi gerekliliğini vurgular niteliktedir. Literatürde *P. otitidis*'e ait yalnızca bir adet antibakteriyel etkinlik çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmada *P. otitidis*'in *E. coli* ve *C. albicans* üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğu

belirlenmiştir (Chellaram and Praveen 2015). Ancak etken maddenin protein olup olmadığı açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu nedenle *P. otitidis*'e ait antibakteriyel peptit ilk defa bu tez çalışmasında *Agabus bipustulatus*'tan izole edilmiş M29 kodlu (GenBank EriŐim Numarası OM617817) izolat ile ortaya konulmuştur.



### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karasal böceklerle yapılan çalışmalar bağırsak floralarında bulunan bakterilerin zengin AMP kaynakları olduğunu göstermektedir. Hatta böceklerin patojenlere karşı savunma mekanizmalarında, bağırsak florasında bulunan bakterilerin ürettiği AMP'lerin de etkili olabileceği gösterilmiştir. Yeni AMP'lerin keşfi amacıyla yukarıda bahsedilen nedenlerden ötürü özellikle karasal böceklerin bağırsak florasına ait birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen; sucül böcekler ile yapılan çalışmalar izolasyon ve karakterizasyonla sınırlı kalmış (Sazama et al. 2017); bu bakterilerin antimikrobiyal peptit üretme yetenekleri hiçbir çalışmada gösterilmemiştir. Bu nedenlerle tez çalışmasında yeni AMP'lerin keşfi için, daha önce değerlendirilmemiş ve önemli bir kaynak olarak görülen sucül böceklerin bağırsak florasının araştırılması ve antibakteriyel peptit üretici izolatların belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, Hydrophilidae'ye ait toplam beş farklı türden (*Berosus luridus*, *Hydrochara dichroma*, *Laccobius syriacus*, *Enochrus fuscipennis* ve *Hydrobius fuscipes*) *Aeromonas veronii*, *Bacillus pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Proteus hauseri*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas otitidis*, *Serratia fonticola* ve *S. liquefaciens*'e ait 11 farklı bakteri türü; Dytiscidae familyasına ait toplam on farklı türden (*Dytiscus marginalis*, *Graphoderus cinereus*, *Colymbetes fuscus*, *Hygrotus saginatus*, *Ilybius fuliginosus*, *Laccophilus minutus*, *Cybister lateralimarginalis*, *Agabus labiatus*, *A. biguttatus* ve *A. bipustulatus*) *Acinetobacter radioresistens*, *Aeromonas sp.*, *A.allosaccharophila*, *A.veronii*, *B.pumilus*, *Carnobacterium divergens*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Hafnia paralvei*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus garvieae*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Providencia rettgeri* ve *P.otitidis* olmak üzere 13 farklı bakteri türü elde edildi.

Bu bakterilerin kültür filtratları, antibakteriyel protein üretme kabiliyeti açısından tarandı ve *P. otitidis* M29 kodlu izolatının well difüzyon, tripsin/proteinaz K parçalama ve Native-PAGE yöntemleri ile *Staphylococcus aureus*'a (ATCC 25923) karşı yaklaşık 12kDa boyutlarında bir AMP'nin üreticisi olduğu bulundu.

*Agabus bipustulatus*'tan lokal olarak izole edilen *P. otitidis*'in, *S. aureus*'a (ATCC 25923) karşı AMP üreticisi olduğu bu tez çalışmasında ilk defa gösterildi. Bu AMP, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde özellikle *S.aureus*'a karşı mücadelede kullanım potansiyeli taşımakta olup; sentetik peptitlerin üretiminde de kalıp olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilir. İleride yapılacak çalışmalarla bu proteinin kütle parmak izi analizleri ya da Edman yıkımı yöntemi ile amino asit dizisi çıkarılarak literatürde bulunan diziler ile karşılaştırılmalıdır. Ayrıca bu çalışmada izole edilerek tanımlanan flora üyeleri biyoteknolojik proseslerde çeşitli enzim, organik asit ve/veya karbonhidratların üretiminde kaynak olarak değerlendirilebilir.



## KAYNAKLAR

- Adrio, J. L. ve Demain, A. L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.
- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R. 2012. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35, 9-21.
- Akbar, N., Siddiqui, R., Iqbal, M., Sagathevan, K., Khan, N. A. 2018. Gut bacteria of cockroaches are a potential source of antibacterial compound(s). *Letters in Applied Microbiology*, 66(5), 416-426.
- Aktümsek, A., Ünsal, S., Kalyoncu, L. 2009. Genel Zooloji Ders Kitabı. Nobel Yayın Dağıtım, 336, İstanbul.
- Anand, A. P., Vennison, J. S., Sankar, G. S., Prabhu, I. G., Vasan, T. P., Raghuraman, T., Vendan, E. S. 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10, 107.
- Anandan, K., ve Vittal, R. R. 2019. Endophytic *Paenibacillus amylolyticus* KMCLE06 extracted dipicolinic acid as antibacterial agent derived via dipicolinic acid synthetase gene. *Current Microbiology*, 76, 178–186.
- Ateyyat, M. A., Shatnawi, M., Al-mazra'awi, M. 2010. Isolation and identification of culturable forms of bacteria from the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) in Jordan. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34, 225-234.
- Ayayee, P. A., Larsen, T., Rosa, C., Felton, G. W., Ferry, J. G., Hoover, K. 2016. Essential amino acid supplementation by gut microbes of a wood-feeding cerambycid. *Environmental Entomology*, 45, 66-73.
- Bagliniere, F., Salgado, R. L., Salgado, C. A., Vanetti, M. C. 2017. Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk. *Journal of Food Science*, 82(4), 952-959.
- Bajya, D. R., Arya, D., Ranjith, M., Lakharan, M. C., Raza, S. K. 2015. Isolation and identification of cellulose demoting symbionts from gut of subterranean termite, *Odontotermes obesus*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(7), 970-972.
- Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E. 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *Journal of Insect Physiology*, 54(9), 1377-1383.

- Bektaş, M., Orhan, F., Baris, O. 2021a. A new approach and a model study in floating island microbial biodiversity and endosymbionts on digestive structure of an aquatic insect. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 13250-13263.
- Bektaş, M., Orhan, F., Erman, Ö. K., Barış, Ö. 2021b. Bacterial microbiota on digestive structure of *Cybister lateralimarginalis* torquatus (Fischer von Waldheim, 1829) (Dytiscidae: Coleoptera). *Archives of Microbiology*, 203, 635–641.
- Bemena, L. D., Mohamed, L. A., Fernandes, A. M., Lee, B. H. 2014. Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 924-949.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetic and Molecular Biology*, 35(4), 1044–1051.
- Benemann, J. R. 1973. Nitrogen Fixation in Termites. *Science*, 181, 164-165.
- Benetti, C. J., Michat, M. C., Ferreira, N., Braga, R. B., Megna, Y. S., Toledo, M. 2018. Keys to Neotropical Hexapoda. In: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Hamada, N., Thorp, J. H., Rogers, C. D. (eds). Academic Press, 539-560, United States of America.
- Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4, 430–435.
- Basset Y., C. L. 2012. Arthropod diversity in a tropical forest. *Science*, 338, 1481-1484.
- Birkle, L. M., Minto, L. B., Douglas, A. E. 2002. Relating genotype and phenotype for tryptophan synthesis in an aphid–bacterial symbiosis. *Physiological Entomology*, 27, 302-306.
- Brennan, Y., Callen, W. N., Christoffersen, L., Dupree, P., Goubet, F., Healey, S., Steer, B. A. 2004. Unusual Microbial Xylanases from Insect Guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 609–3617.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., Handelsman, J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 293–300.
- Callegari, M., Jucke, C., Fusi, M., Leonardi, M. G., Daffonchio, D., Borin, S., Crotti, E. 2020. Hydrolytic profile of the culturable gut bacterial community associated with *Hermetia illucens*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1965.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370.
- Challinor, V. L., Bode, H. B. 2015. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Science*, 1354, 82-97.

- Chapman, A. 2005. Numbers of living species in Australia and the world 1 st edn. Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*, 160, 75-81.
- Chellaram, C. ve Praveen, M. M. 2015. Molecular characterization of antagonistic bacteria, *Pseudomonas otitidis* from insect gut, short horned grasshopper. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(3), 2391-2395.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23-28.
- Chu, J., Wang, Y., Zhao, B., Zhang, X.-M., Liu, K., Mao, L., Kalamiyets, E. 2019. Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8375–8381.
- Cui, Y., Cui, Y.-W., Huang, J.-L. 2021. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Bioresource Technology*, 333, 125189.
- Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., Castagnar, A. P. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5, 15.
- Dar, M. A., Dhole, N. P., Xie, R., Pawar, K. D., Ullah, K., Rahi, P., Sun, J. 2021a. Valorization potential of a novel bacterial strain, *Bacillus altitudinis* RSP75, towards lignocellulose bioconversion: An assessment of symbiotic bacteria from the stored grain pest, *Tribolium castaneum*. *Microorganisms*, 9, 1952.
- Dar, M. A., Shaikh, A. F., Pawar, K. D., Xie, R., Sun, J., Kandasamy, S., Pandit, R. S. 2021b. Evaluation of cellulose degrading bacteria isolated from the gut-system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their potential values in biomass conversion. *PeerJ*, 9, e11254.
- Dar, M. A., Shaikh, A. A., Pawar, K. D., Pandita, R. S. 2018. Exploring the gut of *Helicoverpa armigera* for cellulose degrading bacteria and evaluation of a potential strain for lignocellulosic biomass deconstruction. *Process Biochemistry*, 73, 142–153.
- Das, S., Behera, B. C., Mohapatra, R. K., Pradhan, B., Sudarshan, M., Chakraborty, A., Thatoi, H. 2021. Reduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium mexicanum* isolated from chromite mines soil. *Chemosphere*, 282, 131135.
- Demnerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranova, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Macek, T. 2005. Two approaches to biological decontamination of

- groundwater and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations. *International Microbiology*, 8, 205-211.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Charnley, A. K. 2002a. A Note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 759-763.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., Charnley, A. K. 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8, 1291–1298.
- Dillon, R. ve Charnley, K. 2002b. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 153, 503–509.
- Dillon, R. ve Dillon, V. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews*, 49, 71–92.
- Douglas, A. E. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23, 38-47.
- Dugas, J. E., Zurek, L., Paster, B. J., Keddie, B. A., Leadbetter, E. R. 2001. Isolation and characterization of a Chryseobacterium strain from the gut of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Archives Microbiology*, 175, 259–262.
- Dusane, D. H., Damare, S. R., Nancharaiah, Y. V., Ramaiah, N., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R., Zinjarde, S. S. 2013. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *PLOS One*, 8(5), e64501.
- Engle, P., Moran, N. A. 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *Federation of European Microbiological Societies*, 37, 699-733.
- Feng, W., Wang, X.-Q., Zhou, W., Li, G.-Y., Wan, Y.-J. 2011. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *Journal of Insect Science*, 11, 135.
- French-Constant, R., Waterfield, N., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Clarke, D. 2003. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 433-456.
- Fiedurek, J., Gromada, A. 2000. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 85-89.
- Fikáček, M., Gentili, E., Short, A. E. 2010. Order Coleoptera, family Hydrophilidae. In: *Arthropod fauna of the UAE*. Harten. A. Dar Al Ummah (ed), 135–165, United Arab Emirates.
- Gales, A., Chatellard, L., Abadie, M. 2008. Screening of phytophagous and xylophagous insects gut microbiota abilities to degrade lignocellulose in bioreactor. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2222.

- Geetha, K. ve Gunasekaran, P. 2010. Optimization of nutrient medium containing agricultural waste for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 882-889.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Falsen, E., Ollivier, B., Cuny, G. 2010. *Serratia glossinae* sp nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis* gambiensis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1261–1265.
- Geiger, A., Fardeau, M.-L., Njiokou, F., Joseph, M., Asonganyi, T., Ollivier, B., Cuny, G. 2011. Bacterial diversity associated with populations of *Glossina* spp. from Cameroon and distribution within the campo sleeping sickness focus. *Microbial Ecology*, 62, 632–643.
- Geissinger, O., Herlemann, D. P., Morschel, E., Maier, U. G., Brune, A. 2009. The ultramicrobacterium "*Elusimicrobium minutum*" gen. nov., sp nov., the first cultivated representative of the termite group 1 phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2831–2840.
- Golonka, R., Yeoh, B. S., Vijay-Kumar, M. 2019. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 11(3), 249–262.
- Govindarajan, R. K., Seemaisamy, R., Neelamegam, R., Muthukalingan, K., Nagarajan, K. 2016. Isolation and characterization of tannase producing bacteria from the gut of *Gryllotalpa krishnani*. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Science*, 6(2), 813-817.
- Govindarajulu, S. N., Varier, K. M., Jayamurali, D., Liu, W., Chen, J., Manoharan, N., Gajendran, B. 2020. Insect gut microbiome and its applications. *Recent Advancements in Microbial Diversity*, 379-395.
- Gratia, A. 1925. On a remarkable example of antagonism between two strains of hummingbird. *Comptes Rendus Biologies*, 93, 1040–1042.
- Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M. G., Myers, A. M., Planchot, V. 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3395-3406.
- Gullan, P. J. ve Cranston, P. S. 2005. *The insects. An outline of entomology* (3 ed.). Blackwell Publishing, California.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 763–781.
- Haloi, K., Kalita, M. K., Nath, R., Devi, D. 2016. Characterization and pathogenicity assessment of gut-associated microbes of muga silkworm *Antheraea assamensis* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 73–85.

- Hansen, P. J. 1991. Quantitative importance and trophic role of heterotrophic dinoflagellates in a coastal pelagial food web. *Marine Ecology Progress Series*, 73, 253-261.
- Haq, I., Kumar, S., Kumari, V., Singh, S. K., Raj, A. 2016. Evaluation of bioremediation potentiality of ligninolytic *Serratia liquefaciens* for detoxification of pulp and paper mill effluent. *Journal of Hazardous Materials*, 305, 190–199.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, B. S. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 15–25.
- Husain, I., Sharma, A., Kumar, S., Malik, F. 2016. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: Induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. *Biochimie*, 121, 38-51.
- Husseneder, C., Simms, D., Riegel, C. 2007. Evaluation of treatment success and patterns of reinfestation of the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1370-1380.
- Ikram-ul-haq , Hameed, U., Mahmood, Z., Javed, M. M. 2012. Solid state fermentation for the production of A-amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 341-346.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kim, G. H., Saravanan, V. S., Sa, T. 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutriti. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2664-2675.
- Jackson, T. J., Wang, H., Nugen, M. J., Griffin, C. T., Burnell, A. M., Dowds, B. C. 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 237-244.
- Joshi, S., Kozlowski, M., Richens, S., Comberbach, D. M. 1989. Chitinase and chitobiase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(5), 289-296.
- Jung, B. K., Ibal, J. C., Pham, H. Q., Kim, M.-C., Park, G.-S., Hong, S.-J., Shin, J. H. 2020. Quorum sensing system affects the plant growth promotion traits of *Serratia fonticola* GS2. *Frontiers in Microbiology*, 11, 536865.
- Juturu, V. ve Wu, J. C. 2018. Microbial production of bacteriocins: latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187-2200.
- Kaltenpoth, M. ve Engl, T. 2014. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*, 28(2), 315-327.

- Karthi, S., Panneerselvam, B., Senthil-Nathan, S., Vasantha-Srinivasan, P., Shivakumar, M. S., Krutmuang, P. 2020. Functional identification and characterization of midgut microbial flora derived from lepidopteran larvae *Spodoptera litura* Fab. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101758.
- Keggi, C. ve Doran-Peterson, J. 2020. The homogalacturonan deconstruction system of *Paenibacillus amylolyticus* 27C64 requires no extracellular pectin methylesterase and has significant industrial potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12), e02275-19.
- Kelsic, E. D., Zhao, J., Vetsigian, K., Kishony, R. 2015. Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. *Nature*, 521, 516–519.
- Kim, H., Bae, M.-j., Yu, S. M., Oh, J., Lee, C. S., Jo, B. Y., Kim, J.-H. 2019. *Ephemeropterica cinctiostellae* gen. nov., sp. nov., isolated from gut of an aquatic insect. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 1546–1550.
- Klepzig, K. D., Moser, J. C., Lombardero, F. J., Hofstetter, R. W., Ayres, M. P. 2001. Symbiosis and competition complex interactions among beetles, fungi and mites. *Symbiosis*, 30, 83-96.
- Koch, H. ve Schmid-Hempel, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Science*, 108(48), 19288–19292.
- Kunji, E. R., Fang, G., Jeronimus-Stratingh, M. C., Bruins, A. P., Poolman, B., Konings, W. N. 1998. Reconstruction of the proteolytic pathway for use of B-casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 27, 1107–1118.
- Lee, N. S., Khosravi, H. M., Ibrahim, N., Shahir, S. 2015. Isolation, partial purification and characterization of thermophilic uricase from *Pseudomonas otitidis* strain SN4. *Malaysian Journal of Microbiology*, 11(4), 352-357.
- Lehrer, R. I., Ganz, T. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*, 11, 23-27.
- Leroy, P. D., Sabri, A., Heuskin, S., Thonart, P., Lognay, G., Verheggen, F. J., Haubruge, E. 2011. Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. *Nature Communications*, 2, 348.
- Li, C.-Y., Chenb, S.-J., Chenga, C.-Y., Chena, T.-L. 2005. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. *Biochemical Engineering Journal*, 25, 195–199.
- Li, C.-Y., Cheng, C.-Y., Chen, T.-L. 2001. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 258-263.

- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, e201209017.
- Li, T., Raza, S. H., Yang, B., Sun, Y., Wang, G., Sun, W., Shan, X. 2020. *Aeromonas veronii* infection in commercial freshwater fish: A potential threat to public health. *Animals*, 10, 608.
- Lincoln, L., More, V. S., More, S. S. 2019. Purification and biochemical characterization of extracellular glucoamylase from *Paenibacillus amylolyticus* strain. *Journal of Basic Microbiology*, 59, 375–384.
- Liu, S., Wilkinson, B. J., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Rich, J. O., Cotta, M. A. 2012. Novel antibacterial polypeptide laparaxin produced by *Lactobacillus paracasei* strain NRRL B-50314 via fermentation. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 3(3), 1-5.
- Liu, X. ve Kokare, C. 2016. Microbial enzymes of use in industry. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes* Brahmachari, G., Demain, A., Adrio, J. (eds). Academic Press, 267-298, West Bengal.
- Liu, Y., Wang, W., Shah, S. B., Zanaroli, G., Xu, P., Tang, H. 2020. Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 427–437.
- Liu, Y., Xu, L., Zhang, Z., Huang, Z., Fang, D., Zheng, X., Lu, M. 2021. Isolation, identification, and analysis of potential functions of culturable bacteria associated with an invasive gall wasp, *Leptocybe invasa*. *Microbial Ecology*, Baskı öncesi.
- Lu, F., Kang, X., Jiang, C., Lou, B., Jiang, M., Way, M. L. 2013. Isolation and characterization of bacteria from midgut of the rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 42, 874–881.
- Maldonado-Barragán, A., Cárdenas, N., Martínez, B., Ruiz-Barba, J. L., Fernández-Garayzábal, J. F., Rodríguez, J. M., Gibello, A. 2013. Garvicin A, a novel Ccass IId bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4336–4346.
- Malele, I., Nyingilili, H., Lyaruu, E., Tauzin, M., Ollivier, B. B., Cayol, J.-L., Geiger, A. 2018. Bacterial diversity obtained by culturable approaches in the gut of *Glossina pallidipes* population from a non sleeping sickness focus in Tanzania: preliminary results. *BMC Microbiology*, 18, 164.
- Marchut-Mikołajczyk, O., Drozdzyński, P., Polewczyk, A., Smulek, W., Antczak, T. 2021. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization. *Microbial Cell Factories*, 20, 40.
- Martinko, J. M. 2010. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, 1002, Ankara.

- Matilla, M. A. ve Krell, T. 2017. Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 2, 14–21.
- Matilla, M. A., Nogellova, V., Morel, B., Krell, T., Salmond, G. P. 2016. Biosynthesis of the acetyl-CoA carboxylase-inhibiting antibiotic, andrimid in *Serratia* is regulated by Hfq and the LysR-type transcriptional regulator, AdmX. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3635-3650.
- Meena, K. R. ve Kanwar, S. S. 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 473050.
- Meyburgh, C. M., Bragg, R. R., Boucher, C. E. 2017. *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Disases of Aquatic Organisms*, 123, 67-79.
- Minard, G., Mavingui, P., Moro, C. V. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, 6, 146.
- Msango, S. K., Bhattacharya, R., Ramakrishnan, B., Sharma, K., Subramanian, S. 2021a. Isolation and comparative analysis of culturable cellulose degrading gut bacteria from a Coleopteran and Lepidopteran insect. *Research journal of Biotechnology*, 10-19.
- Msango, S. K., Bhattacharya, R., Ramakrishnan, B., Sharma, K., Subramanian, S. 2021b. Cellulolytic activity of gut bacteria isolated from the eri silkworm larvae, *Samia ricini*, (Lepidoptera: Saturniidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41, 2785–2794.
- Msango, S. K., Gandotra, S., Chandel, R. K., Sharma, K., Ramakrishnan, B., Subramanian, S. 2020. Composition and diversity of gut bacteria associated with the eri silk moth, *Samia ricini*, (Lepidoptera: Saturniidae) as revealed by culture-dependent and metagenomics analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 1367-1378.
- Muthukalingan, K., Chinnapandi, B., Jeyaraj, P., Vimalanathan, A., Jeyaprakash, R., Paramasamy, G. 2014. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1), 16-21.
- Nadaroğlu, H., Taşkin, E., Adigüzel, A., Güllüce, M., Demir, N. 2010. Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), Purification and characterisation and fruit juice application. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5167-5176.
- Ng, I.-S., Hsueh, C.-C., Chen, B.-Y. 2017. Electron transport phenomena of electroactive bacteria in microbial fuel cells: a review of *Proteus hauseri*. *Bioresources and Bioprocessing*, 4, 53.
- Nor, F. H., Abdullah, S., Yuniarto, A., Ibrahim, Z., Nor, M. H., Hadibarata, T. 2021. Production of lipopeptide biosurfactant by *Kurthia gibsonii* KH2 and their

- synergistic action in biodecolourisation of textile wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101533.
- Oliver, K. M. ve Russell, J. A. 2016. Symbiosis, introduction to, In: *Encyclopedia of evolutionary biology*. Kliman, R. M. (ed), Academic Press, 4,282–290 Oxford.
- Ong, S. Y., Kho, H. P., Riedel, S. L., Kim, S. W., Gan, C. Y., Taylor, T. D., Sudesh, K. 2018. An integrative study on biologically recovered polyhydroxyalkanoates (PHAs) and simultaneous assessment of gut microbiome in yellow mealworm. *Journal of Biotechnology*, 265, 31-39.
- Öztürk, İ. 2010. Çevre Biyoteknolojisi, In: *Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları*. Dündar, M. ve Bağış, H. (eds), Erciyes Üniversitesi Yayınları, 647-694, Kayseri.
- Parret, A. H. A., Temmerman, K., Mot, R. 2005 Lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5197-5207.
- Patil, P. B., Zeng, Y., Coursey, T., Houston, P., Miller, I., Chen, S. 2010. Isolation and characterization of a *Nocardiopsis* sp. from honeybee guts. *FEMS Microbiology Letters*, 312, 110–118.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., Hoyer, D. 2016. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204-207.
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13, S3.
- Peristiwati, Natamihardja, Y. S., Herlini, H. 2018. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from termites gut (*Cryptotermes* sp.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1013, 012173.
- Podgwaite, J. D., D'Amico, V., Zerillo, R. T., Schoenfeldt, H. 2013. Bacteria associated with larvae and adults of the asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Entomological Science*, 48(2), 128-138.
- Poulsen, M., Oh, D.-C., Clardy, J., Currie, C. R. 2011. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLOS One*, 6(2), e16763.
- Receveur, J. P., Fenoglio, S., Benbow, E. M. 2020. Insect-associated bacterial communities in an alpine stream. *Hydrobiologia*, 847, 331–344.
- Reddy, V. M., Nikhil, G. N., Mohan, V. S., Swamy, Y. V., Sarma, P. N. 2012. *Pseudomonas otitidis* as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. *Bioresource Technology*, 123, 471–479.

- Rehman, F. U., Aslam, M., Tariq, I. M., Shaheen, A., Sami, A. J., Naveed, N. H., Batool, A. I. 2009. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). *African Journal of Biotechnology*, 8(23), 6710-6715.
- Rihakova, J., Belguesmia, Y., Petit, V. W., Pilet, M. F., Prévost, H., Dousset, X., Drider, D. 2009. Divercin V41 from gene characterization to food applications: 1998–2008, a decade of solved and unsolved questions. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 1-7.
- Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Santoyo, G. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*. 2013;15(2):, 15(2), 36–41.
- Russel, J., Røder, H. L., Madsen, J. S., Burmølle, M., Søren, S. J. 2017. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *PNAS*, 114(45), 10684-10688.
- Salem, H., Florez, L., Gerardo, N., Kaltenpoth, M. 2015. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *The Royal Society Publishing*, 282, 20142957.
- Salgado, C. A., Baglinière, F., Vanetti, M. C. 2020. Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. *Food Science and Technology*, 126, 109289.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Reviews*, 49, 643-668.
- Samie, N., Noghabi, K. A., Gharegozloo, Z., Zahiri, H. S., Ahmadian, G., Sharafi, H., Vali, H. 2012. Psychrophilic alpha-amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. *Process Biochemistry*, 47, 1381–1387.
- Sanchez, S. ve Demain, A. L. 2011. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development*, 15, 224-230.
- Sazama, E. J., Bosch, M. J., Shouldis, C. S., Ouellette, S. P., Wesner, J. S. 2017. Incidence of *Wolbachia* in aquatic insects. *Ecology and evolution*, 7(4), 1165-1169.
- Scully, E. D., Geib, S. M., Carlson, J. E., Tien, M., McKenna, D., Hoover, K. 2014. Functional genomics and microbiome profiling of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) reveal insights into the digestive physiology and nutritional ecology of wood feeding beetles. *BMC Genomics*, 15, 1096.
- Shanthakumar, S. P., Duraisamy, P., Vishwanath, G., Selvanesan, B. C., Ramaraj, V., David, V. B. 2015. Broad spectrum antimicrobial compounds from the bacterium *Exiguobacterium mexicanum*. *Microbiological Research*, 178, 59–65.

- Sharon, G., Segal, D., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. 2011. Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in *Drosophila melanogaster*, providing support for the hologenome concept. *Gut Microbes*, 2, 190-192.
- Shi, Y., Yang, Z., Xing, L., Zhou, J., Ren, J., Ming, L., Zhang, D. 2021. Ethanol as an efficient cosubstrate for the biodegradation of azo dyes by *Providencia rettgeri*: Mechanistic analysis based on kinetics, pathways and genomics. *Bioresource Technology*, 319, 124117.
- Shil, R. K., Mojumder, S., Sadida, F. F., Uddin, M., Sikdar, D. 2014. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of three phytophagous insect species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6), 927-932.
- Shukolyukol, S. A. 2011. NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE an CN-PAGE. *Cell and Tissue Biolog*, 5(3), 311-318.
- Shumo, M., Khamis, F. M., Ombura, F. L., Tanga, C. M., Fiaboe, K. K., Subramanian, S., Borgemeister, C. 2021. A molecular survey of bacterial species in the guts of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on two urban organic waste streams in Kenya. *Frontiers in Microbiology*, 12, 687103.
- Singh, S. K., Singh, M. K., Singh, V. K., Modi, A., Jaiswal, P., Rashmi, K., Kumar, A. 2020. Microbial enzymes and their exploitation in remediation of environmental contaminants. In: *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*. Kumar, A., Singh, V. K., Singh, P., Mishra, V. K. (eds), Woodhead Publishing, 59-71, Duxford.
- Skowronek, M., Sajnaga, E., Pleszczyńska, M., Kazimierczak, W., Lis, M., Wiater, A. 2020. Bacteria from the midgut of common cockchafer (*Melolontha melolontha* L.) larvae exhibiting antagonistic activity against bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: isolation and molecular identification. *International Journal of Molecular Science*, 21(2), 580.
- Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., Andraso, G. 2014. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from lake erie. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 841–848.
- Suárez-Moo, P., Cruz-Rosales, M., Ibarra-Laclette, E., Desgarenes, D., Huerta, C., Lamelas, A. 2020. Diversity and composition of the gut microbiota in the developmental stages of the dung beetle *Copris incertus* say (Coleoptera, Scarabaeidae). *Frontiers in Microbiology*, 11, 1698.
- Tan, H., Zhang, Z., Hu, Y., Wu, L., Liao, F., He, J., Deng, J. 2015. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading Zearalenone. *Food Control*, 47, 285-290.
- Thieman, W. J. ve Palladino, M. P. 2013. *Biyoteknolojiye Giriş* (3 ed.). Palme Yayıncılık, 340, Ankara.

- Thong-on, A., Suzuki, K., Noda, S., Inoue, J.-i., Kajiwara, S., Ohkuma, M. 2012. Isolation and characterization of anaerobic bacteria for symbiotic recycling of uric acid nitrogen in the gut of various termites. *Microbes and Environments*, 27, 186-192.
- Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z., Rosenberg, E. 2001. Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1102-1106.
- Van Arnam, E. B., Currie, C. R., Clardy, J. 2018. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. *Chemical Society Reviews*, 47, 1638-1651.
- Venkateshwaran, G., Somashekar, D., Prakash, M. H., Agrawal, R., Basappa, S. C., Joseph, R. 1999. Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 34, 187-191.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163–1172.
- Vilcinskas, A., Schwabe, M., Brinkrolf, K., Plarre, R., Wielsch, N., Vogel, H. 2020. Larvae of the clothing moth *Tineola bisselliella* maintain gut bacteria that secrete enzyme cocktails to facilitate the digestion of keratin. *Microorganisms*, 8, 1415.
- Wandersman, C. ve Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611-647.
- Wang, S., Wang, L., Fan, X., Yu, C., Feng, L., Yi, L. 2020. An insight into diversity and functionalities of gut microbiota. *Current Microbiology*, 77, 1976-1986.
- Wang, T.-J. ve Chen, T.-L. 1998. Lipase production by *Acinetobacter radioresistens* in a batch fill- and-draw culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73, 185–194.
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivano, N. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-deeding higher termite. *Nature*, 450, 560-565.
- Watanabe, H. ve Tokuda, G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 609-632.
- Wiater, A., Pleszczyńska, M., Pietrykowska-Tudruj, E., Janczarek, M., Staniec, B., Szczodrak, J. 2019. Isolation and characterization of  $\alpha$ -(1→3)-glucan-degrading bacteria from the gut of *Diaperis boleti* feeding on *Laetiporus sulphureus*. *Entomological Science*, 22, 36-41.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3, 163–175.
- World Health Organization 2019. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 48. Geneva: World Health Organization.

- Wu, J., Jung, B.-G., Kim, K.-S., Lee, Y.-C., Sung, N.-C. 2009. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* WL-13 and its capacity to decolorize triphenylmethane dyes. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 960–964.
- Wu, Q., Jiang, N., Han, W. B., Mei, Y. N., Ge, H. M., Guo, Z. K., Tan, R. X. 2014. Antibacterial epipolythiodioxopiperazine and unprecedented sesquiterpene from *Pseudallescheria boydii*, a beetle (coleoptera)-associated fungus. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(46), 9405-9412.
- Xie, S., Lan, Y., Sun, C., Shao, Y. 2019. Insect microbial symbionts as a novel source for biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 25.
- Xu, B., Sun, Q.-J., Lan, J. C.-W., Chen, W.-M., Hsueh, C.-C., Chen, B.-Y. 2019. Exploring the glyphosate-degrading characteristics of a newly isolated, highly adapted indigenous bacterial strain, *Providencia rettgeri* GDB 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128, 80-87.
- Yazıcı A. 2018. Filamentöz funguslardan antibiyofilm aktivitesine sahip ekstrasellüler polipeptitlerin izolasyonu. Doktora tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 90, Erzurum.
- Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Bae, J.-W. 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254-5264.
- Yun, S. H., Hwang, T. S., Park, D. H. 2007. Metabolic characterization of lactic acid bacterium *Lactococcus garvieae* sk11, capable of reducing ferric iron, nitrate, and fumarate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 218-225.
- Zacharof, M. P. ve Lovitt, R. W. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zhang, Y., Zhou, Z., Liu, Y., Cao, Y., He, S., Huo, F., Ringø, E. 2014. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1651–1662.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7, 203–214.
- Zhao, M., Zheng, P., Chen, P., Liu, S. 2017. Biosynthesis of heliotropin by a novel strain of *Serratia liquefaciens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183, 1282–1294.
- Zheng, H., Powella, E. J., Steele, M. I., Dietrichb, C., Moran, N. A. 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Science*, 114, 4775-478