



**MARUL'DAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI,
FİTAZ VE KİTİNAZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

Yunus IŞIK

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MARUL'DAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI,
FİTAZ VE KİTİNAZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

Yunus IŞIK

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

Marul'dan İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle
Tanılanması, Fitaz ve Kitinaz Aktivitesinin Tayini

Doc. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Yunus IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/02/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (3./3.) ile kabul edilmiştir.

Başkan: **Doç. Dr. EMNE ORHAN**

İmza

Üye : **Prof. Dr. Şükrü BEYOĞMUŞ**

İmza

Üye : **Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **30.03/2017** tarih ve **13...../..29.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

C. KAZAZ

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MARUL'DAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI, FİTAZ VE KİTİNAZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

Yunus IŞIK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Biyoteknoloji, günümüzde en popüler ve yeniliklere açık bilimsel alanların başında gelmektedir. Moleküler çalışmalar, mikrobiyal biyoteknoloji çalışmalarında çok önemli boyutlar kazanmıştır. Mikroorganizmalar sınıflandırılırken morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

Yerel marketlerden elde edilen bozulmuş endüstriyel öneme sahip marul bitkilerinden mikroorganizmalar izole edildi ve saflaştırıldı. Tanılamak amacıyla bakteri izolatlarının yağ asidi metil ester profilleri belirlendi. Bu profiller doğrultusunda tanılamada MIS yöntemi kullanıldı.

Hızla gelişen tanı yöntemlerinden biri olan moleküler yöntemler bakteri tanılanmasında en doğru sonuçları veren yöntemdir. Bakterilerin 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan evrensel primerler kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması, filogenetik çalışmalarda standard yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sekans sonuçları BLAST'lama yapılarak kimlik tespitlemesi yapıldı. Sekans dizileri analizi sonucunda *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus creus*, *Chryseobacterium indoltheticum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus laevolacticus* ve *Bacillus safensis* türleri tespit edildi. Bu türler filogenetik ağaç oluşturularak akrabalık ilişkilerine bakıldı. Son aşamada da bu bakterilerin kitinaz ve fitaz aktivitelere bakılarak bozucu etkileri tespit edildi.

Bu çalışmada, ekonomik öneme sahip marul bitkisinin iyi tarım uygulama metodlarına destek vermeye yönelik denemelerin ilk aşaması olan bozucu olduğu düşünülen bakterilerin izolasyonları ve identifikasyonlarının moleküler olarak tanılanması çalışmalarını içermektedir. Tanımlanan mikroorganizmalarda bazı ekstrasellüler enzimlerin varlığı (Fitaz ve kitinaz) kalitatif olarak incelenmiştir.

2017, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Marul, MIS, 16S rRNA, Karakterizasyon, Kitinaz, Fitaz

ABSTRACT

MSc Thesis

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION, CHITINASE AND PHYTASE ACTIVITY DETERMINATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM LETTUCE

Yunus IŞIK

Atatürk University
Institute of Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology
Branch of Enzyme and Microbial Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Biotechnology is currently the most popular scientific area open to innovations. Molecular studies have gained considerable importance in microbial biotechnology studies. Morphological, biochemical and molecular methods are used for the classification of microorganisms.

Microorganisms were isolated and purified from deteriorated lettuce plants with industrial importance obtained from local markets. For identification, fatty acid methyl ester profiles of bacterial isolates were determined. The MIS method was used for identification in accordance with these profiles.

Molecular methods, one of the rapidly developing diagnostic methods is the most accurate method used in the identification of bacteria. Amplification and sequencing of this gene using universal primers that allow the amplification of the bacterial 16S rRNA gene region has begun to be used as a standard method in phylogenetic studies.

Sequence results were analyzed using BLAST to carry out identification. As a result of the sequence analysis, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium indoltheticum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus laevolacticus* and *Bacillus safensis* species were identified. Phylogenetic tree was formed by these species and linkage relations were examined. In the last step, destructive effects were determined based on the chitinase and phytase activity of these bacteria.

This study involves the identification of the disruptive organisms which is the first step of the experiment to support the good agricultural practices of the lettuce plant with economic importance, isolation of these microorganisms and the molecular analysis of the identifications. The presence of some extracellular enzymes (phytase and chitinase) in the identified microorganisms has been qualitatively examined.

2017, 61 pages

Keywords: Lettuce, MIS, 16S rRNA, Characterization, Chitinase, Phytase

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde aşamasında göstermiş olduğu her türlü yardım ve desteklerinden dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım esnasında desteklerini her daim hissettiğim değerli hocalarım Bitki Koruma bölümü Sayın Prof. Dr. Recep KOTAN'a, Biyoloji bölümü Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a, Bölümümüz doktora öğrencisi Merve ŞENOL Kotan'a, Biyokimya bölümü doktora öğrencisi Yeliz Demir'e, laboratuvar çalışmalarımda her daim yanımda olan Yüksek lisans arkadaşım Emre Davarcı'ya ve diğer yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Yunus IŞIK

Şubat, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar	17
3.1.1. Kullanılan materyaller	17
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	18
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Marul'dan mikroorganizmaların izolasyonu.....	21
3.2.2. MIS yöntemi ile bakterilerin tanılanması	22
3.2.3. Konvansiyonel testler	23
3.2.3.a. Katalaz testi	24
3.2.3.b. KOH testi.....	24
3.2.3.c. Gram boyama	24
3.2.4. Moleküler yöntemlerle bakterilerinin tanılanması	25
3.2.4.a. Bakterilerin genomik DNA'larının izolasyonu	25
3.2.4.b. 16S rRNA geninin PCR yöntemi ile çoğaltılması.....	26
3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi	26
3.2.4.d. PCR sonuçlarının sekans analizinin yapılması.....	27
3.2.5. Tanılanan bakterilerin kitinaz ve fitaz aktivitesinin belirlenmesi	27
3.2.5.a. Kitinaz Enzim aktivitesinin tayini	27
3.2.5.b. Fitaz enzim aktivitesinin tayini	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Analizi Sonuçları	29

4.2. Konvansiyonel Test Sonuçları.....	31
4.3. Moleküler Analiz Sonuçları	32
4.3.1. DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü.....	32
4.3.2. 16S rRNA PCR sonuçları.....	33
4.3.3. Dizi analizi sonuçları.....	33
4.3.4. 16S rRNA sekans sonuçlarına göre bakterilerin tanılanması.....	42
4.3.5. MIS ve 16S rRNA tanılama sonuçlarının karşılaştırılması	43
4.3.6. Filogenetik ağaç	44
4.3.7. Bakterilerin petriye ekilmesi ve morfolofik analizleri	45
4.4. Bakterilerin Kitinaz ve Fitaz Aktivite Sonuçları.....	48
4.4.1. Kitinaz aktivitesi sonuçları	48
4.4.2. Fitaz aktivitesi sonuçları.....	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER DİZİNİ

bp	Base pair (Baz çifti)
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen per oksit
KOH	Patasyum hidroksit
L	Litre
ml	Mililitre (10 ⁻³)
NaCl	Sodyum klorit tuzu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Bakterilerin kaynaktan dilüsyon yöntemi ile izolasyonu.....	22
Şekil 4.1. Bakteri izolatlarının DNA izolasyon sonuçlarının jel görüntüsü	32
Şekil 4.2. 16S rRNA PCR sonucunun jel görüntüsü	33
Şekil 4.3. 16S rRNA gen bölgesinin sekans dizi sonuçları	34
Şekil 4.4. Bakteri izolatlarının akrabalıklarının filogenetik ağaçta gösterimi	45
Şekil 4.5. Bakterilerin petriye çizgi ekim yöntemi ile görüntüleri	46



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının yağ asidi profilleri.....	30
Çizelge 4.2. MIS yöntemi ile bakterilerin tanılanması sonuçları	31
Çizelge 4.3. İzolasyonu yapılan bakterilerin konvansiyonel test sonuçları	31
Çizelge 4.4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA yöntemi ile tanılama sonuçları.....	43
Çizelge 4.5. MIS ve 16S rRNA tanılama sonuçlarının karşılaştırılması	44
Çizelge 4.6. Maruldan izole edilmiş bakterilerin kitinaz enzim aktivite sonuçları	49
Çizelge 4.7. Maruldan izole edilmiş bakterilerin fitaz enzim aktivite sonuçları	50

1. GİRİŞ

Taze meyve ve sebzeler toprağa yakın olarak yetiştirildikleri ve tüketilmeden önce yıkamadan farklı bir yöntemle temizlenmedikleri için gıda temelli hastalık ve zehirlenmelere neden olan patojen bakterileri barındırmaktadırlar (Türközü 2014).

Toprak, su ve sebzelerde; oda sıcaklığında üreyebilen, saprofit ve patojen olabilme özelliğine sahip, fırsatçı bir bakteri olan *Bacillus* 'lar oldukça yoğun bulunur.

Bacillus türü, aerob, endospor oluşturan sporlu *Bacillaceae* ailesi içerisinde bulunurlar. Vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya küt olarak sonlanan 0.5-1.2 µm eninde 2.5-10 µm boyundaki basillerdir. Tek tek veya uzun zincirler şeklinde bulunabilirler. Gram boyama sonucu Gram pozitif veya değişken, bazı türler sadece taze kültürlerde Gram pozitifdir. Aerobikten fakültatif anaerobiğe kadar değişen oksijen gereksinimi gösterirler. Bazı türler zorunlu aerobtur (Ör; *B. brevis*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* ve *B. subtilis*). Katalaz testi değişkenlik göstermekle beraber genellikle pozitifdir sadece birkaç tür negatifdir, kapsül sadece *B. anthracis* türünde görülür. *B. anthracis* ve *B. mycoides* hariç genellikle hareket pozitifdir, hareket üreme ortamlarına bağlıdır. Fermentatif ve oksidatif özelliğine sahip türleri bulunmakradır. Endosporlar birçok zor şarta karşı (sıcaklık, pH, tuzluluk) dirençli yapıya sahiptir. Silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olup, türlere göre santral, terminal veya subterminal konumda bulunurlar. *Bacillus* genusunun bazı türleri omurgalı ve omurgasızlar için patojeniktir (Holt 1993).

Bacillus, diğer *Bacillaceae* cinslerinden katalaz üretimi ve aerob endospor oluşturmaları ile ayrılmaktadır. *Bacillus* cinsinin tanımlanmış 51 türü bilinmesine rağmen taksonomik olarak yeri tam olarak belirlenmemiş gruplarda mevcuttur. *Bacillus* türleri genellikle saprofitdir, doğada yaygın olarak toprakta bulunur ve toz partikülleri ile sulara, bitki ve hayvan materyallerine bulaşırlar. Bu cinse ait türlerin çoğu proteaz üretirler ve bu da rekombinant proteinleri yıkabilir (Barredo 2005).

Bacillus'ların yaşam alanları çoğunlukla toprak olduğu halde hava, su ve yiyecek gibi ortamlarda bulunabilirler. Bu tür bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilibilmeleri gibi özellikleri bakımından öne çıkmaktadır. (Ediz ve Beyatlı 2005).

Bacillus cinsine ait bakteriler selüloz ve amilaz gibi endüstriyel değeri yüksek çeşitli ekstrasellüler enzimler üretmektedirler (Ito 1997; Ediz ve Beyatlı 2005). *Bacillus* cinsi tarafından üretilen selüloz, amilaz, pektinaz, proteaz vb enzimler birçok değişik endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar (Aygan vd 2011).

Bu cinslerin hepsi yaşamlarını zor çevre şartlarında spor formda sürdürebilir. Bazı türlerin suşları glikoz, amonyum fosfat ve birkaç mineral tuzlarda, diğer ihtiyaç duyulan ek üreme faktörlerinde veya amino asit solüsyonlarında iyi bir üreme göstermektedir, bazıları yine de artan karmaşık beslenme gereksinimlerine sahiptir. pH=7.0 birçok basilin üremesi için uygun olmasına rağmen, farklı pH'larda üreyen türleri de vardır (MacFaddin 2000).

Mikrobiyal kökenli enzimler gıda, kağıt, tekstil ve deterjan endüstrilerinde büyük alan bulmaktadırlar. Endüstriyel önemleri nedeni ile uygun enzimleri üreten yeni bakteriyel suşların izolasyonuna olan talep artmaktadır (Ghorbel *et al.* 2009).

Mikrobiyal kaynaklar maliyet, tutarlılık, üretim gibi prosesler de daha az zaman harcanması, işlem modifikasyon ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlarından kaynaklanan sebeplerden dolayı endüstriyel üretimlerde kullanılmaktadır (Prakash and Jaiswal 2010).

Endüstrinin birçok safhasında kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun sebebi mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere oranla katalitik aktivitelerinin çok daha yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, çok miktarda elde

edilebilmeleri gibi avantaja sahip olmalarıdır. Doğada özellikle bazı *Bacillus* türlerinde bu enzimler sentezlenmektedir (Güven 2011).

Enzimler, canlı hücrelerde üretilen spesifik proteinlerdir. Canlı organizmada kimyasal olayları metabolize ederler. Her metabolik reaksiyon enzim denen katalizörler aracılığı ile kontrol edilir (Bhat 2000).

Hücre yapısı içerisinde gerçekleşen birçok reaksiyonun hızını ve özgüllüğünü kontrol ederler. Bazı durumlarda hücre dışında da faaliyet gösterirler. Solunum, fotosentez, sindirim işlemleri, kas kasılması vb. birçok reaksiyonun gerçekleşmesini sağlarlar (Özşahin 2006).

Normal şartlarda suda çözünen enzimler, canlı sistemlerde meydana gelen tüm reaksiyonların oluşmasını sağlayan ve bunları düzenleyen protein yapısındaki özgül biyokatalizörlerdir. Bir enzimin genetik yapısı, protein zincirinde bulunan aminoasit sırası ile belirlenir. Enzimler bu genetik yapı doğrultusunda birçok biyokimyasal reaksiyonu katalizleme özelliğine sahiptir. Aynı zamanda uygun şartlar sağlanırsa, enzimlerden doğal alanları dışında birçok alanda faydalanma olanağı oluşmaktadır. İnsanoğlu yaşamın ilk çağlarından beri enzimden faydalanmaktadır. Buna alkol fermantasyonu bira ve ekmek yapımı gibi faaliyetler ilk biyoteknolojik prosesler olarak kabul edilir (Karapınar 2002).

Enzimlerde reaksiyon hızını etkileyen faktörler vardır. Bunlar;

Sıcaklık: Enzimlerin aktivitesi belli bir sıcaklığa kadar artarken, bu sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı azalır ve enzim denatüre olabilir.

pH: Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri pH değerine, aktivite için gerekli optimum pH denir. Bu değerin üstünde ve altında aktivite azalır.

Enzim konsantrasyonu: Enzimatik bir reaksiyonda ortamda fazla miktarda substrat olması durumunda reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Substrat konsantrasyonu: Reaksiyon ortamındaki enzim konsantrasyonunun sabit kalması ve diğer şartların sabit kalması halinde substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı arasındaki ilişki hiperbolik bir ilişki gösterir (Gürdöl ve Ademoğlu 2010).

Enzimler substratları ile birçok yerde zayıf etkileşime girer enzim substrat kompleksinde kovalent olmayan etkileşimler, kovalent etkileşimlere göre daha zayıf olan bağlardır. Bağlanmanın özgül olmasını aktif bölgede bulunan atomların düzenlenmesi sağlar. Enzimler katalizledikleri biyokimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürürler ve böylece tepkimede daha az enerji harcanmasını sağlarlar (Berk *et al.* 2014).

Enzim aktivitesinin çok önemli bir özelliği enzimin substrata özgül oluşudur, yani bir enzim sadece bir substrata etki eder. Ancak bu özgüllüğün derecesi değişebilir. Birçok enzim tamamen kesin bir spesifite gösterir ve sadece bir substratın belirli bir bölgesine etki eder. Restriksiyon enzimleri DNA'yı çok spesifik nükleotid dizisinden kesebilir. Ancak bazı enzimler ise geniş bir özgürlük gösterirler ve benzer yapıdaki birçok maddeye etki edebilirler. Enzimler hücre içindeki DNA'nın yönetiminde sentezlenirler (Ünal 2012).

Canlıların sınıflandırılmasında morfolojik ve filogenetik yöntemler uygulanmaktadır. Carl Woese ve ekibi mikroorganizmaların filogenetik yakınlığı ile ilgili bilgi edinmek ve onların doğal sınıflandırılmasını sağlamak amacıyla rRNA'ya ait dizi bilgisini kullanmaya 1970 ortalarında başlamışlardır. Ribozomlar protein sentezinde rol alan, ileri derecede korunmuş ve esansiyel organeller olup, filogenetik belirteçler olarak bazı avantajlara sahiptirler. Ribozomun iskeletini oluşturan ribozomal nükleik asitler bütün canlı hücrelerde bulunur. Çoğalan bakteri hücrelerinde 10^4 - 10^5 kopya halinde 5S, 16S ve 23S rRNA bulunmaktadır. DNA'nın direkt hedeflenmesinde olduğu gibi, rRNA'larında problemlerle direkt hedeflenmesi yeterli sayıda hedef bulunması sebebi ile

nükleik asitleri çoğaltmak için ek uygulamalar yapılması gerekliliğini ortadan kaldırır. Hedef, her biri ayrı bir florasan molekül ile işaretlenir oligonükleotid probolar kullanarak belirlenir. Sinyal yoğunluğunun gerekenin altında olduğu durumlarda farklı bölgeleri hedef alan birden fazla probun aynı anda kullanılması avantaj sağlayabilir. 16S ve 23S rRNA molekülleri filogenetik kökenlerini yansıtan değişkenler dizi motiflerini oluşturmuştur. Dizi değişkeni farklı taksonomik düzeylerde prob tasarımı mümkün kılar ve değişik derecelerde korunmuş RNA bölgelerini hedefleyen problemlerin kullanılması ile bakterilerin filogenetik ayrımı mümkün olmaktadır (Persing *et al.* 2006).

Canlılar morfolojik ve filogenetik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Morfolojik olarak arkeae ve bacteria birbirlerine daha yakın özelliklere sahip iken ökaryotlar daha farklı morfolojik yapıdadır. Filogenetik olarak ise arkeler ve ökaryotlar birbirine daha yakın olup bakterilerin filogenetik yapısı daha farklıdır. Bunun nedeni sınıflandırma yapılırken protein sentezi, lipid yapısı, hücre duvarı, görev alan enzimler gibi faktörler göz önünde bulundurulmuştur. Mikrobiyal taksonomi iki başlık altında incelenir (Martinko 2010).

1. Klasik taksonomi: Klasik bakteriyal taksonomide pek çok fenotipik karakter değerlendirilir ve elde edilen veriler, organizmaları türden domaine kadar olan taksonomik adımlarda sınıflandırmak için kullanılır. Bu amaçla kullanılan kriterler morfolojik, beslenme, fizyoloji ve habitatıdır.

G-C Oranı: Genomik DNA'daki G-C oranı taksonomik sonuçları yorumlarken kullanılan bir parametredir. Bu oran DNA'nın erime sıcaklığının ölçümü ve kromatografik yöntemler gibi çeşitli yöntemler ile belirlenir.

2. Kemotaksonomi: Hücredeki bir veya daha fazla yapı taşının moleküler analizini içerir. Kemotaksonomi kendi içerisinde 4 farklı şekilde yapılabilir. Bunlar;

- a. DNA:DNA hibridisasyonu: İki farklı organizmanın DNA'sında çok sayıda benzer nükleotid dizilerin olması muhtemelen pek çok benzer genler bulundurdıkları manasına gelmektedir. Bu iki DNA dizisi birbirleri ile hibridize edildiğinde, gen dizilerinde büyük benzerlik beklenir. Genomik hibridisasyon iki DNA arasındaki dizi benzerliğinin derecesini ölçer ve rRNA dizilemesinin ayırım yapamadığı koşullarda pek çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde kullanılır.
- b. Ribotiplendirme: rRNA temelli filogenetik açıdan bakteriyal sınıflandırmada kullanan bir tekniktir. Burada karşılaştırmalı dizi analizi yöntemindeki gibi dizileme yapılmaz bunun yerine DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan kendine özgü deseni ölçer ve bu parçalar ayrılıp bir rRNA probu ile incelenir.
- c. Çok lokuslu dizi tiplendirilmesi: Bu yöntemde tek bir gen yerine 6-7 adet yaşamsal faaliyetleri kodlayan genlere ait dizilerin parçaları ile aynı organizmanın farklı suşlarındaki özdeş gen gruplarını karşılaştırır.
- d. Yağ asidi analizleri(FAME-MIS): Bu yöntemde hücrelerin stoplazmik membranlarındaki ve dış membranlarında bulunan lipidlerdeki yağ asidi tiplerinin ve oranlarının karakterize edilerek sınıflandırma yapılmasıdır. Prokaryotlarda yağ asidi içerikleri oldukça farklılık gösterir. Bu değişiklikler; yağ asidinin zincir uzunluğu, çift bağ sayısı, halka yapısı, dallanmış zincirler veya hidroksil grupları bulunup bulunmamasına göre farklılıklar içerir (Martinko 2010).

En çok kabul edilen sınıflandırma sistemi filogenetiktir. Bu sistem mikroorganizmaların farklı özelliği paylaşan gruplar halinde düzenler ve mikroorganizmaların biyolojik özelliklerini yansıtır. Canlıların evrim şekilleri çoğunlukla bir aile ağacı şeklinde çizilir gövde daha basit ilkel olan atasal çizgileri, ondan çıkan dallanmalarda daha ileri, özgürleşmiş grupları gösterir. Yani daha eski gruplar altta, yeni olan gruplar ise tepelerde yer alırlar. Hayatın ilk filogenetik ağaçları bitkiler ve hayvanlar olarak iki alem üzerinde yapılandırılmıştır. Ancak son yıllardaki çalışmalar bu iki alemin çok yetersiz olduğunu göstermiştir. Her iki gruba da girmeyen, daha basit, tek hücreli organizmalar için üçüncü bir alem olan protista alemi oluşturuldu. Daha sonra protista alemi içerisinde farklar olduğu ortaya kondu. Bakteri

ve mantarlar ayrı alemler olarak ortaya kondu. Böylelikle canlılar Monera, Protista, Mantarlar, Bitkiler ve Hayvanlar olmak üzere 5 aleme ayrılmıştır (Ustaçelebi 1999).

Hücrede bulunan temel nükleik asitler DNA ve RNA'dır. Bu iki molekül kalıtsal bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlar ve protein moleküllerine dönüştürülmesinde rol oynarlar. Biyolojik sistemler, yaşamlarını devam ettirebilmeleri için kendilerine ait yapılarını oluşturmak, yenilemek ve bunun için gerekli enerjiyi değişik metabolik yollardan kazanıp gerektiğinde kullanmaktadırlar. Organizma için hayati önemi olan bu işlemlerin yürütülmesi için gerekli bilgi nükleik asitlerde saklanmaktadır. Bir insan hücresi 46 kromozoma sahiptir. Bu 46 kromozomda bulunan DNA'daki bazlar yan yana yazılacak olursa 820.000 sayfayı doldurur. Bir türün devamı bu özgül bilginin kuşaktan kuşağa aynı aktarılabilmesi sonucu sağlanır. DNA deoksiriboz şekeri, pürin ve pirimidin bazları ve fosfat grubundan oluşur. DNA çift zincirli olup kendini semikonservatif olarak eşler. DNA çift zincirini hidrojen bağları bir arada tutar. Bu bağların kopması ile DNA denatüre olur (Ensari 2002).

DNA genetik bilgiyi depolayan nükleik asittir. Bu bilgi RNA moleküllerine transkripsiyon ile nükleusta aktarılır ve alınan şifreye göre translasyon ile stoplazmada proteinler sentezlenir bu olaya santral doğma denir. Nükleotitler hücredeki kimyasal enerjiyi depo eder ve taşırlar, diğer gruplar ile birleşerek koenzimleri oluştururlar, hücrede spesifik sinyal molekülleridir. DNA'nın yapısı 1953'te Watson ve Crick tarafından açıklanmıştır. Bu modele göre DNA bir merkez etrafında sağa dönük olarak bükülmüş çift sarmal meydana getiren ve birbirine paralel olmayan iki tamamlayıcı polinükleotid dizisinden oluşur (Ünal 2012).

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), Kary Mullis tarafından geliştirilen bu yöntem ile canlı hücreye ihtiyaç duymadan total genomik DNA'dan, spesifik DNA dizilerinin çoğaltılması yöntemidir. Bu yöntem hızlı ve kesin sonuçlar verdiği için tercih edilmektedir. PCR 3 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; DNA zincirlerin ayrılması aşaması olan denatürasyon, DNA zincirine primerlerin bağlanması ve uzama aşamalarıdır (Ensari 2002).

Yıllar içerisinde birçok alternatif yöntem geliştirilmesine rağmen PCR ve PCR'dan türetilen teknikler en çok kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleridir. PCR, DNA polimerazın DNA sarmalını kopyalayabilme yeteneğine dayanır. Bu enzim uzun DNA sarmalına bağlı olan kısa bir primer dizisinin 3' ucunda uzamayı başlatır. İki primer hedef DNA'nın tamamlayıcı sarmalına bağlandığı zaman, iki primer bağlanma alanı arasındaki sekans PCR'ın her döngüsünde katlanarak amplifike edilir. Her döngü denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere 3 adımdan oluşur. Her döngüde PCR ürünleri teorik olarak iki katına çıkar (Persing *et al.* 2006).

Nükleik asit izolasyon yönteminin seçimi, hedef molekülünün doğasına bağlıdır. Nükleik asit hedefleri arasında RNA veya DNA, plazmitler veya PCR ürünleri bulunabilir. Tanımlanmış hedefler sıklıkla tanısal dizi analizinden önce PCR ile *in vitro* olarak çoğaltılırlar (Persing *et al.* 2006).

Bu çalışmada, ekonomik öneme sahip marul bitkisinin iyi tarım uygulama metodlarına destek vermeye yönelik denemelerin ilk aşaması olan bozucu olduğu düşünülen bakterilerin izolasyonları ve identifikasyonlarının moleküler olarak tanımlanması çalışmalarını içermektedir. Tanımlanan mikroorganizmalarda bazı ekstrasellüler enzimlerin varlığı (Fitaz ve kitinaz) kalitatif olarak incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Shimizu (1992), *B. subtilis* N-77 suşundan ekstraselüler fitaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin, jel filtrasyonunda moleküler büyüklüğünü 36 kDa, SDS-PAGE’de ise 38 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin izoelektrik noktasının pI 6.25 olduğunu ve aktivitesi için Ca^{2+} gerektiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, fitazın fitata bağlı aktivite gösterdiğini ve maksimum aktivitenin pH 6.0-6.5 ve 60°C’de olduğunu tespit etmişlerdir.

Kerovuo *et al.* (1998) çalışmalarında *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinden fitaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan enzim maksimum aktivitesini pH 7.0 ve 55°C’de ortaya koymuştur. Enzimin aktivitesi ve stabilitesi için kalsiyum gerekli iken EDTA aktivitesini kısa sürede kaybettirmektedir. *B. subtilis* VTT E68013’in genomik kütüphanesinden fitaz genini (phyC) klonlamışlardır. Araştırmacılar fitaz enziminin pH ve sıcaklık profili nedeni ile yem katkı maddesi olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bhushan and Hoondal (1999) *Bacillus sp.* BG-11’den saflaştırdıkları, termostabil kitinaz aktivitesinin %90’nını Aromex, Captafol, Captan, Chlorothalonil, Dinocap, Metalaxyl, Sulphur, Triadimefon, gibi fungusit, Acephate, Chloropyriphos, Cypermethrin, Diclovorus, Dimethoate, Methomyl, Malathion, Methylparathion ve Monocrotophos gibi insektisitli ortamda litrede 100 µg enzim konsantrasyonunda aktivitesinin varlığı tespit etmişlerdir. Allosamidin kitinazı IC50 ve 48 µM da inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Lo *et al.* (2001) *Bacillus*’tan *Escherichia coli*’ye α -amilaz genini aktarmışlar ve enzim sentezini gerçekleştirmişlerdir. Moleküler ağırlığı 65 kDa olan enzim optimum pH 9.0 ve 60°C’de çalışmaktadır. Enzimin aktivitesi Fe^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} ile artarken, Hg^{2+} ve Cu^{2+} ortamında inhibe olduğunu bildirmiştir.

Yuli *et al.* (2004) Endonezyanın Tompaso sıcak su kaynağından kitinaz üreten bir bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA sekans analizine göre; bu Gr (+), spor üreten, çubuk şekilli, bakteri *Bacillus sp.* 13.26 olarak adlandırılmıştır. Bakteri %5'lik kitin içeren besiyerinde 72 saat 55°C'de üretildiğinde ekstrasellüler kitinaz üretmiştir. Enzimi NH₄SO₄ (amonyum sülfat) yöntemi ile saflaştırmışlar ve saf enzim moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de 60 kDa saptamıştır. Optimum sıcaklık 60°C ve optimum pH 7.8 olarak bulmuştur. 70°C'de 5 saat ön inkübasyondan sonra kitinaz aktivitesi korumuştur. Zimogram analizleri ile de enzimin termal stabilitesi doğrulanmıştır. 80°C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim önemli derecede koruduğunu bildirmiştir.

Kuzu (2008) yaptığı çalışmada kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu'nu incelemiştir. Kitinaz üreticisi *Bacillus thuringiensissubsp.* kurstaki HBK-51 suşu kitin içeren doğal ortamdan izole etmiş, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerin yanısıra yağ asiti ve 16S RNA dizi analizlerine göre tanımlamıştır. *B. thuringiensis* HBK-51 suşunun kültür süpernatantından elde edilen kitinaz, geniş pH (3.0-11.0) ve sıcaklık (30-120°C) aralığında aktivite göstermiştir biyodegradasyonunda ve kitobioz üretimini içeren proseslerde kullanılabilecek özellikte olduğunu bildirmiştir.

Karagöz (2009) yaptığı çalışmada bazı PGPR ve biyoajan bakterilerin Marulun gelişimi ve Marul yaprak lekesi hastalığı üzerine etkilerini incelemiştir. Marul gelişimi üzerine pozitif etkilerde bulunabilecek ve marul yaprak lekesi hastalığının biyolojik kontrolüne ortam sağlayabilecek seviyede PGPR ve biyoajan bakteriler tespit edilerek sera şartlarında aktivitelerini araştırmıştır. Çalışmada 40 bakteri straini seçilerek, bu strainlerin moleküler ve klasik yöntemlerle tanıları yapılmış. Bu testler sonucunda etkili olduğu gözlemlenen strainler sera koşullarında denemeye alınmıştır. Çalışma sonucunda marulun gelişimi üzerine olumlu etkileri gözlemlenen ve hastalık gelişimini baskılama yeteneğine sahip izolatlar belirlemiştir. Bunlar arasında hem bitki gelişimini teşvik eden hem de hastalık gelişimini önemli ölçüde baskılayan *Bacillus megaterium* KBA-10'un PGPR ve biyoajan; yine hastalık oluşumunu büyük miktarda baskılayan *Pantoea agglomerans* KBA-8 ve RK-198'in biyoajan; tohum dezenfeksiyon çalışmalarında

avantajları ortaya konulan *Pantoea agglomerans* RK-32'nin ise yine biyoajan olarak marul bitkisinde başarı ile kullanılabileceği gözlemlenmiştir.

Karagöz ve Kotan (2010) Yaptıkları çalışmada Dünya'nın değişik bölgelerinde marul yaprak lekesi hastalığına sebep olan *Xanthomonas axonopodis* pv. vitians, ülkemizde ilk olarak 2000 yılında ortaya çıkmıştır. Ülkemizde, marulda görülen bakteriyel hastalıklarla mücadele için ruhsatlandırılmış hiç bir bakterisit de bulunmamaktadır. Bu çalışmada, MIS tanılama sonuçlarına göre *Pantoea* (33 izolat), *Bacillus* (6 izolat) ve *Paenibacillus* (1 izolat) cinslerine mensup 40 çeşit bitki gelişimini teşvik edici rizobakteri (PGPR) ve bitki gelişimini teşvik edici endofitik (PGPE) bakterinin, hastalık şiddeti ve marulun gelişimine etkileri araştırılmıştır. Bütün izolatlar MIS (Mikrobiyal Tanı Sistemi) ve BİOLOG sistemleri ile tanılanmışlardır.

Mikicinski *et al.* (2010) Mali'de Sikasso Bölgesi'nde geleneksel yöntemler kullanılarak evlerde depolanmış patates yumrularında aşırı derecede yumuşak çürüklük olduğu gözlenmiştir. Hastalıklı patates yumrularından yapılan izolasyonlarda 17 bakteri izolatı elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar içerisinde Od23 izolatının patojenik olduğu, çubuk şekilli, gram pozitif, endospor formunda ve sarı pigment ürettiği tespit edilmiş. Bu izolatın Sikasso'da depolanmış patates yumrularında yumuşak çürüklük hastalığından sorumlu olduğu, 5-45°C arasında gelişme gösterdiği ve optimum gelişme sıcaklığının 30-35°C olduğu belirlenmiştir. Yapılan morfolojik, biyokimyasal ve 16S rDNA sonuçlarına göre Od23 izolatı *B. pumilus* olarak tanılanmıştır. Araştırmacılar tarafından yapılan literatür araştırmasına göre; Mali'nin Sikasso Bölgesi'nde depolanmış patateslerde *B. pumilus*'un neden olduğu yumuşak çürüklüğün ilk kez rapor edildiği bildirilmişlerdir.

Rezaei and Taghavi (2010) yapılan bir çalışmada; İran'da enfekteli patates yumruları, havuç, şeker pancarı ve şalgam kökleri ile marul ve lahana yapraklarından 42 bakteri izolatı edilmiştir. Elde edilen izolatların çubuk şeklinde, gram negatif, fakültatif anaerop, oksidaz ve üreaz negatif olduğu ve patates yumrularında yapılan patojenite testlerinde yumuşak çürüklük oluşturduğu belirlenmiştir. 42 izolatın 20'si *P. c. subsp.*

carotovorum, 6'sı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, 4'ü *Pectobacterium betavasculorum* ve 12 izolat ise *D. dadantii* olarak tanımlanmışlardır.

Korpole *et al.* (2011), çöp ekosistemindeki karboksimetil selüloz üreticisi *Bacillus*'ların filogenetik yayılımı ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. CMCaz üreten 22 suş izole edilmiş ve bu suşların optimum üremelerinin pH 9.0-10.0 aralığında olduğunu açıklamışlardır. Bu suşlardan maksimum CMCaz aktivitesini 50°C'de LFC15 suşu göstermiştir.

Altuntaş (2011) yaptığı çalışmada, bakteriyosin üreten *Pediococcus* sp. 13 suşunun 16S rRNA ile tanımlanması ve karakterizasyonunu incelemiştir. *Pediococcus acidilactici* 13 suşunun ve ürettiği bakteriyosinin tanımlanması ve karakterizasyonu araştırmıştır. Bakteriyosin ürettiği belirlenmiş olan suş, öncelikle API test kiti ile biyokimyasal olarak, ardından 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile moleküler olarak tanımlamıştır. Tez çalışmasının son aşamasında ise saflaştırılmış bakteriyosin, iki boyutlu jel elektroforez, tripsin enzimi ile parçalama ve MALDI-TOF ile moleküler ağırlık belirleme basamaklarından oluşan işlemler basamağı ile tanılamaya çalışmıştır.

Aygün (2012) bazı *Bacillus* izolatlarının 16S rRNA bölgelerinin moleküler ve biyoinformatik karakterizasyonu çalışmasında; Morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre cins ve tür bakımından teşhis edilmiş *Bacillus* izolatlarının 16S rRNA bölgeleri sekans analizleri ile değerlendirilmiş. 16S rRNA bölgelerinin sekans sonuçları gen bankasının verilerine göre %99-%100 benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

Bal (2012) yaptığı çalışmada Aşkale (Erzurum) manyezit ocaklarından cevher zenginleştirme potansiyeli bulunan bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu'nu incelemiştir. Erzurum- Aşkale sınırları içerisinde yer alan üç farklı manyezit madeni ocağından örnekler alınarak, cevher zenginleştirme potansiyeli olan bakterilerin izolasyonu gerçekleştirmiştir. Elde edilen izolatların tanı ve karakterizasyonu konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) yağ

asiti metil ester profilleri (FAME) ve moleküler yöntemlere (BOX-PCR ve 16S rRNA) göre yapmıştır.

Dadaşoğlu (2013) yaptığı çalışmada Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır illerinde bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklüğe sebep olan bakterilerin izolasyonu amacıyla çalışmasını yapmıştır. Klasik ve Moleküler Yöntemler İle Karakterizasyonu'nu araştırmıştır. Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır il ve ilçelerinde bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük meydana getiren bakterilerin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemler aracılığı ile tanılanması amaçlamıştır.

Heshmati (2013) yaptığı çalışmada Erzurum'da tüketimine sunulan tavuk eti ve karkas örneklerinde *salmonella spp.* varlığının klasik kültür tekniği, yağ asidi metil esterleri (MIS) yöntemi ile belirlenmesini incelemiştir. Örneklerde, *Salmonella spp.* varlığının tespitinde, klasik kültür tekniği (ISO 6579 referans metodu) ve Yağ asidi metil esterleri (MIS) yöntemi kullanmıştır. İzolasyon sonuçlarına göre bu kontaminasyon seviyesi personel, ekipman ve kesimhane ortamının yetersiz hijyen koşullarından kaynaklanabileceğini vurgulamıştır.

Karagöz (2013) yaptığı çalışmada Erzurum ili patates tarlalarından izole edilen bitki patojeni *streptomyces* türlerinin tanısı ve karakterizasyonu'nu incelemiştir. Erzurum ili patates üretim alanlarında adi uyuz hastalığına neden olan *Streptomyces* türlerinin tanısı ve karakterizasyonu hedeflemiştir. Uyuz belirtileri taşıyan patates yumrularından izolasyonlar yapmış ve *Actinomyces* benzeri koloni yapısı sergileyen strainler kültüre ortamına almıştır. Bu strainler içerisinde patojenite testleri pozitif değerli olanlar değerlendirilenler klasik (spor zinciri şekli ve rengi, toksik maddelere duyarlılık, melanin ve çözünebilir pigment üretimi) ve moleküler metotlarla (Polimeraz Zincir Reaksiyonu=PCR) tanımlamıştır. Mikrobiyal tanı sistemi (MIS) kullanılarak izolatların yağ asidi metil ester profilleri belirlenmiş ve patojenite bölgelerindeki hedef genlerin varlığı araştırmıştır.

Şahin (2013) yaptığı çalışmada yağ asidi ve 16s rRNA sekans analizleri ile tanımlanan lityum, çinko ve mangan dirençli bakterilerin biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesi'ni tespit etmeye çalışmıştır. Bu çalışmanın amacı atık sulara bulunan mangan, çinko ve lityum gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilecek etkin adsorpsiyon yeteneğine sahip mikrobiyal suşların izole edilmesi ve tanımlanmasıdır. Bu amaçla, ağır metal kirliliği gösteren yüzey sularından mangan, çinko ve lityum metallerine karşı yüksek direnç gösteren dört suş izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar yağ asidi (FAME) analizi ve 16S rRNA sekans analizi gibi moleküler yöntemler aracılığı ile tanımlanmıştır.

Karataş (2014) yaptığı çalışmada tunceli bölgesinde satışa sunulan geleneksel şavak tulum peynirlerinin *Cronobacter Spp.* yönünden incelenmesi, 16s rRNA dizi analizi ile alt tür belirlemesi ve suşların antibiyotik dirençliliğinin saptanmasını araştırmıştır. Bu çalışmada Tunceli ve ilçelerinde piyasada satışa sunulan (Tunceli-Merkez, Hozat, Mazgirt, Ovacık, Pertek, Pülümür ve Çemişgezek) toplanan 250-300'er gramlık 100 Şavak tulum peyniri örneği kullanmıştır. Tulum peynirlerinde *Cronobacter spp.* analizi yapılmış ve elde edilen izolat tiplendirilmesi için 16s rRNA dizi analizi kullanılarak 100 örneğin 7'sinin *C. sakazakii*, 1'inin *C. muytjensil* ve 1'inin de *C. malonaticus* olduğu belirlemiştir.

Samantir (2014) yaptığı çalışmada şalgam suyundan izole edilen laktik asit bakterilerinin 16s rRNA ile tanımlanması ve bazı gelişme parametrelerinin belirlenmesi'ni incelemiştir. Çalışmada, şalgam suyundan izole edilen ve fenolik dekarboksilaz enzimine sahip olduğu saptanan 6 adet izolat (GK1, GK3, GK5, GK11, GK12, GK13) 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile moleküler olarak tanımlamıştır. Suşların farklı NaCl konsantrasyonlarındaki, farklı pH ve sıcaklıklardaki gelişmeleri incelemiş ve optimum koşullardaki gelişme eğrileri saptanmış olup, herbirinin antimikrobiyel aktivite özellikleri araştırmıştır.

Tarakçıoğlu (2016) yaptığı çalışmada Erzurum Ilıca kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve *Bacillus*

thermoamylovorans St-10 izolatından lipaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonunu incelemiştir. Bu çalışmada, Erzurum-Ilıca kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu suşların; *Bacillus licheniformis*, *B. thermoamylovorans*, *Brevibacillus brevis*, *B. agri*, *B. borstelensis*, *Aeribacillus pallidus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir.

Kumar (1994) evrimsel mesafeleri tahmin etmek, filogenetik ağaçları yeniden oluşturmak ve moleküler veriden temel istatistiksel nicelikleri hesaplamak için MEGA adlı bir bilgisayar programı paketi geliştirilmiştir. Bu programda, nükleotid ve amino asit dizisi verilerinden evrimsel mesafeleri tahmin etmek için çeşitli yöntemler, üç farklı filogenetik çıkarım yöntemi (UPGMA, komşu birleşim(NJ) ve azami kısaltma) ve topolojik farklılıkların iki istatistiksel testi bulunmaktadır. Maksimum kısaltma yöntemi için, dallanma ve sezgisel aramaların yeni algoritmaları uygulanmaktadır. Buna ek olarak, MEGA, nükleotid ve amino asit frekansları, geçiş / transversion önyargıları, kodon frekansları (kodon kullanım tabloları) ve nükleotid ve amino asit sekanslarındaki belirli segmentlerdeki değişken sitelerin sayısı gibi istatistiksel nicelikleri hesaplar. Gelişmiş ekran üzeri dizi verileri ve phylogenetictree editörleri, geniş bir yazıcı yelpazesi ile yayın kalitesinde çıktılar kolaylaştırır. Entegre ve interaktif tasarımlar, on-line içeriğe duyarlı yardımlar ve bir metin dosyası editörü MEGA'yı kullanımı kolaylaştırdığı belirtmişlerdir.

Bruno *et al.* (2000) yaptığı çalışmada ağırlıklı komşu birleştirme" veya "Komşuluk" olarak adlandırılan, uzaklığa dayalı bir filogenetik ağacı yeniden yapılandırma yöntemi sunmuşlardır. Komşu katıldığı andan itibaren her takvimde iki takson katılır; Bununla birlikte, katılmak için bir grup takson seçimi için Weighbor kriteri, mesafe tahminlerinde oluşan hataların daha uzun mesafelerde katlanarak daha büyük olduğunu göz önüne almıştır. Ölçüt, dizi gelişimi için bir olasılık modeli altında hesaplanan farklı araçlar ve varyanslarla korelasyonlu Gauss rasgele değişkenleri olarak modellenen uzaklıklardaki bir olasılık fonksiyonunu temsil etmiştir. Mümkün olan en fazla olası filogenetik yeniden yapılandırma ile karşılaştırıldığında, Weighbor, niteliksel ve nicelik

bakımından benzer ağaçlar inşa ederken çok daha hızlı olduğu vurgulanmıştır. Komşu, komşu birliği olan BIONJ ve kısaltma ile gözlemlenen "uzun dalları çekiyor" ve "uzun dalı dikkati dağıtmak" sakıncalarına nispeten bağışık görüldüğünü bildirmiştir.

Kumar *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada filogenomik ve phylomedicine için birçok gelişmiş yöntem ve araç içeren Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) yazılımının son sürümünü sunmaktadırlar. Bu önemli yükseltmede, MEGA, daha büyük veri kümelerini analiz etmek için 64-bit bilgi işlem sistemlerinde kullanılmak üzere optimize etmişlerdir. Araştırmacılar artık MEGA'da onbinlerce diziyi keşfedebilir ve analiz edebilir. Yeni sürüm, zaman çizelgeleri oluşturmak için gelişmiş bir sihirbaz ve gen aile ağaçlarındaki gen kopyalama olaylarını otomatik olarak öngörmek için yeni bir işlevsellik de sunuyor. 64 bitlik MEGA iki arayüz halinde sunuluyor: grafik ve komut satırı. Grafiksel kullanıcı arabirimi (GUI), Mac OS X'te de kullanılabilen yerel bir Microsoft Windows uygulamasıdır. Komut satırında M ega, Windows, Linux ve Mac OS X için yerel uygulamalar olarak mevcuttur. Bunlar, yüksek -çalıştırma ve yazılı analiz imkanı sunduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

Erzurum’ da yerel marketlerden izolasyon için özellikle bozulmakta olan marul yapraklarından mikrobiyal yükün fazla olduğu düşünülerek örnekleme yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan materyaller

Alet ve cihazlar:

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

Magnetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Hassas Terazı (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)

PCR (Thermo Cyclers Block, GERMANY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

%0,85'lik NaCl çözeltisi: 1 L saf suda 0,85 g NaCl çözüldü. Çözelti otoklavda steril edildi.

Tripticase soy agar (TSA): 1 L saf su içerisine 40 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid) ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edilerek, 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere aktarıldı.

Nutrient agar (NA): 1 L saf su içerisine 28 g nutrient agar (Oxoid) eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildikten sonra, 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere aktarıldı.

Hücre parçalama (saponification) çözeltisi (çözelti 1): 150 ml metil alkol (HPLC Grade) ve 150 ml steril saf su 1 L'lik renkli çözelti şişesine ilave edildi. Daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit (ACS Grade) eklenerek tamamen çözülünceye kadar karıştırılarak kullanıma hazırlandı (MIS 2005).

Metilleştirme (methylation) çözeltisi (çözelti 2): 325 ml hidroklorik asit (6 N) ve 275 ml metil alkol (HPLC Grade) 1 L'lik renkli çözelti şişesinde tamamen çözülünceye kadar karıştırılarak kullanıma hazırlandı (MIS 2005).

Saflaştırma çözeltisi (çözelti 3): 200 ml metil-tert-butil-eter (HPLC Grade), 200 ml hexan (HPLC Grade) üstüne eklenerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı tamamen çözülünceye kadar karıştırılarak kullanıma hazırlandı (MIS 2005).

Bazik yıkama (Base Wash) çözeltisi (çözelti 4): 10,8 g katı haldeki sodyum hidroksit (ACS Grade) 900 ml steril saf su içerisinde tamamen çözülünceye kadar karıştırıldıktan sonra 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı (MIS 2005).

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: Saf su içerisinde 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 ml'ye olunca otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

%10'luk SDS çözeltisi: 100 ml steril saf su içerisinde 10 g SDS'nin çözdürüldü. Şişenin ağzı sıkıca kapatılarak, oda sıcaklığında saklandı (Wilson 1997).

Proteinaz K: 20 mg proteinaz K 1 ml steril saf su içerisinde olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de saklandı (Wilson 1997).

5 M NaCl çözeltisi: 100 ml saf su içerisinde 29,22 g NaCl'ün çözülmesiyle hazırlandı. Otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi: 80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl çözülmesinin akabinde karışıma 10 g CTAB eklendi. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi, karışım oda sıcaklığında saklandı (Wilson 1997).

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. -20°C'de tutuldu.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik eppendorf tüplerine aktararak, oda ısısında muhafaza edildi (Wilson 1997).

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize formda satın alınan primerler katolokta yazılan prosödür doğrultusunda çözülerek $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ denklem kullanılarak son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde hazırlandı (Barış 2009).

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Ethidium bromür çözeltisi: 100 ml steril saf su içerisinde 1 g ethidium bromür eklendi magnetik karıştırıcı kullanarak tamamen çözüldü. Amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009)

6X yükleme tamponu: 100 ml için %100'lük gliserolden 40 ml alıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE ile 100 ml olacak şekilde hazırlandı. +4°C'de muhafaza edildi (Barış 2009).

Substratın hazırlanışı (Kitinaz aktivitesi için): 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine %0,05'lik kitin ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde yer alan 0,02 M Sodyum sitrat tamponu ise; 5,88 g Sodyum sitrat tartılıp, distile su ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 6,0 olacak şekilde hazırlanmıştır (Şenol 2014)

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı (Kitinaz aktivitesi için): 0,01 M DNSA çözeltisi için 3,5-dinitrosalisilik asit saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Şenol 2014).

Substratın hazırlanışı (Fitaz aktivitesi için): 100 mL 0,1 M asetat tamponu (pH 5,5) içerisine 2 mM Na-fitat ilave edilerek hazırlanmıştır. 0,1 M Sodyum asetat tamponu hazırlamak için 0,82 g sodyum asetat 100 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 5,5'e ayarlanmıştır. 2 mM Na-fitat çözeltisi 0,132 g Na-fitat, Sodyum asetat tamponu üzerine eklenmiştir. Reaksiyonu durdurucu çözeltinin hazırlanışı Reaksiyonu durdurmak için %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 100 mL distile suda 10 g TCA çözülerek hazırlanmıştır (Sarıbuğa 2013).

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı (Fitaz aktivitesi için): Çözelti A: 93,7 mL distile su içerisine 5,73 mL sülfirik asit (%96' lık) ilave edilerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti B: 2,5 g amonyum molibdat, uygun oranda çözelti A' da çözünmüş ve son hacim çözelti A ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti C: 2,5 g demir sülfat, uygun oranda distile suda çözünmüş ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisine 1-2 damla sülfirik asit ilave edilmiştir. Renklendirme

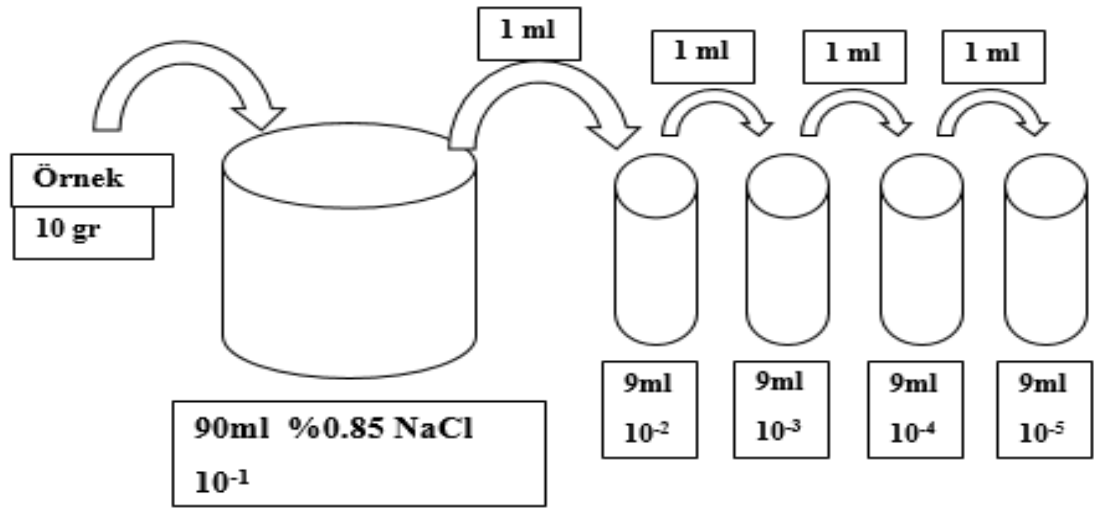
  zeltisi: Dört hacim   zelti B, bir hacim   zelti C ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Bu   zelti uzun süre bekletilmemelidir (Sarıbuğa 2013).

3.2. Yöntem

3.2.1. Marul'dan mikroorganizmaların izolasyonu

Piyasadan değişik marketlerden toplanan bozulmuş marul yapraklarından mikroorganizmalar dilüsyon yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Maruldan aseptik şartlarda yaklaşık olarak her bir örnekten 9 gr alındı. Mikroorganizma dağılımı dengeli olması için marul örneklerinin değişik bölgelerinden kısımlar alındı. Bu parçalar steril makasla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanan örnekten bir miktar alınarak %0.85'lik NaCl sıvısı içerinde seyreltildi.

Hazırlanan dilisyon suyunun bir kısmı 9'ar ml olacak şekilde deney tüplerine konuldu diğer kısmı ise 90 ml olacak şekilde erlene konuldu. İlk olarak erlendeki 90 ml dilisyon suyuna 10 gr parçalanmış marul  rneği konuldu. Bu   zelti homojenize edildi. Daha sonra 100 ml olan çözeltiden 1ml alınarak 9 ml'lik birinci deney tüpüne aktarıldı. Sonra bu işlemler 1.tüpten 1 ml alınarak 2. deney tüpüne, 2. deney tüpünden 1 ml alınarak 3. deney tüpüne eklenecek şekilde devam etti böylece deney t perindeki mikroorganizma yoğunluğu kademeli ola ak şekilde seyrelilmiş oldu (Sekin ve Karagöz 2004).



Şekil 3.1. Bakterilerin kaynaktan dilüsyon yöntemi ile izolasyonu

3.2.2. MIS yöntemi ile bakterilerin tanılanması

a. İzolatların yağ asit profillerinin belirlenmesi: -80°C’de gliserollü besiyerinde saklanan veya yeni izole edilmiş bakteri izolatlarının yağ asidi metil ester ekstraksiyonu, saflaştırılması ve analizini yapmak için cihaz çalışma sistemi protokolü izlenmiştir. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS) kullanılarak kültüre alınan izolatların yağ asit profilleri belirlenmiş ve sistemin kütüphanesindeki bilgilerle karşılaştırarak bakteri izolatların tanısı yapılmıştır.

b. Bakteri izolatların NA’da geliştirilmesi: Stok veya yeni izole edilen bakteri örnekleri NA agar besi yerinde çizgi ekim yöntemi ile ekildi. 33°C’de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik bakteriler alınarak yağ asidi esterlerinin izolasyonuna başlandı.

c. Yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılması: Bu aşamada bakterilerin yağ asitlerini saf olarak elde edebilmek için 4 değişik çözelti hazırlandı. Aşağıdaki aşamalar takip edildi.

- Besiyerlerinde büyütülen bakterilerin genç kültürleri besiyerinden alınarak steril test tüplerine konuldu.
- Test tüplerinin her birine 1 ml çözelti 1'den eklendikten sonra 5-10 saniye çalkalandı ve 5 dakika süreyle 100°C'lik su banyosunda bekletildi. Tekrar 5-10 saniye çalkalanan test tüpleri 25 dakika süreyle 100°C'lik su banyosunda inkübe edildi. Böylece bakteri hücreleri parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlandı.
- Kullanılan test tüplerine çözelti 2'den 2 ml eklendi ve 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 80°C'de 10 dakika su banyosunda konuldu. 2 dakika buz veya soğuk su içerisinde hızlı bir şekilde soğutuldu. Bu
- uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş oldu ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edildi. Bu aşamada serbest yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda uçuculuk özelliği kazandırır.
- Soğutulmuş tüplere çözelti 3'ten 1,25 ml eklendi ve 10 dakika çalkalandı. Bu basamakta tüplerde 2 ayrı faz oluştu. Tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında ise organik sıvı faz oluştu. Yağ asit metil esterleri organik faz bölgesinde toplandı. Bundan dolayı pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atıldı ve organik fazla çalışmaya devam edildi.
- Son olarak her tüpe çözelti 4'ten 3 ml eklenerek 5 dakika çalkalandı daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Bu çözelti bazik bir çözelti olduğu için, serbest yağ asit metil esterlerini daha saf elde etmemizi sağladı. Tüp içerisinde tekrar iki ayrı faz oluştu. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml gaz kromatografisi tüplerine transfer edildi. Ağzıları iyice kapatılan bu tüpler MIS cihazı üzerindeki örnek kısmına konuldu. MIS cihazı çalıştırılarak, örnekler analiz edildi (MIS 2005).

3.2.3. Konvansiyonel testler

Bu biyokimyasal testler yapılan moleküler testleri desteklemek ve çok yakın moleküler dizilere sahip olan suşların farklı kimyasallara verdikleri tepkileri analiz etmek amacı ile yapılmıştır.

3.2.3.a. Katalaz testi

İzole ettiğimiz bakterilerin katalaz enzimi olup bulunmadıklarını saptamak amacıyla katalaz testi yapıldı. Katalaz enzimi hidrojen peroksidi su ve oksijene çeviren enzimdir. Bu test sırasında eğer oksijen açığa çıkıyorsa kabarcıklar gözlemlenir. Bu testin yapılış aşamasında lam üzerine bir öze bakteri koyulur ve daha sonra üzerine 1 damla %3 H₂O₂ damlatılır. Eğer 20 sn içinde gaz çıkışı olursa bakteri katalaz pozitifdir, gaz çıkışı olmuyor veya 20sn sonra çıkıyorsa katalaz negatifdir (Tarakçıoğlu 2016).

3.2.3.b. KOH testi

Bakterilerin Hücre duvarlarındaki farklılığın ortaya konulması amacıyla yapılan testlerden biridir. Bu testte lam üzerine önce 1 damla steril saf su damlatılır, daha sonra özeyle bir miktar bakteri alınıp lam üzerinde suyla karıştırılır bakteri güzelce su yayılır. Bu homojenat üzerine, %3 KOH çözeltisinden bir damla damlatılır. Özeyle karıştırıldığında eğer öze yukarı kaldırıldığında uzama görülürse sonuç Gram negatifdir görülmez ise sonuç Gram pozitifdir (Farrab and Rebolı 2006).

3.2.3.c. Gram boyama

Bu testte bakterilerin hücre duvar yapıları belirlemek amacıyla Gram pozitif veya Gram negatif olduklarını belirlemek için yapılmıştır. İzole ettiğimiz bakteriler nutrient agar'da 24 saat süreyle geliştirilmiştir. Besiyerlerinde gelişen bakterilerden 1 öze alınarak steril lam üzerine konulmuştur. Üzerine 1 damla su aktarılıp iyice lam üzerinde yayım yapılır. Ateşten birkaç defa geçirilip kuruması sağlanır. Kuruma işlemi gerçekleştikten sonra kristal viyole boyası ile 1 dk temas edilir ve 30 saniye boyunca saf su ile yıkanır daha sonra lügol eklenerek 1 dk beklenir ve %96'lık etil alkol ile yıkama yapılır. Saf su ile iyice yıkandıktan sonra safranin boyası ile muamele edilir. Preperat kuruması beklenir kuruma işlemi tamamlandıktan sonra mikroskop altında bakterilerin rengine bakılır. Gram negatif bakteriler pembemsi renk görünümüne sahipken Gram pozitif bakteriler ise mor renge sahiptir (Davarcı 2017).

3.2.4. Moleküler yöntemlerle bakterilerinin tanılanması

3.2.4.a. Bakterilerin genomik DNA'larının izolasyonu

Bakterilerin genomik DNA'larında Baris (2009)'ın protokolü kullanılmıştır.

- Stoktan veya yeni izole edilmiş bakteriler ile nütrient agarlı besi yerlerinde çizgi ekim yapıldı. İnkuvasyonda 29°C de 24-48 saat'lık kültürlerden bir öze dolusu örnek toplanarak 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı.
- Tüplerdeki örneklerin üzerine 567 µl TE tamponu eklendi ve iyice homojenize edildi. 30 µl %10'luk SDS ve 3 µl proteinaz K eklendi. Alt-üst edilerek karıştırılan tüp 37°C'de 1 saat bekletildi.
- 1 saatin sonra tüpe 100 µl 5M NaCl ilave edildi ve karıştırıldı.
- Tüpe 80 µl 65°C CTAB/NaCl çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı ve su banyosunda 65°C'de 10 dakika bekletildi.
- 780 µl Kloroform: İzamil alkol (24:1) ilave edilerek alt-üst edildi. 4°C'de 12000 rpm 5 dakika santrifüj edildi.
- Alt faza dokunulmadan üst faz alınarak yeni steril eppendorf tüplerine konuldu. Üzerine eşit hacim Fenol: Kloroform: İzamil alkol (25:24:1) ilave edilerek alt-üst edildi. 4°C'de 12000 rpm 5 dakika santrifüj edildi.
- Alt faza dokunulmadan üst faz alınarak yeni steril eppendorf tüplerine konuldu. Üzerine 0,6 hacim soğuk -20°C izopropanol ilave edilerek alt-üst yapılarak karıştırıldı. 4°C'de 12000 rpm 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant hassas bir şekilde alınarak uzaklaştırıldı. Tüpün altında kalan pelet %70'lik alkol ile dikkatlice yıkandı ve kurutuldu.
- Kuruyan DNA 100 µl TE tamponunda çözülerek %0,6'lık agaroz jelinde yürütüldü.
- Jelde tek parça bant veren örnekler 4°C'ye konularak daha sonraki çalışmalar için stoklandı.

3.2.4.b. 16S rRNA geninin PCR yöntemi ile çoğaltılması

Bakterilerin kimlik tanımlarının yapılması için bakteri sistematigi açısından önemli olan 16S rRNA'nın sentezlendiği gen bölgesi hedef bölge olarak belirlenmiş ve evrensel primerler kullanılarak *in vitro* olarak çoğaltılmıştır.

Reaksiyonun hazırlanması: Her bir örnek için; 7 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0,01 jelatin pH: 8,3), 1,4 µl dNTP (deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM), 0,7 µl 50 µM

0,7 µl 50 µM primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 0,7 µl 50 µM primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 2,8 µl DMSO, 4,2 µl MgCl₂, 0,7 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 51 µl steril saf su ile 68,5 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 1,5 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 70 µl'ye tamamlandı.

Hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dakika denetürasyon, bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama aşamaları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama evrelerinden oluşacak şekilde tasarlanan PCR Cihazına konuldu ve hedef bölgeler çoğaltıldı.

3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

Çoğaltılan PCR ürünleri bu aşamada agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak yürütüldü. Amaç gen bölgelerinin PCR yöntemi ile Çoğaltılıp çoğaltılmadığını belirlemektir. Bu amaçla 1,2 gr agaroz üzerine 120 ml 1XTAE tamponu eklendi. Karışım mikrodalga fırında tamamen çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C'ye kadar soğutulan agarose jele 0,6 µl etidium bromür eklendi. Elektroforez jel kuveti içerisine taraklar yerleştirildikten sonra 15-20 dakika jelin donması beklendi . Donan jelden taraklar çıkarıldı ve kuvvet içerisinde 1XTAE tamponu jelin seviyesini aşacak seviyede konuldu. Jeldeki ilk kuyuya, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-

1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer kuyulara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 8 µl PCR örnekleri karıştırılarak yüklendi.

Örneklerin yüklendiği elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak 75 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülendi ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edildi (Barış 2009).

3.2.4.d. PCR sonuçlarının sekans analizinin yapılması

Sekans analizi yapan firmanın web sayfasından alınan analiz sonuçları BioEdit ile analiz edilerek FASTA formatına çevrildi. Primerler bulunup öncesinde ve sonrasındaki kısımlar çıkarıldı. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan kısım kontrol edilerek düzenlendi. NCBI veri bankasındaki sekans sonuçları ile karşılaştırıldı.

3.2.5. Tanılanan bakterilerin kitinaz ve fitaz aktivitesinin belirlenmesi

3.2.5.a. Kitinaz Enzim aktivitesinin tayini

500 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C’de su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi ilave edilip daha sonra 10 dakika 80°C’de su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Su banyosundan alınan örneklerin üzerine 1300 µL distile saf su eklenmiştir. Örnekler kör kullanılarak (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 1500 µL saf su) 540 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür (Şenol 2014).

3.2.5.b. Fitaz enzim aktivitesinin tayini

Fitaz enzim aktivitesi için 100 µL enzim çözeltisi ile 250 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika inkübe edilmiş ve 3200 devir/dakikada 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler kör kullanılarak 700 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır (Sarıbuğa 2013).

4. ARAşTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Analizi Sonuçları

İzolatların yağ asiti metil ester profili (FAMES) veya MIS analizleri yapılmış, MIDI firmasının Sherlock TSBA6.0 ve ACTINO kütüphanesine göre yağ asidi profilleri Çizelge 4.1’de, tanı sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının yağ asidi profilleri

Bakteri İzolatı	Yağ Asiti Profilleri													
M1	11:0 ISO	13:0 ISO	15:0 ISO	15:0 ISO	15:0 ISO	15:0 AnteISO	15:0 ISO	16:1	16:0	17:1 ISO	17:1 AnteISO	17:0 ISO	17:0 AnteISO	18:1
M2	14:0 ISO	15:0 ISO	15:0 AnteISO	16:0 ISO	16:1	16:0	17:1 ISO	17:0 ISO	17:0 AnteISO	18:1				
M3	12:0 ISO	12:0	13:0 ISO	13:0 AnteISO	14:0 ISO	15:0 ISO	15:0 ISO	15:0 AnteISO	16:0	16:0	17:0 ISO	17:0 ISO	17:1 ISO	17:1 ISO
M4	12:0 ISO	12:0	13:0 ISO	14:0 ISO	15:0 ISO	15: 0 ISO	16:0	16:0	17:1 ISO	17:1 ISO	17:0 ISO	17:0 ISO	18:1	16:0
M5	13:0 ISO	14:1 ISO	15:0 ISO	16:0	16:0	17:0 ISO	17:0 AnteISO	18:1	18:1	18:0	17:0 ISO	17:0	19:0	15:0 AnteISO
M6	13:0 ISO	14:0 ISO	14:0	15:0 ISO	15:0 AnteISO	16:0	16:0 I	16:1	16:0	16:1	17:0	17:0	18:1	18:0
M7	12:0	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:1							
M8	Tanımlanamadı.													
M9	11:0 ISO	13:0 ISO	13:0 AnteISO	14:0 ISO	15:0 ISO	15:0 ISO	15:0 AnteISO	16:0 ISO	16:1	16:0	17:0 ISO	17:0 AnteISO	17:0 AnteISO	18:1

Çizelge 4.2. MIS yöntemi ile bakterilerin tanılanması sonuçları

Bakteri izolatları	MIS tanı sonuçları
M1	<i>Bacillus pumilus</i>
M2	<i>Bacillus subtilis</i>
M3	<i>Bacillus cereus</i>
M4	<i>Bacillus creus</i>
M5	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>
M6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
M7	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
M8	Tanılamadı.
M9	<i>Bacillus pumilus</i>

4.2. Konvansiyonel Test Sonuçları

MIS ve 16S rRNA yöntemleri ile tanılanan bakteri izolatlarının bazı kimyasallar ile verdikleri tepkimeler ve hücre duvar yapılarını belirlemek amacı ile biyokimyasal testlerden katalaz, KOH ve gram boyama testleri yapıldı. Test sonuçları Çizelde 4.3’de verilmiştir.

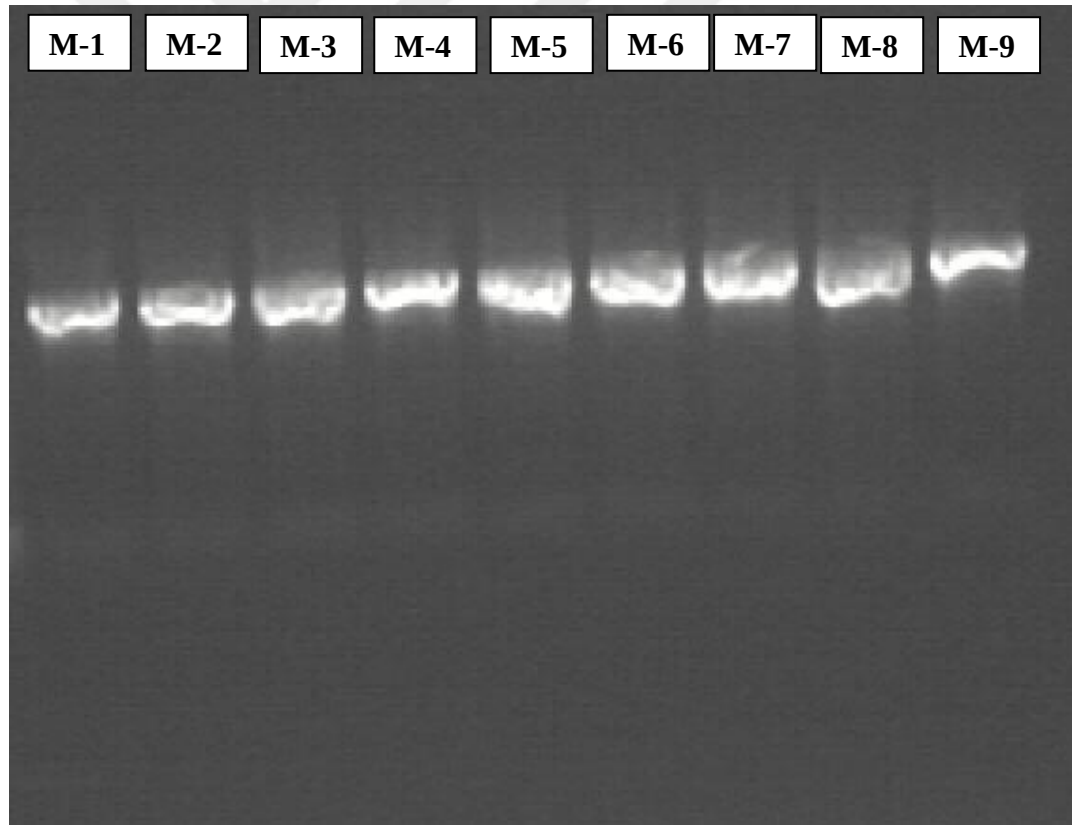
Çizelge 4.3. İzolasyonu yapılan bakterilerin konvansiyonel test sonuçları

Bakteri izolatları	Katalaz testi	KOH	Gram boyama
M1	+	+	+
M2	+	+	+
M3	+	+	+
M4	+	+	+
M5	+	+	+
M6	+	+	+
M7	+	-	-
M8	+	+	+
M9	+	+	+

4.3. Moleküler Analiz Sonuçları

4.3.1. DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü

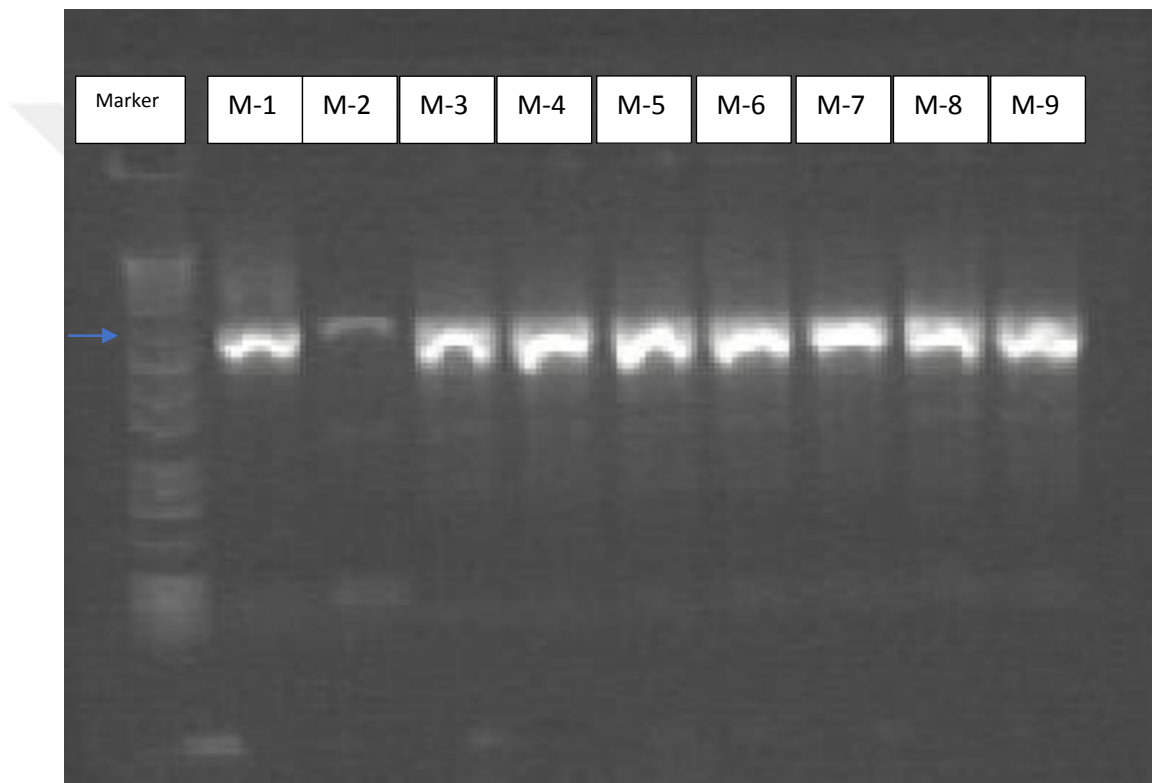
Bakteriler besiyerlerine ekildikten sonra 24-48 saatlik kültürlerden alınıp DNA izolasyonu yapıldı. PCR aşamasına geçmeden önce bakteri DNA'ların izolasyonun doğru bir şekilde yapıp-yapılmadığını tespit etmek amacı ile yapıldı. Jel görüntüsü iyi sonuç verirse PCR aşamasına geçilir. Bant oluşumu olmaz veya kirlilik fazla olursa DNA izolasyonu tekrarlanır. Bakteri izolatlarının DNA izolasyon sonuçlarının jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Bakteri izolatlarının DNA izolasyon sonuçlarının jel görüntüsü

4.3.2. 16S rRNA PCR sonuçları

PCR ürünleri jelde yürütülürken daha önce yapılan testlere göre adlandırılmış ve sonuçlar bu adlandırmaya göre görüntülenmiştir. Bu veriler sonucunda oluşturulan 9 bakterinin 16S rRNA PCR sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Buradaki bantlar yaklaşık olarak 1400-1500 bp uzunluktadırlar.



Şekil 4.2. 16S rRNA PCR sonucunun jel görüntüsü

4.3.3. Dizi analizi sonuçları

PCR sonuçları, 16S rRNA gen dizisi belirlenmek ve genomik DNA kütüphanesiyle karşılaştırılmak amacı ile sekans şirketine gönderilmiş ve dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen 16S rRNA dizileri Şekil 4.3’te belirtilmiştir.

>M-1 (*Bacillus pumilus*)

GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG
 ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC
 AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
 GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
 CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
 AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCT
 AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC
 GTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
 GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGA
 GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGCGGAGCGAACAGG
 ATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCG
 CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTT
 TCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGC
 ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
 TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGA
 CCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
 ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAG
 GTAACCTTTA

Şekil 4.3. 16S rRNA gen bölgesinin sekans dizi sonuçları

>M-2 (*Bacillus subtilis*)

GAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTA
 AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGT
 TCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
 TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
 CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCG
 TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTA
 CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGA
 GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
 GCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAGGGGGTT
 TCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCCCCGGGGAGTACGGTCGCA
 AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAACATGTGGTTTAA
 TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAG
 GACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT
 TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGC
 GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAA
 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG
 TGAGGTAAC

Şekil 4.3. (devam)

>M-3 (*Bacillus thuringiensis*)

ATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACT
 GCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
 CGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTT
 TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCT
 TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
 AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
 CTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGT
 GCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
 GTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAG
 AGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCA
 TTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG
 AGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
 CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA
 AGTCGGTGGGGT

Şekil 4.3. (devam)

>M-4 (*Bacillus cereus*)

GCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAA
 GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTT
 CGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGT
 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
 GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT
 AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
 GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
 AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
 GAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG
 CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
 CGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATC
 GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGG
 CTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG
 GGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
 TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAA
 GACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
 CGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAC

Şekil 4.3. (devam)

>M-5(*Chryseobacterium indoltheticum*)

TCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTG
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAA
ATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAA
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAA
GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC
CTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCT
CCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCG
CGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC

Şekil 4.3. (devam)

>M-6 (*Bacillus amyloliquefaciens*)

GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
 GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGAC
 ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
 TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
 GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGC
 TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAAC
 CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
 GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
 TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
 GCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCC
 CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGC
 AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC
 CTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACT
 CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCG
 CGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
 GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT

Şekil 4.3. (devam)

>M-7 (*Pectobacterium carotovorum*)

GCTTGCTCTTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG
 GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAAAGAG
 GGGGACCTTCGGGCCTCTCGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGG
 TAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
 GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
 CAGCGAGGAGGAAGGCGGTAAGGTTAATAACCTTATCGATTGACGTTACTCGCAGAAGA
 AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
 GAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGG
 GCTTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
 ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
 CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
 TTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCA
 AATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
 GAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTAGCTAGAGATAGCTGAGTGCCTTCG
 GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAA
 GGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
 TACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAG
 AGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
 TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA

Şekil 4.3. (devam)

>M-8 (*Bacillus safensis*)

TGCAGTCGAGCGGACGAGAAGAGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC
GGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAG
ATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGT
AAcACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGAT
AGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTA
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCT
GCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGC
AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTC
GGTG

Şekil 4.3. (devam)

>M-9 (*Bacillus pumilus*)

```
AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAA
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTT
CAAGGATGAAAGACGGTTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAAGAGG
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCC
GCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCT
TTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAG
ACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTC
GACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGA
GGTAACC
```

Şekil 4.3. (devam)

4.3.4. 16S rRNA sekans sonuçlarına göre bakterilerin tanılanması

Sekans sonucu elde ettiğimiz diziler blastlandı. Blast sonuçları NCBI kütüphanesinde taranarak kütüphanedeki bakteri gen dizileri ile bizim bakterinin gen dizileri karşılaştırıldı ve benzerlik oranına göre tanılama yapıldı. Tanılama sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA yöntemi ile tanılama sonuçları

Bakteri izolatları	16S rRNA tanı sonuçları
M1	<i>Bacillus pumilus</i>
M2	<i>Bacillus subtilis</i>
M3	<i>Bacillus thuringiensis</i>
M4	<i>Bacillus cereus</i>
M5	<i>Chryseo bacterium indoltheticum</i>
M6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
M7	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
M8	<i>Bacillus safensis.</i>
M9	<i>Bacillus pumilus</i>

4.3.5. MIS ve 16S rRNA tanılama sonuçlarının karşılaştırılması

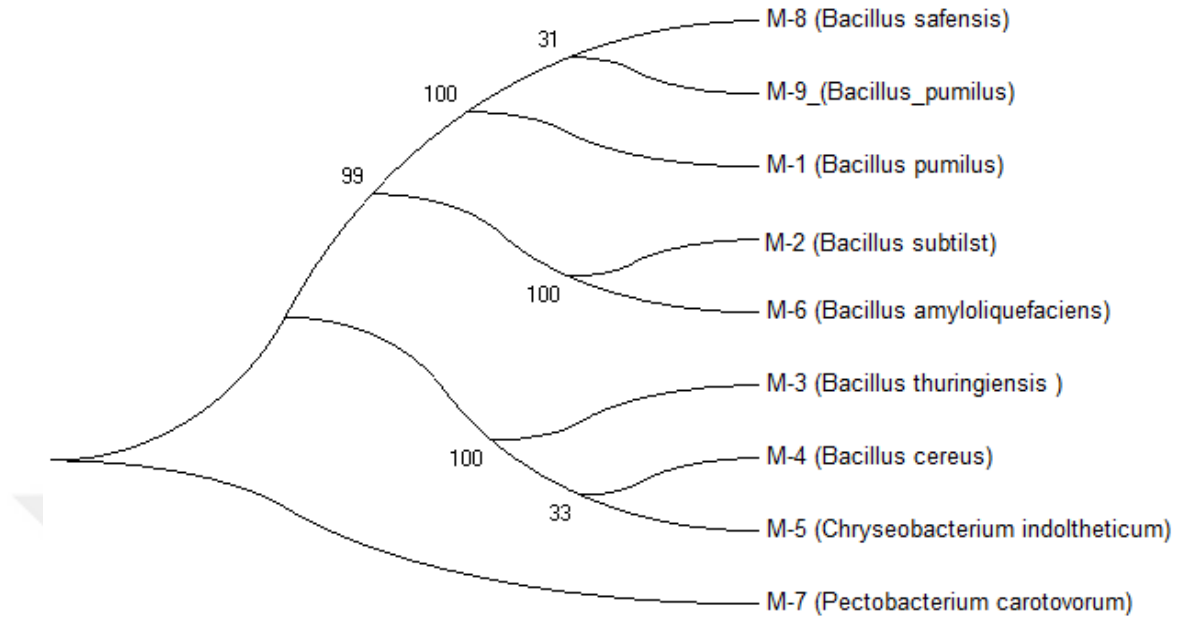
Yağ asidi metil ester (MIS) yöntemi ve 16S rRNA gen dizilerinin kullanılarak yapılan analiz sonuçları karşılaştırıldı. Bu iki yöntem bakterileri tanılamada ve karakteristik özellikler belirlemede en çok tercih edilen metotlardır. Karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. MIS ve 16S rRNA tanılama sonuçlarının karşılaştırılması

Bakteri izolatları	MIS tanı sonucu	16s rRNA tanı sonucu Bakteri tanısı
M1	<i>Bacillus pumilus</i>	%100 <i>Bacillus pumilus</i>
M2	<i>Bacillus subtilis</i>	%100 <i>Bacillus subtilis</i>
M3	<i>Bacillus cereus</i>	%100 <i>Bacillus thuringiensis</i>
M4	<i>Bacillus cereus</i>	%100 <i>Bacillus cereus</i>
M5	<i>Chryseo bacterium indoltheticum</i>	%100 <i>Chryseo bacterium indoltheticum</i>
M6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	%100 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
M7	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	%100 <i>Pectobacterium carotovorum</i>
M8	Tanılanamadı	%100 <i>Bacillus safensis.</i>
M9	<i>Bacillus pumilus</i>	%100 <i>Bacillus pumilus</i>

4.3.6. Filogenetik ağaç

16S rRNA genine ait hizalama sonuçları kullanılarak izolasyonu yapılan türlerinin evrimsel analizi yapıldı. İzole edilen türlerinin evrimsel yakınlıklarını belirlemek için Komşu Birleştirme (Neighbor-joining tree) yöntemi 1300 tekrarlı dizi kullanılarak Şekil 4.4'te görülen filogenetik ağaç oluşturuldu.

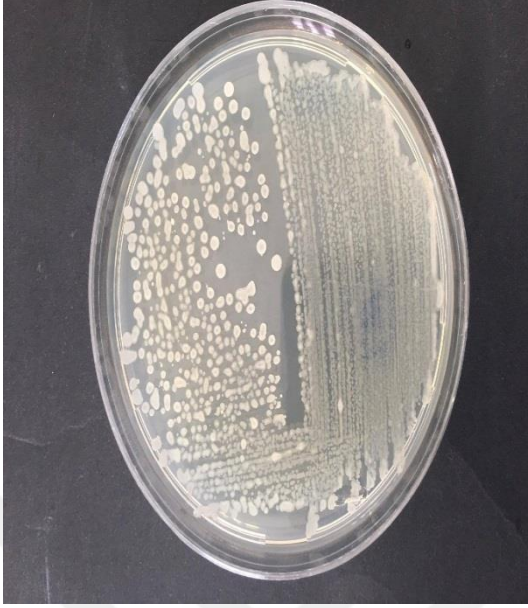


Şekil 4.4. Bakteri izolatlarının akrabalıklarının filogenetik ağaçta gösterimi (Neighbor-joining tree)

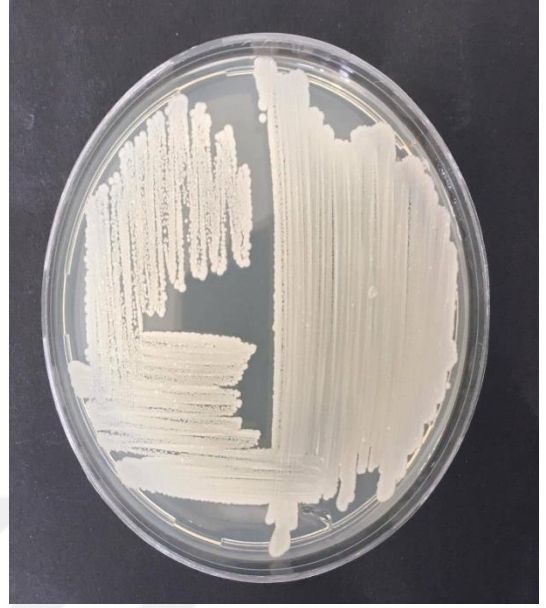
Biyoinformatikte, komşu birleştirme, 1987'de Naruya Saitou ve Masatoshi Nei tarafından oluşturulmuş filogenetik ağaçların oluşturulması için aşağıdan yukarıya (aglomeratif) bir kümeleme yöntemidir. Genellikle DNA veya protein sırası verilerine dayanan ağaçlar için kullanılır, algoritma ağacın oluşturulması için her bir çift takson arasındaki (örn. Türler veya diziler) mesafenin bilgisi gerektirir.

4.3.7. Bakterilerin petriye ekilmesi ve morfolofik analizleri

Kültüre alınan bakterilerin çizgi ekim yöntemi ile çizilmiştir. Burada saf koloni yapılarına bakılmış ve yapılan çalışmalar bu kolonilerden devam edilmiştir. Şekil 4.5'te saf koloni olarak elde edilmiş bakterilerin katı kültür ortamındaki koloni yapıları gösterilmiştir.



M 1



M2



M3

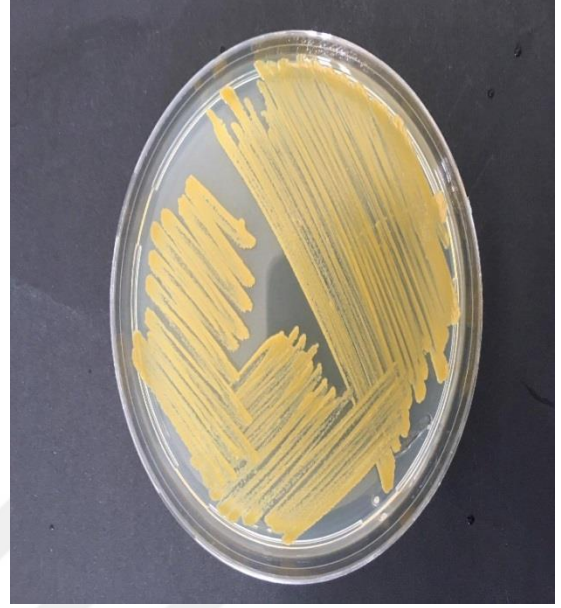


M 4

Şekil 4.5. Bakterilerin petriye çizgi ekim yöntemi ile görüntüleri



M 5



M6

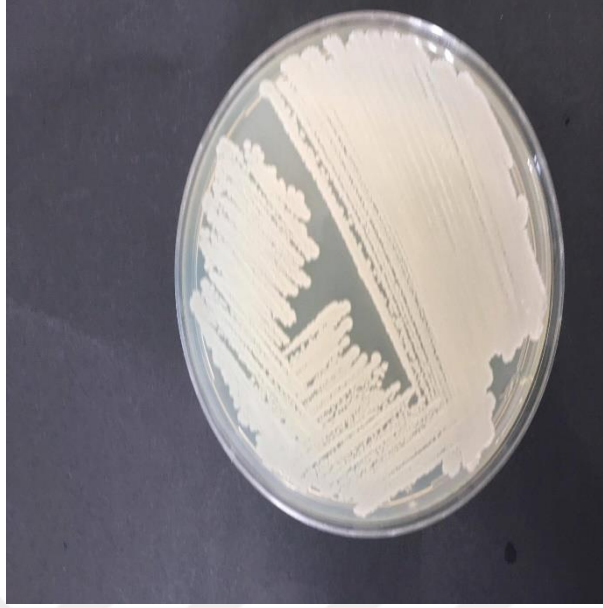


M 7



.M8

Şekil 4.5. (devam)

*M 9*

Şekil 4.5. (devam)

4.4. Bakterilerin Kitinaz ve Fitaz Aktivite Sonuçları

4.4.1. Kitinaz aktivitesi sonuçları

İzolasyonunu ve tanılaması yapılan bakteri izolatlarının normal şartlar altında (laboratuvar sıcaklığında) aktiviteleri ölçüldü. Kitinaz enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Maruldan izole edilmiş bakterilerin kitinaz enzim aktivite sonuçları

Bakteri izolatları	Kitinaz Enzimi Aktivite Sonuçları(EU/MI)
M1	0,195
M2	0,224
M3	0,230
M4	0,228
M5	0,186
M6	0,264
M7	0,214
M8	0,256
M9	0,273

4.4.2. Fitaz aktivitesi sonuçları

İzolasyonunu ve tanılaması yapılan bakteri izolatlarının normal şartlar altında (laboratuvar sıcaklığında) aktiviteleri ölçüldü. Fitaz enzimi aktivite sonuçları Çizelge 4.7’te verilmiştir.

Çizelge 4.7. Maruldan izole edilmiş bakterilerin fitaz enzim aktivite sonuçları

Bakteri izolatları	Fitaz EnzimiAktivite Sonuçları(EU/mL)
M1	43,98
M2	37,51
M3	73,23
M4	40,19
M5	51,57
M6	59,16
M7	55,14
M8	43,31
M9	34,83

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Erzurum da toplanan ticari marullardan 9 farklı koloni yapısına sahip strain izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyel strainlerin moleküller 16S rRNA yöntemi MIS analizi yöntemleri kullanılarak tanılama yapılmıştır. MIS tanı sonuçları ve 16S rRNA sonuçları karşılaştırıldığında MIS tanı sonuçlarının mikroorganizmayı tanılamak için cins seviyesinde tespit için yeterli olduğu gözlenirken tür düzeyinde tanılamada kesin sonuçlar vermediği gözlenmiştir. 16S rRNA sonuçlarının tür düzeyinde tanılamada daha etkili ve kesin sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen mikroorganizmaların büyük bölümünün *Bacillus* cinsi organizmalar olduğu tespit edilmiştir. Bu cinsin üyeleri; üreme koşulları ve metabolik ihtiyaçlar ile DNA baz kompozisyonlarındaki farklılıklarından dolayı büyük oranda çeşitlilik gösterir (Adıgüzel 2006). Yaptığımız çalışma sonucunda da benzer bulgulara ulaşılmış olup, elde ettiğimiz *Bacillus* grubu mikroorganizmalar ve diğer gruplar arasında morfolojik, biyokimyasal ve genetiksel farklılıklar gözlenmiştir.

İzolatların tanınması için ilk olarak yağ asit profillerini kullanan mikrobiyal tanılama sistemi (MIS, MIDI Sherlock v.6.0) kullanılmıştır. Bu sistem ile izolatların yağ asit profilleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre izolatlar gruplandırılmış ve yağ asitleri karşılaştırılarak karakteristik özellikleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

MIS sistemi Sherlock 6.0 kütüphanelerine bakılarak karşılaştırma yapılmıştır. 16S rRNA sonuçları ile MIS sonuçları elde edilen tanılama sonuçları karşılaştırılmış ve benzerlik durumları gösterilmiştir.

M1 ve M9 izolatları, yağ asit profilleri bakımından *Bacillus pumilus* olarak tanınmıştır. İzolatlarda en yoğun bulunan yağ asidi C15:0 iso olmuştur. Yoğun olarak bulunan diğer yağ asitlerinin ise; C15:0 anteiso, C17:0 iso ve C17:0 anteiso oldukları belirlenmiştir. C15:0anteiso ve C17:0 anteiso yağ asitleri *B. cereus* izolatlarına göre çok fazla bulunmaktadır. Bu oranlar Kaneda (1977)'nin ve Song *et al.* (2000)

çalışmasındaki *B. pumilus* izolatları ile farklılık göstermektedir. Yapılan 16S rRNA sekans sonuçları da aynı sonucu vermiştir. M1 ve M9 örnekleri *Bacillus pumilus* suşları olarak tanılanmıştır.

M2 izolatu, yağ asidi profili bakımından *Bacillus subtilis* olarak tanılanmıştır. En fazla bulunan yağ asidi C16:0 olmuştur. Bunun dışında C17:0iso yağ asitleride bol miktarda bulunmaktadır. Yapılan 16 S rRNA sekans sonucunda M2 straini *Bacillus pumilus* olarak tanılanmıştır.

M3 ve M4 izolatları, *Bacillus cereus* olarak tanılanan izolatları oluşturmaktadır. Bu grupta en fazla bulunan yağ asiti C15:0 iso olup, Yoğun olarak bulunan diğ er yağ asitlerinin ise; C16:0, C17:1iso ve C17:0 iso oldukları belirlenmiştir. Bu oranlar Kaneda (1977)'nin ve Song *et al.* (2000) çalışmasındaki *B. cereus* izolatları ile uygunluk göstermektedir. Yapılan 16S rRNA dizi analizi sonucunda M3 örneğ i *Bacillus thuringiensis* olarak tanılanmıştır. Bu sonuç yağ asidi metilesterleri analizi (MIS) sonucu ile uyuşmamaktadır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda M4 örneğ i *Bacillus cereus straini* olarak tanımlanmıştır.

M5 izolatu, *Chryseobacterium-indolthericom (flavobacterium)* olarak tanılanmıştır. Bu grupta en fazla bulunan yağ asitleri C16:0, C17:0iso ve C18:1 yapısına sahiptir. Bu örneğ in 16S rRNA sonucu M5 straini *Chryseobacterium* olarak tanılanmıştır

M6 izolatu, MIS sonucunda *Bacillus amyloliquefaciens* olarak karakterize edildi. Yağ asidi bakımından en fazla bulunan yağ asiti C15:0 olarak karakterize edildi. Bol miktarda bulunan diğ er yağ asitleri C16:0, C16:1 ve C17:0'dır. 16S rRNA analiz sonucunda *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanılandı. Yağ asidi metil ester (MIS) sonucu ile 16 s rRNA sonucu arasında paralellik vardır.

M7 izolatu, MIS sonucunda *Pectobacteriumcarotovorum* olarak karakterize edildi. 16S rRNA analiz sonucunda *P. carotovorum* olarak tanılanmıştır.

M8 izolatu, yağ asidi profilleme sistemi olan MIS sisteminde yağ asidi profili tam olarak tespit edilememiştir. Bunun nedeni bu sistemin kütüphanesinin yenilenmemiş olması ve bütün bakteri izolatlarının bulunmaması veya sistem için numune hazırlanırken yeterli konsantrasyon sağlanamamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu örnek yapılan 16S rRNA analizi sonucunda *Bacillus laevolacticus* olarak tanılanmıştır.

MIS analiz sonuçları ile 16S rRNA analiz sonuçlarını karşılaştırdığımızda sonuçların bazen uyuşmadığını görmekteyiz. MIS sistemi eski ve güvenilirlik oranı düşüktür. Bunun nedeni yağ asidi kütüphanesinin dar olması, kütüphanenin sürekli yenilenmesi gerektiği ve tanılanamamış birçok türün bulunması nedeni ile sonuçların tanılanma amacı ile değil mikroorganizmaların karakteristik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile kullanılması daha verimli sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır. Yağ asidi analizi sonucu elde edilen yağ asidi profilleri ve bakteri strainlerinin benzerlikleri Barış (2009) ve Kotan (2002)'ın yaptığı çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

16S rRNA yöntemi son yıllarda üzerinde çalışılan ve geliştirilmekte olan bir yöntemdir. Yapılan moleküler çalışmalar ve canlıların sekans dizilerinin belirlenmesi ile DNA ve cDNA kütüphaneleri oluşturulmaktadır. Bu kütüphanelerde tanılanan gen dizileri depolanmaktadır. Biyoinformatiğinde bu çalışma alanına eklenmesi sonucu bu diziler bilgisayar ortamında karşılaştırılıp daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır.

İzole edilen mikroorganizmaların büyük bölümünün *Bacillus* cinsi organizmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu cinsin üyeleri; gerek üreme koşullar ve metabolik ihtiyaçlar gerekse DNA baz kompozisyonlarındaki farklılıklardan dolayı büyük çeşitlilik gösterirler (De Souza and Martins 2001). Yapılan bu çalışmada sonucunda elde edilen *Bacillus* grubu mikroorganizmaların morfolojik, biyokimyasal ve genetiksel özellikleri bakımında birbirinden farklı yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmaları ayırt etmek için yapılan konvansiyonel test sonuçlarına bakıldığında tüm mikroorganizmalar katalaz pozitif olduğu, *Pectobacterium carotovorum* hariç

diğer bütün izolatların KOH testi ve gram boyama sonuçları pozitif çıkmıştır (Çizelge 4.3).

Sadece morfolojik ve biyokimyasal özellikler göz önüne alındığında yapılan sınıflandırmada kesin ve tam bir tanı vermediğinden, bu çalışmalara yanında bazı fenotipik ve genotipik yöntemlerinde yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Guillorit *et al.* 1996; Mora *et al.* 1998; Gümüşel 2002). Bakteriyel strainlerin familya, cins ve tür seviyesinde tespitinde yağ asidi metil esterleri analiz yöntemi, (FAMEs), metabolik (Biolog Microplate Assay) ve genomik (PCR) profillemeye yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden 16S rRNA ve 16S-23S rDNA baz dizi analizi yöntemi özellikle kültüre edilmemiş mikroorganizmaların sınıflandırılmasında bilim dünyasına önemli avantajlar sağlamıştır (Lee *et al.* 1997; Buyer 2002b; Goto *et al.* 2003). Tanı ve karakterizasyonda birçok yöntemin birlikte kullanılması sonuçların güvenilirlik derecesini arttırdığı ve bir metotla tanılanmayan özelliğin diğer metotla tespit edilebildiğini göstermiştir (Adıgüzel 2006).

Evrimsel uzaklık verilerinden filogenetik ağaçları yeniden oluşturmak için komşu birleştirme yöntemi denilen yeni bir yöntem önerilmiştir. Bu yöntemin ilkesi, yıldızlı ağaçtan başlayarak OTU'ların kümelenmesinin her aşamasında toplam dal uzunluğunu en aza indirgeyen operasyonel taksonomik birimlerin (OTU'ların [= komşuları]) çiftlerini bulmaktır. Bu yöntemi kullanarak dal uzunlukları ve kısacık bir ağacın topolojisi hızlı bir şekilde elde edilebilir. Bilgisayar simülasyonunu kullanarak, bu yöntemin doğru kök salmayan ağacı elde etmede beş ağaçlandırma yöntemiyle karşılaştırılması: ağırlıksız çift grup yöntemi, Farris yöntemi, Sattath ve Tversky yöntemi, Li'nin yöntemi ve Tateno Ve arkadaşlarının modifiye Farris yöntemi. Yeni komşu birleştirme yöntemi ve Sattath ve Tversky'nin yöntemi genel olarak diğer yöntemlerden daha iyi bir yöntemdir (Saitou 1987).

Doğru filogenetik ağacı elde etmek için çeşitli ağaç yapım yöntemlerinin göreceli etkinlikleri bilgisayar simülasyonu kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemler; Fitch-Margoliash (FM), maximum-parsimony (MP), maximum-likelihood (ML), minimum-

evrim (ME) ve komşu-birleştiren (NJ) yöntemleridir. Her biri 300 veya 600 nükleotid uzunluğunda olan altı DNA dizisinin evrimsel değişikliklerini simüle edilmiştir. Nükleotid ikamesinin sabit ve değişken oranları düşünülmüştür. Üretilen DNA dizileri, beş ağaç yapım yöntemini uygulayarak filogenetik ağaçları yeniden yapılandırmak için kullanmışlar ve elde edilen ağaçlar model (doğru) ağaç ile karşılaştırmış. Bu işlem her vakada 50 kez tekrarlanmış ve aşağıdaki sonuçları elde etmişler: (1) FM yöntemi için doğru ağacın elde edilme verimliliği, diğer yöntemlerinkinden oldukça düşüktür. (2) NJ ve ME yöntemleri doğru ağacın elde edilmesinde yüksek bir performans göstermiş ve nispi etkinlikleri birbirine benziyormuş. (3) Uzak metotlar (NJ, FM ve ME) için, düzeltilmiş nükleotid ikameleri kullanılarak elde edilen sonuçlar, farklı dallar arasında ikame oranı büyük oranda değiştiği zaman nükleotid farklarını kullanarak elde edilenlerden çok daha iyi sonuçlar verdi. (4) ML yöntemi, sabit bir nükleotid değişimi oranı varsayıldığında NJ ve ME yöntemlerinden biraz daha düşüktü ancak, evrimsel hız dallar arasında büyük ölçüde değiştiğinde, son iki yöntemden biraz daha iyi sonuçlar vermiştir. Hesaplamanın zamanını göz önüne alırsak, NJ (Neighbor-joining) metodu tercih edilen bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir (Saitou and Imanishi 2017). Bu çalışmada NJ yöntemi ile çizilen ağaç şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Son yıllardaki enzim endüstrisinde görülen hızlı gelişmeler, modern biyoteknolojideki evrim sayesinde. Enzimler, ilk çağlardan beri tabiatta peynir, maya, şarap, sirke, bira gibi içecek ve gıdaların ayrıca deri, keten, çivit mavisini vb. ürünlerin üretiminde kullanılmıştır (Kırk *et al.* 2002).

Biyoteknolojik evrim süreci başlamadan önce, enzimlerin saf veya iyi bir şekilde dizayn edilmiş formları kullanılmamaktaydı. 20. yy'ın son dönemlerinde fermentasyon teknolojilerinin geliştirilmesi ve özellikle enzimlerin üretimi için seçilen uygun organizma suşlarının kullanılmasıyla çok büyük saflıkta, iyi karakterize edilmiş ve büyük ölçekli enzim üretimi sağlanmıştır. Bu bilimsel gelişmeler sayesinde; deterjan, tekstil, nişasta endüstrilerini içine alan gerçek endüstriyel ürünlerin ve süreçlerin içine enzimler girmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi üretim yöntemlerini ilerleterek daha

önce kolay bir şekilde üretilmeyen enzimlerin daha kolay ve saf bir şekilde elde edilmesini ve ticarileştirilmesini sağlamıştır (Kırk *et al.* 2002).

Ayrıca modern biyoteknolojideki yeni gelişmeler; protein mühendisliği ve endüstriyel enzimlerin iyileştirilmesinde yeni çalışmalar yapılmış ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler enzimlerin yeni/farklı aktivitelerini ortaya koymak, yeni dönem şartlarına adapte etmek ve bunların endüstriyel amaçla kullanımlarını daha da geniş bir alana yaymayı mümkün kılmıştır (Kırk *et al.* 2002).

Enzimler, uygun oranlarda yüksek spesifite ile kimyasal reaksiyonları katalizler. Bu reaksiyonlar bütün canlı organizmaların metabolizmalarının temelidir. Enzim endüstrileri verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümleri sağlamak için mükemmel fırsatlar sağlamıştır (Pandey *et al.* 2008).

Enzim teknolojisinin giderek yaygın bir kullanım alanı bulması, üretilen ürünlerin ekonomik değerinin yüksek olması, kalıntı miktarının daha az olması vs. gibi avantajları ile ilgili biyoteknolojik açıdan; bu endüstriyel enzimlerle ilgili bakteri potansiyellerinin tespiti oldukça önem kazanmıştır. Bu yönden yapılan tüm bakteriyolojik çalışmalarda enzim üretim kapasitelerinin tespiti endüstriye bu bakterilerin sunulmaları açısından gereklidir. Yaptığımız çalışmada, bu bakterilerin, fitaz enzim aktivitesi gösterip göstermedikleri araştırılmıştır. M1, M2, M4, M8, M9 suşları düşük fitaz enzimi aktivitesi göstermelerine (ortalama 39.98 EU/mL) karşın, M3 en yüksek (73,23 EU/mL), M5, M6, M7 ortalama olarak (55,29 EU/mL) değer göstermişlerdir. Bu değerlerin yüksek olmamalarının substratı iyi kullanamamaları ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Bu bakterilerde kitinaz enzimi aktivitesi göstermeleri beklenmesine karşın, bakterilerin mutasyon ve gen aktarımlarının sürekli olması nedeniyle Düşük aktivite gösterebilecekleri düşünülerek araştırılmıştır. Bulunan sonuçlar düşük aktivite olduğunu göstermektedir. M1, M5, M7, suşları bakteriler arasında kitinaz aktivitesini en düşük gösteren grup olmuştur. En yüksek aktivite gösteren M9 suşu olmuştur.

Ekonomik öneme sahip bir bitki olan marulun bozucu etkiye sahip olan mikroorganizmaları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlanması ile birlikte literatüre yeni mikroorganizmalar kazandırılmıştır. Tanımlanan Bu bakterilerin enzim aktivitelerine bakılmış olup, yüksek fitaz ve kitinaz aktivitesine sahip olan bakteriler teknolojide değerlendirmek üzere tavsiye edilecektir. İyi tarım uygulamaları kapsamında alandan izole edilen mikroorganizmalardan geliştirilen mikrobiyal gübrelerin kullanımı son yıllarda artmıştır. Bu nedenle mikrobiyal gübreye yönelim ortamdaki mikroorganizma yükünün belirlenmesi bu organizmaların aktivitesinin tespiti sürdürülebilir tarımda organik gübredeki mikrobiyal yük açısından önemlidir. Bu alanda geliştirilecek olan mikrobiyal gübre için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden izole edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Altuntaş, E.G., 2011. Bakteriyosin Üreten *Pediococcus* Sp. 13 Suşunun 16s Rna İle Tanımlanması Ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Aygan, A., Karcıoğlu, L., and Arıkan, B., 2011. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. African Journal of Biotechnology. 10(5):789-796.
- Aygün, H., 2012. Bazı *Bacillus* İzolatlarının 16s rDNA Bölgelerinin Moleküler Ve Biyoinformatik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi.
- Bal, T., 2012. Aşkale (Erzurum) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu Ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Tanısı, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Barredo, J.L., 2005. Microbial Enzymes and Biotransformations. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Gatto, G.J., Denizli, A., Özden, A.K., 2014. Biyokimya Palme Yayıncılık, 7. Baskı, Ankara.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. Biotechnology Advances 18, 355-383.
- Bhushan, B. and Hoondal, G.S. 1999. Effect of Fungicides, Insecticides and Allosamidin on a Thermostable Chitinase from *Bacillus* sp. BG-11, World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 403-404.
- Bruno, W.j., Socci, N.D., Halpern, A.L., 2000. Weighted Neighbor Joining: A Likelihood-Based Approach to Distance-Based Phylogeny Reconstruction. Mol Biol Evol 17 (1): 189-197
- Buyer, J.S., 2002b. Rapid sample processing and fast gas chromatography for identification of bacteria by fatty acid analysis. Journal of Microbiological Methods, 51, 209-215.
- Dadaşoğlu, F., 2013. Artvin Erzincan Erzurum Iğdır İllerinde Bazı Meyve Ve Sebzelerde Yumuşak Çürüklüğe Sebep Olan Bakterilerin İzolasyonu Klasik Ve Moleküler Yöntemler İle Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Davarcı, E., 2017. Endüstriyel Öneme Sahip Olan *Bacillus* Sp.'Nin Çeşitli Kaynaklardan İzolasyonu Ve 16s Rdna Yöntemi İle Karakterizasyonu Ve İdentifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- De Souza, A.N., Martins, M.L.L., 2001. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. Brazilian Journal of Microbiology, 32, 271-275.

- Ediz, N., ve Beyatlı, Y., 2005. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5:1-22.
- Ensari, N.Y., 2002. Moleküler Biyoloji. Dicle Üniversitesi Yayınları , Diyarbakır.
- Farrab, W.E. and Rebolli, A.C., 2006. The Genus *Bacillus* Medical. Dworkin, M.(Editor-in-Chief), The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Springer Science, volume 4, 609–630, New York, USA.
- Ghorbel, R. E., Maktouf, S., Massoud, E. B., Bejar, S., and Chaabouni, S. E., 2009. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. Appl Biochem Biotechnol, 157:50-60.
- Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., Yokota, A., 2003. Alicyclobacillus pomorum sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endosporeforming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus Alicyclobacillus. Int J Syst Evol Microbiol., 53(5), 1537-1544.
- Guillorit-Rondeau, C., Malandrin, L. and Samson, R., 1996. Identification of two serological flagellar types (H1 and H2) in Pseudomonas syringae pathovars. Eur J Plant Pathol., 102, 99 104.
- Gümüşel, F., 2002. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü. Kocaeli sanayi için teknolojik öngörü raporu, Kas m 2002, s. 73-135.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2010 Biyokimya Kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2. baskı , İstanbul.
- Heshmati, B., 2013. Erzurum’da Tüketimine Sunulan Tavuk Eti Ve Karkas Örneklerinde Salmonella Spp. Varlığının Klasik Kültür Tekniği, Yağ Asidi Metil Esterleri (MIS) Yöntemi İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T., 1993. Manuel of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Ito S., 1997. Alkaline cellulase from alkaliphilic Bacillus: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. Extremophiles, 1:61-66.
- Kaneda, T., 1977. Fatty Acids of the Genus *Bacillus*: an Example of Branched-Chain Preference. Bactriuoloical Reviews, 41(2), 391-418.
- Karagöz, K., 2013. Erzurum İli Patates Tarlalarından İzole Edilen Bitki Patojeni Streptomyces Türlerinin Tanısı Ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Karagöz, K., Kotan, R., 2010. Bitki gelişimini teşvik eden bazı bakterilerin marulun gelişimi ve Bakteriyel yaprak lekesi hastalığı üzerine etkileri. Türk biyolojik Mücadele Dergisi 1 (2): 165-179
- Karagöz, S., 2009. Bazı Pgpr Ve Biyoajan Bakterilerin Marulun Gelişimi Ve Marul Yaprak Lekesi Hastalığı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi
- Karapınar, E., 2002. Pamuklu Mamullerin Hidrofilileştirilmesinde Enzim Kullanımı, Yüksek Lisans , Fen Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi.
- Karataş, M., 2014. Tunceli Bölgesinde Satışa Sunulan Geleneksel Şavak Tulum Peynirlerinin *Cronobacter Spp.* Yönünden İncelenmesi, 16s rRNA Dizi Analizi İle Alt Tür Belirlemesi Ve Suşların Antibiyotik Dirençliliğinin Saptanması. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tunceli Üniversitesi.

- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J., 1998. Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2079-2085.
- Kırk, O., Borchert, T. V., and Fuglsang, C. C., 2002. Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion In Biotechnology*, 13: 345-351.
- Korpole S., Sharma R., and Verma D., 2011. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulose producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. *Indian J Microbial*, 51(4):531-535.
- Kotan, R., 2002 doğu Anadolu Bölgedinde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından İzole Edilen Patojenik ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metodlar ile Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması, Doktora Tezi Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Bioinformatics* 10 (2): 189-191.
- Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Lee, J.S., Chun, C.O., Hector, M., Kim, S.B., Kim, H.J., Park, B.K., Joo, Y.J., Lee, H.J., Park, C.S., Ahn, J.S., Park, Y.H., Mheen, T.I., 1997. Identification of *Leuconostoc* strains isolated from kimchi using carbon-source utilization patterns. *The Journal of Microbiology*, 35(1), 10-14.
- Lo, H. F., Lin, L. L., Chen, H. L., Hsu, W. H., and Chang, C. T., 2001. Enzymatic properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli* *Process Biochemistry*. 36:743-750.
- Macfaddin, J.F., 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Third Edition, USA.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2010. Brock. Palme yayıncılık, Ankara.
- MIS, 2005. *MIS Operating Manual*. 125 Sandy Dr. Newark, DE.
- Mikicinski A., Sobiczewski P., Sulikowska M., Pulawska J. and Treder J., 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology* 158: 201-209.
- Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P.L., 1998. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains. *Res Microbiol.*, 149(10), 711-722.
- Özşahin, A.D., 2006 Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzole Edilen *Bacillus* Sp.'den Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimler enstitüsü. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R., Larroche, C., 2008. *Enzyme Technology*. Springer Science and Business Media, Inc. and Asiatech Publishers, Inc.
- Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J., editörler Tekeli, A., Ustaçelebi, U., 2006. *Moleküler Mikorbiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları*. Palme yayıncılık. Ankara
- Prakash, O., And Jaiswal N., 2010. α -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biotechnol*, 160:2401-2414

- Rezaei, R., and Taghavi, S., M., 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of Iranian soft rot bacterial isolates from different hosts. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 194-204
- Saitou, N., and Imanishi, T., 2017. Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree. *Mol. Biol. Evol.* 6(5):5 14-525.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4):406-25
- Samantir, N., 2014. Şalgam Suyundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16s rRNA İle Tanımlanması Ve Bazı Gelişme Parametrelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Sekin, Y. , Karagöz, N. , 2004 Gıda Endüstrisi İçin Temele Esaslar ve Uygulamalar. Literatür Yayınları, 1 s, İstanbul.
- Shimizu, M., 1992. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8): 1266-1269.
- Song, Y., Yang, R., Guo, Z., Zhang, M., Wang, X. and Zhou, F., 2000. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endosporeforming bacilli. *Journal of Microbiological Methods*, 39, 225–241
- Şahin, Ö., 2013. Yağ Asidi Ve 16s rRNA Sekans Analizleri İle Tanımlanan Lityum, Çinko Ve Mangan Dirençli Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale Üniversitesi.
- Şenol, M., 2014. Kitinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve *Bacillus Thermoamylovorans* St-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Türküzü, D., 2014. Marul ve Rokka Sebzelerine Uygulanan Bazı Dezenfektanların Sebzelerin C Vitamini İçerikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans. Fen Bilimleri Enstitüsü Gazi Üniversitesi.
- Ustaçelebi, U., 1999 Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara.
- Ünal, M., 2012. Hücre Biyolojisi, Marmara üniversitesi yayınevi, 74 s, İstanbul
- Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.
- Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., and Pyun, R.Y. 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes From the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26, *Enzyme and Microbial Technology* 35: 147-153.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum'un Çat ilçesine bağlı parmaksız köyünde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Parmaksız Köyü İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini ise Hınıs Anadolu Lisesinde tamamladı. 2009 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2014 yılında tamamladı. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisansa devam etmektedir.

