



***PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*'UN İZOLASYONU,
16S rRNA İLE TANILANMASI, BAKTERİNİN FİTAZ
ENZİM AKTİVİTESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Safa Mustafa KILIÇ

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

***PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*'UN İZOLASYONU, 16S
rRNA İLE TANILANMASI, BAKTERİNİN FİTAZ ENZİM
AKTİVİTESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Safa Mustafa KILIÇ

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



PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM'UN İZOLASYONU, 16S rRNA İLE
TANILANMASI, BAKTERİNİN FİTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ve
KARAKTERİZASYONU

Doç.Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Safa Mustafa KILIÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/03/2017 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. M.Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Doç.Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Emre İLHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **04.05/2017** tarih ve **18/15** nolu kararı ile onaylanmıştır.

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

***PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*'UN İZOLASYONU, 16S rRNA İLE TANILANMASI, BAKTERİNİN FITAZ ENZİM AKTİVİTESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Safa Mustafa KILIÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Fitazlar; hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Fakat ticari amaçla kullanımları ve biyoteknolojik uygulamalar için ümit vaat edici olanı, mikrobiyal kaynaklı olanlardır. Myo-inositol fosfatların hazırlanmasında kullanılan fitazlar, gıda sanayinde, toprağı iyi hale getirmede ve kâğıt endüstrisinde de tercih edilmektedir. Biyoteknoloji ise kullanım alanları artan fitaz enzimleri ile birlikte, günümüzde kullanılan ve ilerleyen yıllarda da bu enzimleri gerek üretmede gerekse özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak oldukça etkili bir araçtır.

Bu çalışmada, maruldan izolasyonu yapılmış olan *Pectobacterium carotovorum* suşunun moleküler olarak tanılanması ve yeni bir mikrobiyal kaynaktan fitaz enzimi üretimi ve enzimin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bakteriden elde edilen fitaz enziminin aktivitesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Suşların izolasyonu, Nutrient agar (Oxoid) kullanılarak 26°C'de 48 saat inkübasyondan sonra yapılmıştır. 16S rRNA yöntemi ile tanılanmıştır. *Pectobacterium carotovorum*'dan üretilen fitaz enziminin pH 8,0'de en iyi aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. *Pectobacterium carotovorum*'a ait fitaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunmuştur. Bu çalışmada *Pectobacterium carotovorum* bakterisinde fitaz enzimi aktivitesi ilk kez çalışılmıştır. Bu sonuçlara göre bu bakterinin ürettiği enzimin karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir.

2017, 41 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pectobacterium carotovorum*, 16S rRNA, fitaz, karakterizasyon

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION OF *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*, IDENTIFICATION BY 16S rRNA AND THE CHARACTERIZATION OF THE BACTERIUM BY PHYTASE ENZYME ACTIVITY

Safa Mustafa KILIÇ

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Phytases can be produced by animals, plants and microorganisms. However, the most promising ones for commercial uses and biotechnological applications are those of microbial origin. Phytases are also used in the preparation of myo-inositol phosphates in the food industry, soil remediation and in the paper industry. Biotechnology, along with the increased use of phytase enzymes, is a highly effective technology that is used today and will be used in the future to produce these enzymes and improve their properties.

The aim of this study was to conduct the molecular identification of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from lettuce, to produce phytase enzyme production from a new microbial source and the characterization of this enzyme. The activity and characterization of the phytase enzyme obtained from the bacterium was carried out. Isolation of strains was carried out following the incubation at 26 ° C for 48 hours using Nutrient agar (Oxoid). The identification was performed using the 16S rRNA method. It was determined that the phytase enzyme produced from *Pectobacterium carotovorum* showed the best activity at pH 8.0. The optimum temperature of the phytase enzyme obtained from *Pectobacterium carotovorum* was 60 ° C. In this study, phytase enzyme activity was studied for the first time in the *Pectobacterium carotovorum* bacterium. According to these results, it is considered that use in industrial field may be suitable due to the characteristics of the enzyme produced by this bacterium.

Keywords: *Pectobacterium carotovorum*, 16S rRNA, Phytase, Characterization

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Fen Fakültesi Biyoloji Bölümündeki değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümündeki değerli hocam Sayın Doç. Dr. Recep KOTAN'a ve laboratuvar çalışmalarımda her daim yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme, minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Safa Mustafa KILIÇ

Mart, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Kullanılan Materyaller, Cihazlar ve Çözeltiler	13
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	13
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	14
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler.....	14
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	14
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Stok kültürden bakterinin ekilmesi.....	18
3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	18
3.2.3. Kültür özelliklerinin belirlenmesi	19
3.2.4. Bazı biyokimyasal testlerin yapılışı	19
3.2.4.a. Katalaz testi	19
3.2.4.b. Sitrat testi.....	20
3.2.4.c. İndol testi	20
3.2.4.d. Fosfataz testi.....	21
3.2.4.e. Gram özelliklerinin belirlenmesi	21
3.2.5. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması	22
3.2.5.a. Bakteri izolatların DNA izolasyonu	22
3.2.5.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması.....	22
3.2.5.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	23
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	24
3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	24

3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1. Kullanılan Mikroorganizmanın Morfolojik Özellikleri	26
4.2. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	26
4.3. Bazı Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	27
4.4. Moleküler Yöntem ile <i>P. carotovorum</i> 'un Tanılanması	28
4.4.1. DNA izolasyon sonucu.....	28
4.4.2. PCR Sonuçlarının jel görüntüsü	28
4.4.3. Dizi analizi sonuçları.....	29
4.5. Fitaz Aktivitesi Sonuçları	32
4.5.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları	32
4.5.2. <i>P. carotovorum</i> 'dan elde edilen fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları..	33
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	34
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>P. carotovorum</i> 'un koloni ve hücre morfolojisi	27
Şekil 4.2. DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü	28
Şekil 4.3. PCR sonuçları jel görüntüsü	29
Şekil 4.4. <i>P. carotovorum</i> izolatından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonuçları	30
Şekil 4.4. <i>P. caratovorum</i> 'un filogenetik ağaçla yerinin belirlenmesi.....	31
Şekil 4.5. <i>P. carotovorum</i> 'dan elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	32
Şekil 4.6. <i>P. carotovorum</i> 'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>P. carotovora</i> tür ve alt türleri	3
Çizelge 4.1. <i>P. carotovorum</i> 'un Morfolojik özellikleri	26
Çizelge 4.2. <i>P. carotovorum</i> 'un kültür özellikleri	27
Çizelge 4.3. <i>P. carotovorum</i> 'un bazı biyokimyasal test sonuçları	27



1. GİRİŞ

“Biyoteknoloji” kelimesi, aslında tek başına biyoteknolojiyi açıklar durumdadır. Biyoloji, canlı organizmalar ile ilgili olan kısmı; teknoloji ise var olan veya oluşan problemlere netlik kazandırmak ve daha kullanıma elverişli ürünler elde etmeyi ifade etmektedir. Bu bilgiler ışığında biyoteknoloji, canlı organizmaları kullanarak problemlere netlik kazandırmak ve daha kullanışlı ürünler oluşturmak şeklinde ifade edilebilir (Yavuz 2013).

Biyoteknoloji uygulama alanı olarak tıbbi, tarım, gıda, hayvancılık, çevre ve endüstriyel biyoteknoloji gibi 5 farklı alanda bulunmaktadır (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Mikrobiyal biyoteknolojide, bakteri ve mayalar gibi mikroorganizmaların manipülasyonu ile birçok gıdanın yapımında, işlenmesinin kolaylaştırılmasında ve ayrıca endüstriyel atıkların daha etkin temizlemesinde kullanılan enzimler ve canlıların üretilmesi mümkün olmuştur. Bol miktarda bulunan bakteri ve diğer mikroplar, birçok potansiyel biyoteknoloji uygulamasına imkân sunmaktadır. Mikrobiyal biyoteknoloji pek çok yeni uygulama üretebilen dinamik bir alandır (Thieman and Palladino 2013).

Bakterilerin çok kısa bir süre içerisinde çoğalabilmeleri, küçük bir alanda kolayca ve kontrollü bir şekilde üretilabilmeleri ve ökaryotlara kıyasla daha basit bir yapıya sahip olmaları gibi avantajlar, genetik ve biyokimya ortak çalışma sahası için uygun bir ortam sağlar (Karataş 2012).

Yaklaşık olarak 70 yıl önce Waldee (1945)’nin yaptığı bir çalışmaya göre yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* türleri ayrı bir cins olan *Pectobacterium* bünyesine dahil edilmek istenmiştir. Diğer bazı araştırmacılar da yaptıkları çalışmada pektolitik enzim üreten bu *Pectobacterium* türlerinin ayrı bir cinsten yer alması gerektiğini söylediler de günümüzde bu teklifler kabul görmemiştir. Yumuşak çürüklük grubu veya “*carotovora*” grubu gibi isimler alan pektolitik enzimler üreten bu türler fitopatolojik

özellikleri yönünden diğer *Erwinia* türlerinden farklıdırlar ve konukçu bitkide yumuşak çürüklük hastalıklarına neden olan türlerdir (Saygılı vd 2006).

Erwinia carotovora, geçmiş yıllarda *Pectobacterium* bünyesine dahil edilmek istenmiş ancak kabul görmemiş. Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde *Pectobacterium* bünyesine katılması kabul görülmüş ve bilim dünyasında *Pectobacterium carotovora* olarak adlandırılmıştır.

Fitopatojen bir bakteri olan *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* ekonomik açıdan önemli birçok bitkide yumuşak çürüklüğe neden olur (Andersson *et al.* 1999). *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (ECC) dünya genelinde en çok tahribat oluşturan sebze hastalıklarından biridir. Domates (*Solanum lycopersicum*), patates (*Solanum tuberosum*), yeşilbiber, (*Capsicum annum*) ve Çin lahanası (*Brassica campestris* subsp. *pekinensis*). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, kara leke ve yumuşak çürüklük hastalıklardan dolayı patateslerde ve sebzelerde önemli boyutlarda zararlara neden olur. *P. carotovorum* subsp. *Brasiliense* ilk olarak 2004 yılında Brezilya'da patateslerde yumuşak çürüklüğe ve kara lekeye sebep olan çok etkili ve bulaşıcı bir fitopatojen olduğu belirtilmiştir (Onkendi *et al.* 2015).

Bu “*carotovora*” içerisinde *carotovora* subsp. *carotovora*, *carotovora* subsp. *atroseptica*, *carotovora* subsp. *betavasculorum*, *carotovora* subsp. *wasabiae*, *carotovora* subsp. *odorifera*, *chrysanthemi*, *cypripedii*, *rhapontici* ve *cacticida* türleri de yer almaktadır. Karakteristik özellikleri bakımından bu gruba dahil edilen *Pectobacterium chrysanthemi*'nin farklı patovaryaları bulunmaktadır (Saygılı 2006). *Pectobacterium cypripedii* ve *Pectobacterium rhapontici* pektolitik enzim üretmemelerine rağmen yukarıda belirtilmiş olan türlerle olan akrabalıklarından dolayı bu gruba dâhil edilmiştir. *Carotovora* grubuna ait türlerin hastalık oluşturduğu bitkiler aşağıdaki çizelge 1.1. de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *P. carotovora* tür ve alt türleri

Bakteriler	Konukçu
<i>P. carotovora subsp. carotovora</i>	Konukçu dizisi geniş
<i>P. carotovora subsp. atroseptica</i>	Patates, domates
<i>P. carotovora subsp. betavascularum</i>	Şekerpancarı
<i>P. carotovora subsp. wasabiae</i>	Japon turpu
<i>P. carotovora subsp. odorifera</i>	Hindiba
<i>P. chrysantemi</i>	Konukçu dizisi geniş
<i>P. cypripedii</i>	Cypripedium orkidesi
<i>P. rhanpotici</i>	Rhubarb
<i>P. cacticida</i>	Dev kaktüs

(Saygılı 2006)

İzole edilen tür ve alttürler arasındaki farklılıklara bakıldığında; *Enterobacteriaceae* familyasına içerisinde bulunan diğer türler gibi yumuşak çürüklüğe sebep olan *Pectobacterium* türleri özellik olarak Gram (-), çubuk şeklinde, çok sayıda kamçıya sahip, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yapılan incelemelerde bu türün (*P. carotovora. subsp. carotovora*, *P. carotovora. subsp. atroseptica*, *P. carotovora. subsp. betavascularum*, *P. carotovora. sp. wasabiae*, *P. carotovora. subsp. odorifera*) tüm izolatları katalaz pozitif, oksidaz negatif, glikozu fermente eden, nitratı nitrite indirgeyen, β -galaktozidaz ve H_2S üreten, L-arabinoz, D-galaktoz, D-glukoz, gliserin, D-mannoz, D-riboz ve sukrozu kullanma yeteneğinde, üreaz üretemeyen ve adonitolden asit üretme özelliğine sahip bakterilerdir. İzolatların çoğu L-rhamnoz ve D-mannitolu kullanma kabiliyeti bulunurken dekstrini kullanma yetenekleri yoktur. Bu grupta yer alan *Pectobacterium* türleri *Enterobacteriaceae* için kullanılan standart testlerin tamamı ile test edilemediğinden dolayı taksonomisinde bir anlam kamaşası bulunmaktadır.

İzolasyon teknikleri kullanılarak; Toprakten ve bitki örneklerinden fitopatojen bakterilerin izolasyonunda kullanılan genel yöntemler bu bakteriler içinde kullanılabilir. Çürümüş bitki dokularından ve topraktan izolasyonda zenginleştirilmiş veya seçici besi yerlerinin kullanımı tercih edilmelidir (Saygılı vd 2006).

1980’li yıllarda bakterilerin tanımlanabilmesi için yeni bir standart geliştirilmeye başlanmıştır. Bakterilerin genetik kodlarının belirli bir kısmının karşılaştırılması ile aralarındaki filogenetik yakınlığının belirlenebileceği anlaşılmıştır (Woese 1987; Woese *et al.* 1985). Bakteri genomunun içerisinde bunun için belirlenmiş genler 5S, 16S ve 23S rRNA ve bu genler arasındaki kısımları içermektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda bakterilerin sınıflandırılması amacıyla en yaygın olarak kullanılan DNA bölümü 16S rRNA gen bölgesidir (Bottger 1989; Tortoli 2003; Harmsen and Karch 2004).

16S rRNA gen sekans bölgesi yaklaşık 1550 baz çifti (bp) uzunluğundadır ve değişken, korunmuş kısımlardan oluşur (Chen *et al.* 1989). 500 bp uzunluğundaki kısım ile çalışmak maliyet açısından daha uygun ve uygulanabilirliği daha kolay olduğu için sekans analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Clarridge 2004). 16S rRNA gen sekans analiz basamakları sırasıyla DNA izolasyonu, PCR aşaması, arıtma aşaması, sekans döngüsü, sekans analizi, elektroferogramların değerlendirilmesi ve verilerin yorumlanmasıdır (Clarridge 2004).

Bakteri metabolizmasında enzimler önemli bir yere sahiptir ve metabolik aktive için birçok enzim sistemine ihtiyaç duyulur.

Enzimler katalizör aktivatörlerdir. Yani bir reaksiyona hızlandırıcı etki yaparlar. Enzimler olmadan da reaksiyonlar başlayabilir. Enzimler substratlar için büyük oranda özgürlük ortaya koyarlar. Optimum pH ve sıcaklık koşullarında daha iyi aktivite gösterirler. Genellikle endüstriyel enzimlerin saflık oranları düşük olduğu için maliyeti de düşüktür. Bunun aksine bilimsel ve analitik ile tıbbi enzimler yüksek bir saflığa sahip oldukları için maliyeti fazladır.

Doğadaki enzim üreticisi mikroorganizmalara, son dönemlerde genetik mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmiş olan rekombinant mikroorganizmalarda eklenmiş bulunmaktadır. Bazı mikrobiyal enzimler hücrelerde sentezlendikten sonra hücre dışına

atılır, bazıları ise hücrede kalır. Endüstriyel enzimlerin büyük bir kısmı hücre dışına salınanlardır (Selen 2006).

Enzimler çok özgürdürler ve çok yüksek katalitik güçleri vardır. Birçok enzimin aktivite gösterebilmesi için kofaktörlere gereksinim duyarlar. Bunlar metal iyonları veya koenzim olarak adlandırılan vitaminlerdir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar. Böylelikle daha az enerji harcayarak reaksiyonu gerçekleştirmiş olurlar. Enzimler protein ve prostetik gruptan oluşur. Sadece protein kısma apoenzim, protein kısım + prostetik gruba birlikte haloenzim denir. Enzimde asıl işi yapan prostetik gruptur.

Fitaz (myo-inositol heksakisfosfat fosfohidrolaz) myo-inositol heksakisfosfat'ın (fitik asit), inorganik mono fosfat ve düşük myo-inositol fosfatlar ve birçok halde serbest myo-inositol'e hidrolizi reaksiyonunu katalizler. Temel olarak 2 tip fitaz enzimi bulunmaktadır. Bunlar; 3-fitaz (E.C. 3.1.3.8) ve 6- fitaz (E.C. 3.1.3.26)'dır. Bu sınıflandırma, enzimin bağlandığı ilk fosfat grubu tarafından yapılmıştır. 3-fitaz mikroorganizmalar için ve 6-fitaz bitkiler için reaktiftir (Powar ve Jaganatthan, 1982). Mikroorganizmaların çoğunda, bitkilerde ve hayvan dokularında fitaz aktivitesi daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Bilgin 2007).

Fitazlar, fitatın miyo-inositol halkasından fosfat gruplarının aşamalı olarak uzaklaştırılması reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir. Bu enzimler tabiatta birçok yerde bulunur ve 2000'den fazla mikrobik toprak izolatu olduğu bildirilmiştir. Katalitik mekanizmaya göre fitazlara; histidin asit fitazlar, sistein fitazlar veya mor asit fitazlar denilebilir (Wulandari 2015).

Fitazı parçalayan enzimler ile yapılan çalışmalarda yem hammaddelerinin ve insanlar için hazırlanan gıdalardaki fitat miktarını düşürmek için özellikle son zamanlarda birçok çalışma yapılmaktadır. Fitatı hidroliz eden enzimler bitkisel materyalin besleyici değerini yükseltmek için yapılması gerekir. Son zamanlardaki çalışmalarda fitaz enzimlerinin genellikle entansif hayvan yetiştiriciliği yapılan yerlerde hayvan gübresiyle

oluşan fosfor kirliliğini azaltmak maksatı ile kullanımı da gündeme getirilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğunda fitatı hidrolize eden enzimlerin fitatdan fosfor kullanımını arttırdığı ve çevrede ortofosfat birikimini büyük miktarda azalttığı gösterilmiştir (Cromwell *et al.* 1995, Simons *et al.* 1990). Ayrıca günümüzde biyoteknoloji alanındaki yapılan büyük gelişmeler sonucunda heterolog mikrobiyal ekspresyon sistemleriyle büyük miktarlarda ve düşük maliyetli fitaz üretimi de mümkün olabilmektedir.

Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda olduğunun tespit edilmesine rağmen yapılan son çalışmalarda mikrobiyal fitazların biyoteknolojik uygulamalarda iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir (Pandey *et al.* 2001; Vohra and Satyanarayana 2003).

Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilip, yapılan son çalışmalarda ticari üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* bakterisi üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolizise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi benzeri özelliklerinden ötürü bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif olabilmektedirler (Konietzky and Greiner 2004).

Son 20 yılda fitaz enzimi; besleme, çevre koruma ve biyoteknoloji alanlarında çalışan bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Fitazlar özellikle biyoteknolojik çalışmalarda büyük önemi bulunmaktadır (Lei and Stahl 2001; Vohra and Satyanarayana 2003).

Bu çalışmada, maruldan izolasyonu yapılmış olan Tarımsal Biyoteknoloji Kültür koleksiyonundan temin edilen *P. carotovorum* suşunun moleküler olarak tanımlanması ve yeni bir mikrobiyal kaynaktan fitaz enzimi üretimi ve enzimin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Andersson *et al.* (1999) yaptığı çalışmada; Bitki patojeni olan *Pectobacterium carotovorum* çoğunlukla bitki hücresi yosun giderme enzimi aracılığı ile bitki hastalıklarına yol açar. Bu çalışmada *P. carotovorum* türü SCC3193 suşunu bikiere enjete ederek çevresel strese dayanıklılığını sağlamayı amaçlamışlardır. *Pectobacterium carotovorum* bakterisinin ozmatik ve oksidatif strese duyarlı oldu ve glikojen birikiminde yetersiz olduğu bulunmuş. Sonuç olarak rekabetçi bir ortamda ve sters koşullarında hayatta kalmak için gerekli olmadığı bulunmuştur.

Waleron *et al.* (2014) *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* Genel olarak dar bir konak aralığına sahip olup en sık hindiba'dan izole edilmiştir. Araştırma 91 *Pectobacterium spp* bakterisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Afrika'da bulunan farklı sebzelerden izole edilmişlerdir. 91 suş arasından Avrupa'dan 22 suş 16s rRNA yöntemi ile *P. carotovorum* olarak tespit edilmiştir.

Nazerian *et al.* (2011) 2010 yılında Malezya'daki farklı alanlardaki bamya bitkileri üzerinde bitki patojen bakterilerin neden olduğu yoğun lezyonlara sahip koyu kahverengi, nekrotik kapsüller bulunmuştur. Pektat liyaz (*pel*) geninin PCR amplifikasyonu ve 16S -23S rRNA'nın (ITS) çoğaltılması, G (1) ve L (1) primerleriyle sırasıyla 434, 535 ve 570 bp fragmanları üretildi. Biyokimyasal testlerin sonuçları ile standart bakteriyolojik kaynaklar, PCR tabanlı *pel* geni ve ITS-PCR ürünlerinin RFLP analizi ile eşdeğerliği bakımından, tüm izolatlar *P. carotovorum* olarak tanımlandı. Bu Malezya bamyasında *P. carotovorum*'un ilk raporudur.

Kwon *et al.* (1997) 16 *Erwinia* türünün filogenetik ilişkileri, bu organizmaların 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırmalı bir analizi yapılarak araştırılmıştır. Sekans verileri komşu katılım yöntemi ile analiz edildi ve her dal orta seviye önyükleme değerleri ile desteklenmiştir. Filogenetik ağaç ve dizi analizleri, *Erwinia* cinsinin önemli bir heterojenlik sergileyen türlerden oluştuğunu ve *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae ve *Serratia marcescens* gibi diğer cinslerin üyeleri ile karışmış dört kuşak oluşturduğunu doğrulamıştır. Küme I, *Erwinia herbicola*, *E. millitiae*, *E. ananas*, *E. uredovora* ve *E. stewartii* türlerini içerir. Küme II, *E. persicinus*, *E. rhapontici*, *E. amylovora* ve *E. cypripedii*'den oluşmuştur. Küme III, *Erwinia carotovora* alttürlerinden ve *Erwinia chrysanthemi*'den oluşmuştur ve pektat liyazların ve selülazların üretimi ile karakterizedir. *E. salicis*, *E. rubrifaciens* ve *E. nigrifluenleri*, diğer *Erwinia* türleri ile en uzakta bulunan kümeyi oluşturmuştur. Sekans analizlerinden elde edilen veriler, biyokimyasal ve DNA-DNA hibridizasyon verileri bağlamında ele alınmıştır.

Dadaşoğlu (2013) Artvin, Erzincan, Erzurum, Iğdır illerinde bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklüğe sebep olan bakterileri izole ederek klasik ve moleküler yöntemler ile karakterizasyonu çalışmasında; Yumuşak çürüklük belirtisi gözlenen meyve ve sebzelerin gövde, yaprak, meyve ve yumrularından izolasyon yapılmış ve elde edilen bakteriler saflaştırılarak kültürle alınmıştır. Bu izolatlar aşırı duyarlılık testi (HR), patojenite testi ve pektolitik aktivite testi pozitif olanlar klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 18 *Bacillus pumilus*, 17 *Enterobacter cloacae*, 15 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 8 *Chryseobacterium indologenes*, 7 *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, 9 *Pseudomonas viridiflava* ve 5 *Dickeya chrysanthemi* olmak üzere toplam 79 yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilmiştir.

Laurila *et al.* (2008), Finlandiya'da patates bitkilerinden ve bu bitkilerin sulamasında kullanılan nehir sularından izole ettikleri *Pectobacterium sp.* ve *Dickeya sp.* izolatlarını türe spesifik PCR testleriyle tanılamışlardır. Bitkilerden elde edilen izolatların çoğu *P. atrosepticum* olarak tanılanırken, nehir sularından elde edilen izolatların çoğunun *Dickeya spp.* olduğu belirlenmiştir. *Dickeya* izolatlarının filogenetik analizlerinde 16S-23S rDNA analizlerini kullandıklarında izolatların 3 gruba ayrıldığını saptamışlardır. Bu çalışmayla *Dickeya* türlerinin sadece sıcak ülkelerde sorun olmadığı aynı zamanda Finlandiya gibi soğuk Kuzey Avrupa ülkelerin de problem olduğu ortaya konmuştur.

Caruso *et al.* (2016) Sicilya'da, seralarda topraksız kültür sisteminde yetiştirilen aşılı domates bitkilerinde kök çürüklüğü hastalığına rastlanmış, semptom olarak kök ve yaprak sapı bazal kısmında uzunlamasına koyu kahverengi renk görülmüştür. İlerleyen süreci, gövdenin uzunlamasına kesitlerinde yumuşak çürümüş doku ve damarlarda renk bozukluğu izlemiştir. Semptomatik dokulardan iki farklı koloni morfolojisi olan bakteri izolatları elde edilmiş, biyokimyasal ve moleküler analizler temelinde izolatlar *Pectobacterium spp* olarak tanımlanmıştır. Analiz 16S rRNA tanılama yöntemi ile yapıp sonuç olarak *P. carotovorum subsp. carotovorum* ve *P. carotovorum sub. sp. brasiliensis* bakterileri tespit edilmiş. Her iki taksondan alınan izolatlar yapay aşılınmış domates bitkilerinde hastalık semptomlarını çoğalttığını belirtmişlerdir.

Waleron *et al* (2013), Polonya'nın farklı bölgelerinde siyah leke ve yumuşak çürüklük belirtileri olan patates kökleri ve yumruların örneklerini toplanmışlardır. CVP ortamlarında saf kültürlerde geliştirildikten sonra bakteri izolatları *Pectobacterium spp.* olarak tanımlanmıştır. Pektatı bozma kabiliyetleri ve biyokimyasal testler ile değerlendirilmiştir. 122 farklı bitki örneğinden izole edilen suşların yaklaşık %43'ü *P. carotovorum subsp. carotovorum* olduğu halde, pektinolitik bakterilerin geri kalan kısmı *P. atrosepticum* olarak tanımlandı. Alt sp. Profil 3 recA PCR-RFLP'de tayin edilen *Carotovorum* suşları (%14) recA ve 16S rRNA gen dizileri temelinde *Pectobacterium wasabiae* olarak yeniden tanımlandı. Patatesten izole edilen *P. wasabiae*'nin %50'si, *Pectobacterium wasabiae* yaban mersini izolatlarının aksine, 37°C'de yetiştirme kabiliyetine sahiptir ve bazıları %5 NaCl içeren ortamda büyümüştür. Değerlendirmelerde *P. wasabiae*'nin patojenite testinde, yüksek kapasite gösterip patates yumrularında yumuşak çürümeye neden olduğu belirlenmiştir.

Golkhandan *et al.* (2013), 2011 yılının Ağustos ayında Malezya'nın 4 farklı yerleşkesinden, sebzelerin yaprak ve meyvelerinde semptom belirtisi olan eksplantlar toplandı. Enfekte dokulardan izole edilen (52 suş) organizmaların çoğunluğu *Pectobacterium* olarak tanımlandı. Bu tanımlama Pektat liyaz (*pel*) geninin PCR amplifikasyonuna ve 16S-23S rRNA'nın (ITS) G1 ve LI primerleriyle amplifikasyonuna dayanmaktadır. Fizyolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda,

Malezya’da bulunan *Pectobacterium* türlerini iki ana gruba ayırmış olup *P. wasabiae* ve *P. carotovorum* spp. *carotovorum* olarak belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizler onucunda *Pectobacterium carotovorum* spp. *carotovorum* ve *P. wasabiae*’yi aynı kümede gruplandırmıştır.

Huang (2009) *P. carotovorum*’un ACCC suşundan yeni düşük sıcaklıkta fitaz aktivitesi çalışmasında; düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteye sahip olan bir fitaz, özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde yem uygulamaları için büyük potansiyele sahiptir. Bu nedenle bu çalışma için *P. carotovorum*’dan PCR ve TAIL PCR kullanılarak fitaz geninin klonlanması gerçekleştirilmiştir. *P. carotovorum*, yumuşak çürümeye sebebiyet vermesi nedeniyle yere düşen sebzelerin soğuk depolarda muhafazasıyla elde edilmiştir. Tam uzunlukta 2,5 kb fragman 1.302 bp açık okuma çerçevesini içerdi ve *Klebsiella pneumoniae* fitazına %50 aminoasit kimliği ile 45.3 kDa’lık bir varsayılan fitazın kodlanması sağlandı. Bilgiler doğrultusunda yapılan bu çalışma, düşük sıcaklıkta aktif fitazın ve heterojen ifadesinin ilk raporu olduğu belirtilmektedir.

Sümengen (2011), laktik asit bakterilerinden fitaz üretimi ve endüstriyel kullanım olanakları, çalışmasında fermente gıda ürünlerinden elde edilen *Lactobacillus* sp. türlerinden fitaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu bakterilerin fitaz enzimi üretimi sodyum fitatlı besiyerinde 48 saat 30°C’de inkübasyondan sonra bakterilerin etrafında beliren şeffaf zonlarla belirlenmiştir. *Lactobacillus* sp. 12.1 ve *Lactobacillus* sp. 13.1’den izole edilen enzimler en yüksek aktivite gösterdiği için bu türler çalışmada kullanılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre, *Lactobacillus* sp. 12.1 ve 13.1’den izole edilen enzimin sahip olduğu karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu önerilmiştir.

Arkut (2013) sucul mikroorganizmalardan fitaz üretim olanaklarının araştırılması çalışmasında; arıtma tesislerinden elde edilen *Ochrobactrum anthropi*’den fitaz enziminin üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fitaz enzimini optimum koşullarda üretebilmek için enzim üretim ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Maksimum fitaz üretimi için en iyi karbon kaynağı %1 maltoz, en iyi azot kaynağı ise %1 maya

özütü olarak belirlenmiştir. Ayrıca, optimum pH 8.5, sıcaklık 37°C, çalkalama hızı 300 rpm, inokulum miktarı OD₆₀₀: 0,06, inokulum yaşı ise 9 saat olarak saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre enzimde bulunan karakteristik özelliklerden dolayı monogastrik hayvanlarda yem katkısı olarak kullanımı sonucunda çevre kirliliğinin önlenebileceği ön görülmüştür.

Aktürk (2014) fitaz reticisi *Aspergillus niger* izolasyonu, enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve optimizasyonu çalışmasında; çürümüş bitki parçaları, su, toprak ve gübreden izolasyonu yapılmış *Aspergillus niger* FM-7 izolatından fitaz enzimi üretimi, karakterizasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu fungusun fitaz enzimi üretimi sodyum fitatlı besiyerinde 72 saat ve 30°C'lik inkübasyonundan sonra mikroorganizmanın etrafında gelişen saydam zonla belirlenmiştir. *Aspergillus niger* FM-7 suşundan elde edilen enzim en iyi şekilde aktivite gösterdiği için bu suş çalışmada kullanılmak için uygun görülmüştür. Elde edilen bulgulara göre, *Aspergillus niger* FM-7 suşundan elde edilen enziminin yem katkı maddesi alanında kullanımı sahip olduğu karakteristik özelliklerden dolayı tavsiye edilebilir.

Akçakoca (2014) topraktan izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından fitaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında; Türkiye'nin farklı 30 ilinden alınan toprak numunelerinden 300 adet bakterinin izolasyonu yapılmıştır. Bakterilerin fizyolojik ve morfolojik özellikleri incelenerek 236 adetinin *Bacillus* cinsi olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bütün suşların fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılarak fitaz aktiviteleri belirlenmiş ve açık zonların çapı mm olarak gösterilmiştir. Toplamda 19 *Bacillus sp.* suşu ekstraselüler fitaz üreticisi olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre yeni fitaz enziminin geniş bir endüstriyel uygulama alanına sahip olabileceği ve hayvan yemi katkı maddesi olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir.

Sandıkçioğlu (2016) fitaz enzimi üretimi ve etkinliğinin araştırılması çalışmasında; ekstraselüler olarak *Aspergillus niger* tarafından sıvı besi ortamında üretilen fitaz enzimi, aseton çöktürmesi ve amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri yapılarak kısmen saflaştırılmıştır. Mısır nişastasının enzim üretimi için en uygun kaynak olduğu

belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi 16°C ve pH 3.5 olarak bulunmuştur. Enzimin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olduğu belirlenmiştir. Gökkuşuğu alabalıklarının ve *Broiler* civcivlerinin yemlerine eklenen fitaz enziminin monogastrik mideli hayvanların yem teknolojisinde uygulanabilirliği araştırılmıştır. Sonuç olarak elde edilen bulgularda, değeri $p < 0,05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dokuzparmak (2016) termofilik *Geobacillus sp.* den yeni bir termostabil fitazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında; termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.* den fitaz enziminin, yüksek ısı ve K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 1.31 mm ve 526,28 U olarak hesapları yapıldı. Ayrıca, enzimin, proteazlara karşı direnç gösterdiği ve geniş bir substrat seçiciliğinin olduğu ve aynı zamanda soymilk fitatın etkili bir şekilde hidrolizasyona uğradığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, bu çalışmada gelişmiş özelliklere sahip alternatif bir fitaz enziminin oluşturulduğu düşünülmektedir.

Wulandari (2015), Endonezya’da ekstrem bölgelerde fitaz üreten bakteriler çalışmasında, Endonezya’nın orta kısmında bulunan Java bölgesindeki volkanik anlardan elde edilen 4 toprak numunesinden hücre dışı fitat degrade edici aktivite üreten 154 bakteri izole edilmiştir. Fitat degradasyonu için yüksek aktivasyona sahip altı adet suş, ilgili fitat degrade edici enzimin karakterizasyonu ve soy tanımlaması için seçildi. 16S rRNA gen dizilerinin blast analizi, *Bacillus* cinsine ait referans sekansları, altı izolatin hepsi için yüksek benzerlik göstermişlerdir. Zn^{2+} ve Fe^{3+} , incelemelerden sonra bütün fitaz preparatlarıyla fitat defosforilasyonunu kuvvetle inhibe ettiği görülmüştür. Ca^{2+} varlığında, fitaz aktivitesinde yaklaşık olarak %10-15 oranında bir artış sağlanmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller, Cihazlar ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan *Pectobacterium carotovora* (M7) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilimdalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı mikroorganizma kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar:

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wisecube Wac-47, KOREA)

Mikroskop (Bresser, GERMANY)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (Ohaus Starter3000, USA)

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

Hassas Terazî (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Mettler WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Spektrofotometre (UV-1201V)

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

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

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

PCR Cihazı (Thermo Cyclor Block, GERMANY)

DNA İzolasyon Robotu (Qiacube, GERMANY)

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Nutrient agar (Oxoid), Proteinaz K (Merck), Tris - HCl (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck), 1XTAE (Sigma), 20X Dimetil sülfoksit (Sigma), 10 x PCR tamponu: (Sigma), dNTPs (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Sigma), Agaroz (Sigma), Jel Red (Sigma).

3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler

Bakteri DNA izolasyonu kiti (Qiagen).

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma boyunca kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

Nutrient agar: Hassas terazide tartılan 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besi yeri otoklavda 121°C’de 15 dk steril hale getirilip soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 45°C’ye varıncaya kadar soğutulduktan sonra steril halde bulunan petrilere aktararak katılaşması için bekletilmiştir (Lelliot and Stead 1987). Genel bir besi yeri olup bakteriler izole edildikten sonra yayma veya çizgi ekim yapımında kullanılmıştır.

Nutrient broth: Hassas terazide tartılan 13 g nutrient broth besiyeri (Oxoid) 1 L dH₂O içerisine eklenerek hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C’de 15 dk steril hale getirildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Genel bir besi yeri olup saf hale getirilen bakterilerin sıvı ortamda gelişmesi amacıyla kullanılmıştır.

Stok Besiyeri: 0,65 g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim 100 ml olana kadar saf su ilave edildi. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Saygılı vd 2006).

Proteinaz K: Kit içerisinde hazır bir şekilde gelen proteinaz K'dan 200 µl alınarak steril eppendorf tüplere konuldu. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklendi. -20°C'de muhafaza edildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): 2ml'lik steril eppendorf tüplere alınan, %100'lük DMSO (Sigma) kullanılıncaya kadar 25°C'de bekletildi.

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL oluncaya kadar tamamlandı.

6X yükleme tamponu: 100 ml yükleme tamponu için %100'lük gliserolden (Sigma-G9012) 40 ml alınarak, 0,1 g bromfenol blue (Sigma) ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde güneş alması engellenerek , +4°C'de korundu.

10 X PCR tamponu: (Sigma) (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ , %0,01 jelatin pH: 8,3) *Taq* DNA polimeraz ile birlikte gelmektedir.

dNTPs (Sigma): (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM)

Primerler: 27F - 1492R primer seti MgCl₂ (Sigma-M1028): 1M olan hazır çözelti 25 mM olacak şekilde steril saf su ile sulandırıldı.

Taq DNA polimeraz (Sigma)

DNA markır (Sigma): 1 kb'lık DNA marker.

Agaroz (Sigma-A5093)

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kullanma kılavuzunda yazılan protokol doğrultusunda çözülerek ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$) formülü uygulanarak son konsantrasyonu 50 μ M olacak şekilde hazırlandı.

Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler**Substratın hazırlanışı**

İçerisine 2 mM Na-fitat eklenen 100 mL 0,1 M asetat tamponu (pH 5,5) hazır hale getirilmiştir (Raghavendra and Halami 2009).

a. 0,1 M Sodyum asetat tamponu

0,82 g sodyum asetat 100 mL dH₂O'da tamamen çözündürülerek HCl ile pH 5,5'e ayarlanmıştır.

b. 2 mM Na-fitat çözeltisi

Sodyum asetat tamponu üzerine 0,132 g Na-fitat ilave edilmiştir.

Reaksiyonu durdurucu çözeltinin hazırlanışı

Reaksiyonu durdurabilmek için %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 10 g TCA 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Raghavendra and Halami 2009).

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti A: 5,73 mL sülfirik asit (%96'lık) 93,7 mL distile su içerisine eklenerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazır hale getirilmiştir.

Çözelti B: Uygun bir oranda çözelti A'da çözünmüş ve son hacim çözelti A ile 100 mL'ye sabitlenmiş 2,5 g amonyum molibdat hazırlanmıştır.

Çözelti C: Uygun oranda distile suda, 2,5 g demir sülfat çözünmüş ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisine 1-2 damla sülfirik asit eklenmiştir.

Renklendirme çözeltisi: Bir hacim çözelti C, dört hacim çözelti B ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti uzun süre bekletilmemelidir (Choi *et al.* 2001; De Angelis *et al.* 2003).

pH aktivitesi için kullanılan tamponlar**a. Sodyum asetat tamponu**

pH 2,0-6,0 aralığındaki Fitazın aktivitesini belirlemek nedeniyle kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat 0,1 M asetat tamponu için tartılmış ve 100 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Optimum pH değerlerini ayarlayabilmek için HCl ve/veya 0,1 M'lık NaOH kullanılmıştır.

b. Tris-HCl tamponu

pH 7,0-9,0 Aralığındaki Fitazın aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 10 mM Tris-HCl tamponu için tartılmış ve 100 ml suda çözünerek hazırlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek üzere konsantre NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

c. Karbonat tamponu

pH 10-11 Aralığındaki Fitazın aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat 10 mM Karbonat tamponu için tartılmış ve 100 ml distile su ile üzeri tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Stok kültürden bakterinin ekilmesi

Stok kültür -80°C 'den çıkarıldı. Oda sıcaklığında çözünene kadar bekletildi. Nutrient agar besiyerine 3 faz ekim yöntemi ile ekim yapılarak 26°C 'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Bakteri belli bir gelişme gösterdikten sonra çalışmalara devam edildi.

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplarla belirlenebilir. Bu nedenle, katı ya da sıvı besiyerlerinde saf bir şekilde geliştirilen hazırlanmış bakteri preparatları spesifik boyalar aracılığıyla işlem yapılarak inceleme yapılır. Mikroskoptaki incelemelerde, bakterilerin, boyutları, spor durumu, boyanma özelliği (Gram (-) veya (+), vb.) gibi özelliklerinin varlığı incelenir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Her bir izolattan örnek hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve mikroskop altında görüntülerine bakılarak sonuçlar elde edilmiştir (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002).

b. Hücre boyutlarının belirlenmesi: Basit veya negatif boyama işlemi yapılan preparatlardaki izolatların immersiyon objektifinde oküler mikrometre yardımı ile hücre boyutları hesaplanmıştır (Leloğlu ve Erdoğan 1979; Temiz 2000).

3.2.3. Kültür özelliklerinin belirlenmesi

Bakterilerin kültürel özelliklerini belirlemede, bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanıldı.

İzolatlar katı besiyerlerine nokta veya çizgi ekim şeklinde ekilerek, koloni meydana getirmeleri beklendi, koloni morfolojisi, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi belirlendi (Barış 2009).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde üstte pelikül, dipte tortu veya granüllü bir üreme gösterebilmektedir. İzolatlar nutrient broth içeren tüplere ekilerek sıvı besiyerlerinde kültür özellikleri tespit edildi (Arda 2000).

3.2.4. Bazı biyokimyasal testlerin yapılışı

3.2.4.a. Katalaz testi

Elde edilen izolatların katalaz enziminin bulunup bulunmadığı bu testle belirlenmiştir. Fakültatif olan veya Aerobik solunum yapan mikroorganizmalarda bu enzim bulunur. Katalaz enzimi, solunum sonucunda meydana gelen hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijen gazına dönüştürülmüştür. Bu nedenle test için 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp, üzerine 1 damla %5'lik H_2O_2 ilave edilerek kabarcık oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Barış 2009).

3.2.4.b. Sitrat testi

Bu test, mikroorganizmaların, besiyerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonunda kullanılır. Bakteriler tarafından sitratın ayrışması (sitrat metabolizması) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir.

Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra besiyerlerine ekimler yapılır ve tüpler 2-7 gün 37°C inkubasyonda tutulur. Christensen besiyerine iğne ile inokulasyon yapılır ve yatık yüzeye de iğne sürülür. Simmons citrate besiyerinde, uygun bir inkubasyon süresi sonunda hiç bir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Christensen sitrat sülfid besiyerinde hiç bir renk değişikliğinin görülmemesi (açık rengin muhafaza edilmesi) negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte pembe-kırmızı rengin oluşumu da pozitif reaksiyonu ifade eder (Saygılı 2006).

3.2.4.c. İndol testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Mikroorganizmalar sıvı besiyerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37°C'de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Kültürlerin üzerine kovacs (veya Ehrlich) ayıracından 0.5 ml ilave edilir ve iyice karıştırılır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade eder. Sarımsı halka indolun oluşmadığını gösterir (negatif indol testi). Renk, indol içinde bulunan pyrrole'den ileri gelir (Saygılı 2006).

3.2.4.d. Fosfataz testi

Bu test, özellikle, stafilokokların (koagülase pozitif) sentezledikleri fosfataze enzimini belirlemek amacıyla yapılır. Mikroorganizma kültürlerinden fenolfiltalein fosfatlı agar ekim yapılır ve 37°C’de 1-2 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda, koloniler amonyak buharına tutulurlar (petri kutusunun kapağına 1 ml NH₄OH konur ve kültür ters olarak kapatılır). Eğer sıvı besiyeri kullanılmışsa, tüplere sodyum hidrositten bir damla damlatılır. Kolonilerde veya tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyonu gösterir. Negatif durumda renk değişikliği olmaz (Saygılı 2006).

3.2.4.e. Gram özelliklerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi için yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı yöntem kullanılabilir.

Bu metotlardan birincisi; lam üzerine, %3’lük KOH çözeltisinden bir iki damla konulur. Daha sonra öze ile alınan bakteri KOH çözeltisi ile 5–10 saniye karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılır. Mikroorganizma Gram (-) özellikte ise hücre duvarındaki peptidoglikan tabakası az tabakalı olup, teikoik asit içermediğinden KOH ile kolayca parçalanır, sitoplazma ve hücre içeriği serbest hale geçer. Bunun sonucunda da viskoz bir uzama görülür. Hücre duvarı özelliği Gram (+) olan bakterilerde ise KOH-bakteri karışımı sulu bir sıvı halindedir ve öze yukarı doğru kaldırıldığında uzama gözlenmez (Barış 2009).

Lam üzerine bir damla saf su aktarılır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayılır. Ateşten geçirilerek fıkse edilir. İlk olarak kristal viyole boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır, ardından lügol ile 1 dk muamele edilir ve %96’lık etil alkol ile yıkanır. Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası uygulanır. Preparat yıkanıp kurutulur. Mikroskop altında incelenir. Gram (+) bakteriler mor renkte iken, Gram (-) bakteriler pembe görünüme sahiptir (Tarakçıoğlu 2016).

3.2.5. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması

3.2.5.a. Bakteri izolatların DNA izolasyonu

İzolatların DNA'ları, bakteri DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda izolasyonları yapılmıştır.

Bu aşamalar;

- 1- Nutrient agarlarda geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu toplanarak steril eppendorf tüplerine alındı.
- 2- Toplanan tüplere 200µl Lizozim + TrisHCL çözeltisi eklendi.
- 3- Bu karışım güzelce vorteks edilerek homojen bir çözünme olması sağlandı.
- 4- Vorteks'lenen karışımlar 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürede her 15 dakikada bir vorteks yapıldı.
- 5- İnkübasyon sonunda örnekler 12000 rpm'de 5 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- 6- Santrifüjlenen örnekler sıvı kısmı dökülerek cidara yapışan pelet kısım bırakıldı.
- 7- Örnekler robotun bölümlerine dizilerek izolasyon başlatıldı.

3.2.5.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması

Bakterilerin sistematiği açısından önemli bir yere sahip olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçildi ve evrensel primerler (27F ileri 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3', 1492R geri 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltıldı.

PCR reaksiyonun hazırlanması: 30 µl'lik reaksiyon; 3 µl 10 x PCR tamponu, 0,6 µl dNTPs, 0,3 µl 50 µM primer, 0,3 µl 50 µM primer, 1,2 µl DMSO, 1,8 µl MgCl₂, 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 21,5 µl steril saf su ile 29 µl'lik reaksiyon karışımı

hazırlandı. Son olarak karışıma 1 µl kalıp DNA ilave edilerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı (Barış 2009).

PCR programı: PCR reaksiyonu hazırlanan örnek materyaller, 95°C'de 120 saniye denatürasyon, sonrasında 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 60 saniye denatürasyon, 53°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 120 saniye uzama basamakları ve sonrasında 72°C'de 5 dakika uzama safhasında oluşacak biçimde program hazırlandı (Barış 2009).

16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 0.6 gr agaroz üzerine 50 ml 1XTAE tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. 50°C'ye veya el yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl jel red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. Belli bir süre beklenerek donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTAE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, DNA marköründen 8 µl yüklendi. Diğer kuyucuğa örnek yüklendi.

Elektroforez jel düzeneği; 90 Volt akımda 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık sistemi (Gel Doc 2000 BIO RAD) altında görüntülendi ve bilgisayar ortamında analiz edildi (Barış 2009).

3.2.5.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi

Sekans analizi sonuçları BioEdit ile analiz edilerek Fasta formatına çevrildi. Primer bölgeleri tespit edilerek üst ve alt kısımlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan bölge kontrol edilerek düzenlendi. Ayrıca NCBI veri bankasından (aksesyon numarası ile elde edilen bakteri dizileri ile) MEGA7 programı kullanılarak Neighbor Joining kümeleme analizine göre sekans sonuçları karşılaştırılarak filogenetik ağaç çizilmiştir.

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesi ölçülürken her basamakta elde edilen süpernatantların hepsinden aktivite tayini yapılmıştır. Fitaz enziminin aktiviteye sahip olduğu aralıklar tespit belirlenmiştir. Aktivite tayini hesaplanırken 100 µL enzim çözeltisi üzerine 250 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılır daha sonra 10 dakika 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında bekletme işlemi yapıldıktan sonra tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildi. 15 dakika inkübasyondan sonra 3200 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler kör kullanılarak 700 nm'de spektrofotometre cihazında ölçüm işlemi yapılmıştır.

3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için karbonat (pH 10,0-11,0), Tris (pH 7,0-9,0), sodyum sitrat (pH 4,0-6,0), ve asetat (pH 2,0-3,0), tampon çözeltileri kullanılarak farklı pH değerlerinde olan (pH 2,0-11,0) ve içerisinde 2 mM sodyum fitat ihtiva eden substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapmak için 100 µL enzim ve 250 µL substrat 2 ml'lik tüpte vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika reaksiyona girmesi beklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 500 µL %10'luk TCA ilave edilmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildikten sonra 15 dakika beklenmiş ve sonrasında örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra örnekler kör'e karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır.

3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su

banyosu kullanılmıştır. Aktivite tayininin yapılabilmesi için 100 μL enzim ve 250 μL substrat karıştırılarak standart aktivite tayini yapılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalında bulunan stok kültürde hazır olarak bulunan M7 numaralı bakteri suşu kullanılarak çalışmalar yapılmıştır.

4.1. Kullanılan Mikroorganizmanın Morfolojik Özellikleri

İzolatin bazı morfolojik özellikleri incelenmiştir. Boyutları, endospor oluşturma ve Gram özellikleri gibi sonuçları tespit edilmiştir. Bu izolatların morfolojik özellikleri ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

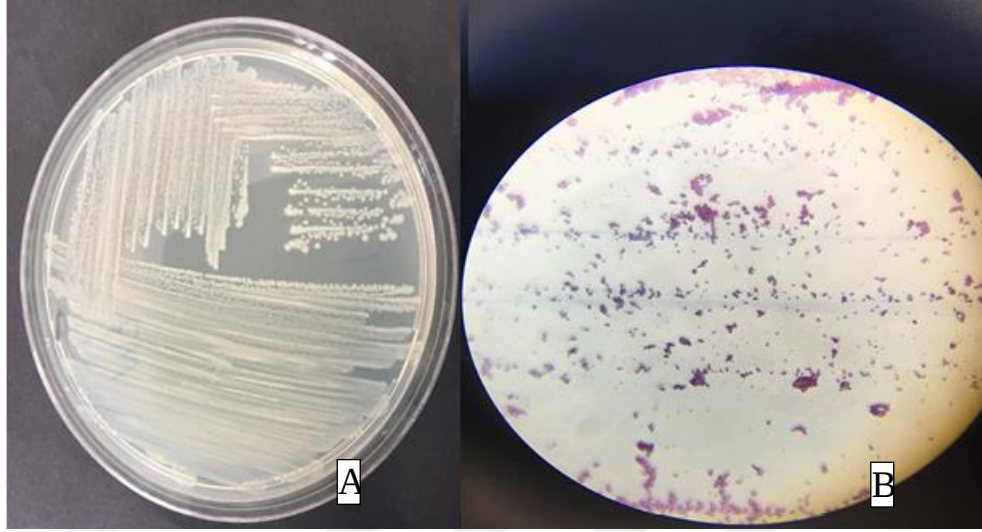
Çizelge 4.1. *P. carotovorum*’un Morfolojik özellikleri

Tanı sonucu	Hücre morfolojisi	Boyutları		Endospor durumu	Gram özellikleri	
		Çapı μm	Boyutu μm		KOH	Gram boyama
<i>P. carotovorum</i> subps. <i>carotovorum</i>	Çubuk	0,5-0,6	2	-	-	-

4.2. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterinin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı (Nutrient agar) ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu sürede sonuçlar alınmıştır. İzolatların kültür özellikleri ile ilgili sonuçları Çizelge 4.2’de detayları ile verilmiştir. Ayrıca koloni ve mikron morfolojisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Kültüre alınan bakteri çizgi ekim yöntemi ile çizilmiştir. Burada saf koloni yapılarına bakılmış ve yapılan çalışmalar bu kolonilerden devam edilmiştir.



Şekil 4.1. *P. carotovorum*'un koloni ve hücre morfolojisi

*A. Petri görüntüsü B. hücre morfolojisi (10*40)

Çizelge 4.2. *P. carotovorum*'un kültür özellikleri

İzolasyon Sonucu	Koloni Şekli	Koloni Rengi	Koloni kıvamı
<i>P. carotovorum</i>	Oval tepeli	Krem rengi	Kuru

4.3. Bazı Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Moleküler yöntemle yapılan tanılamayı desteklemek amacıyla bazı biyokimyasal testler yapılmış ve kesin tanı sonucuna ulaşılmaya çalışılmıştır. Biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

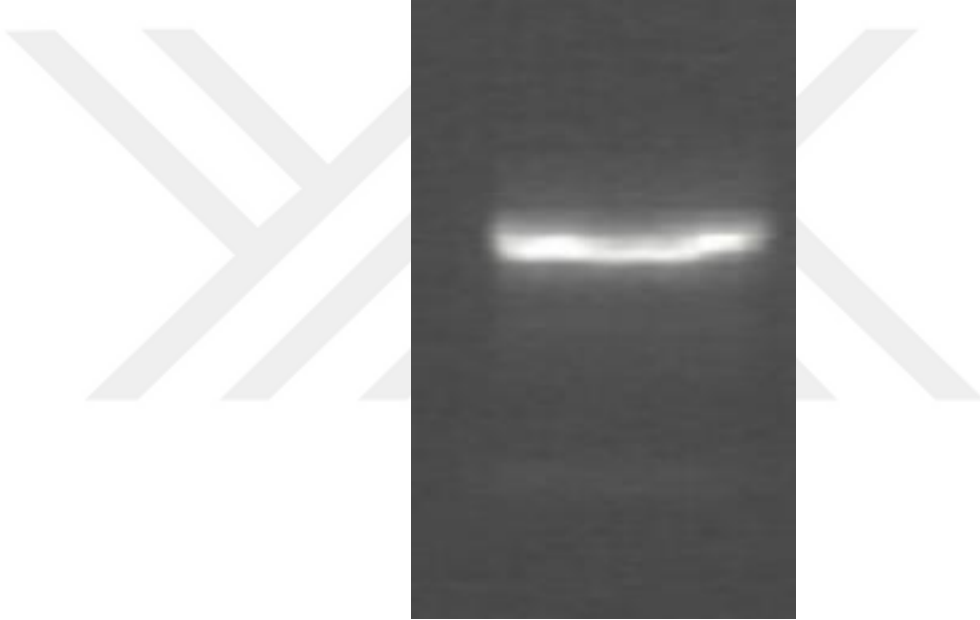
Çizelge 4.3. *P. carotovorum*'un bazı biyokimyasal test sonuçları

Testler ➡	Sitrat testi	İndol üretimi testi	Fosfataz testi	Katalaz testi	KOH testi	Gram boyama testi
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	+	-	-	+	-	-

4.4. Moleküler Yöntem ile *P. carotovorum*'un Tanılanması

4.4.1. DNA izolasyon sonucu

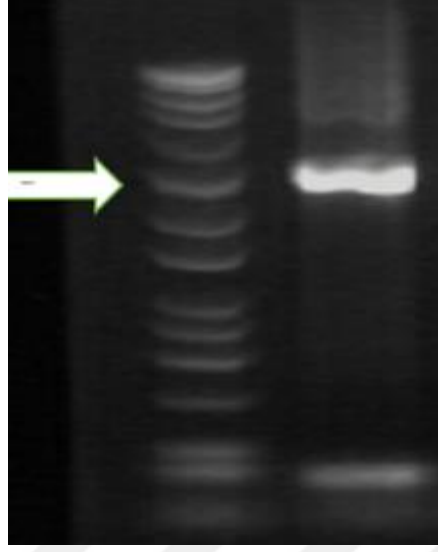
P. carotovorum izolatının genomik DNA izolasyonu Bölüm 3.2.5.a'da belirtilen protokolde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. DNA izolasyon sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü

4.4.2. PCR Sonuçlarının jel görüntüsü

P. carotovorum izolatından elde edilen genomik DNA kullanılarak kurulan PCR reaksiyonları sonucu beklenen büyüklük olan 1400-1500 bp büyüklüğünde olduğu görülmektedir. Şekil 4.3'de gösterilmiştir. İşaretli olan bölge markörde 1400 bp göstermektedir.



Şekil 4.3. PCR sonuçları jel görüntüsü
*İşaretli bölge 1400 – 1500 bp göstermektedir.

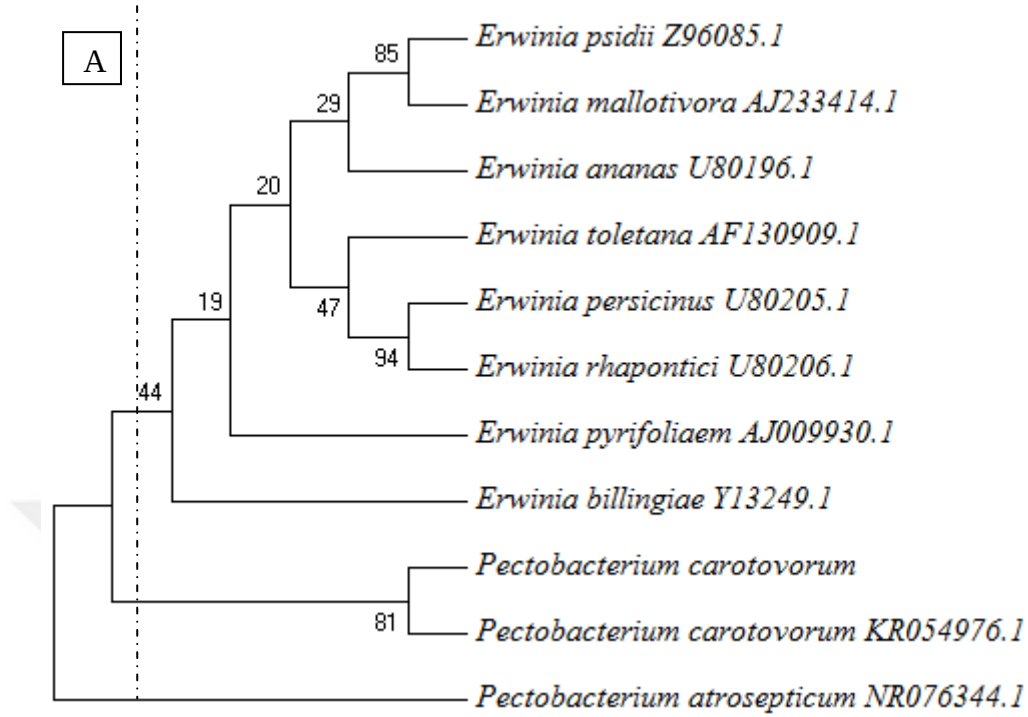
4.4.3. Dizi analizi sonuçları

PCR sonucunun gerçekten 16S rRNA gen bölgesinin tespiti için dizi analizi (sekanslama) yapılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler Şekil 4.4’de belirtilmiştir.

> *Pectobacterium carotovorum*

GCTTGCTCTTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG
 GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAAAGAG
 GGGGACCTTCGGGCCTCTCGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGG
 TAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
 GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
 CAGCGAGGAGGAAGGCGGTAAGGTTAATAACCTTATCGATTGACGTTACTCGCAGAAGA
 AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
 GAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGG
 GCTTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
 ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
 CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
 TTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCA
 AATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
 GAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTAGCTAGAGATAGCTGAGTGCCTTCG
 GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAA
 GGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
 TACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAG
 AGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
 TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA

Şekil 4.4. *P. carotovorum* izolatından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonuçları



Şekil 4.4. *P.caratovorum*'un filogenetik ağaçla yerinin belirlenmesi

Bu ağacın oluşturulmasındaki amaç, yakın türler arasındaki ilişkiyi ve tür olarak değerlendirilmiş örneklerin bazı alt türleri ile arasındaki benzerlikleri göstermektedir.

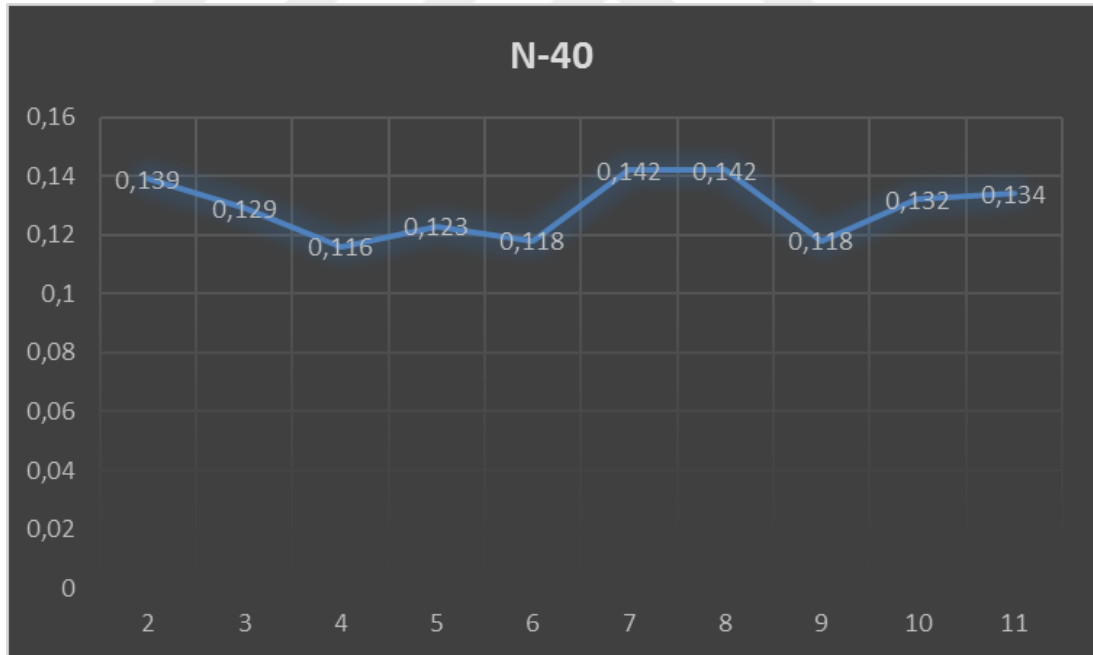
Şekil 4.4'te oluşturulan ağaç NCBI'dan elde edilmiş olup aksesyon numarası verilmiştir. A kesiti indirildiğinde sistematik olarak üç ana grup oluşmuştur. *Pectobacterium atrosepticum* temel takson olup dış grup gibi belirlenmiştir. Dış grup ile diğer gruplar arasında büyük benzerlik bulunmuştur. İkinci önemli grubumuz tezinde konusu olan *Pectobacterium carotovorum* grubudur. Bunlar kardeş takson olarak iki örnek teşekkül etmektedir. Bu grup yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bir diğer grup ise kitlesel olarak halen *Erwinia* olarak isimlendirilen gruptur. Bunlarında kendi içerisindeki benzerlikleri oldukça yüksektir. Farklı türler olarak isimlendirilmiş *E. persicinus* ve *E. rhapontici* %94 oranında benzerlik göstermiş olup alt türlerden bile daha yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4.5. Fitaz Aktivitesi Sonuçları

İzolasyonu ve tanılaması yapılan *P. carotovorum* farklı sıcaklık ve pH değerlerinde aktivitesi ölçülmüş ve aktivite sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

4.5.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları

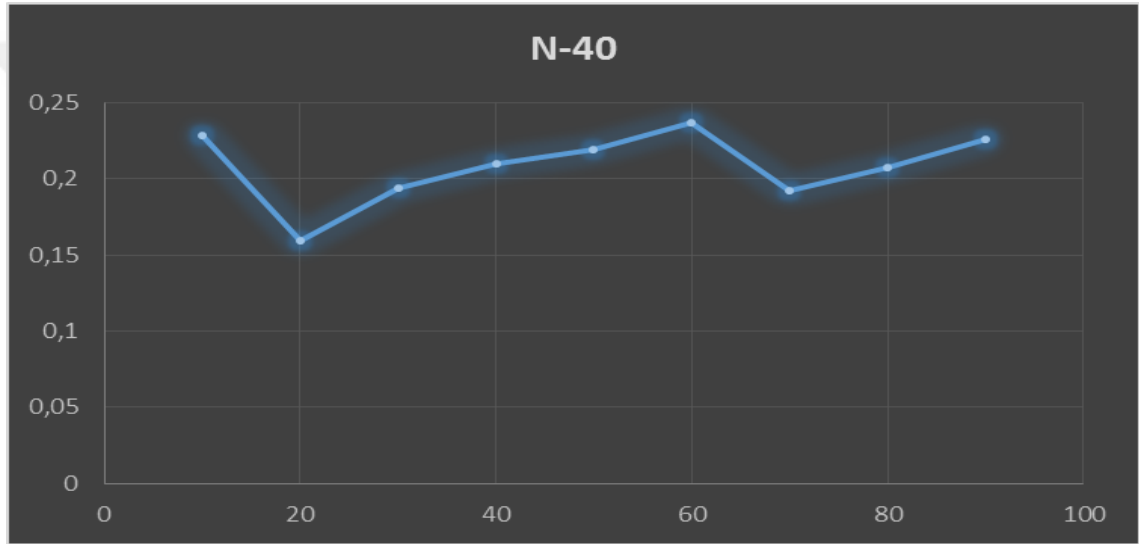
P. carotovorum'dan üretilip saflaştırılan fitaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için ölçümler yapılmıştır. Optimum pH için, pH 2,0'dan 11,0'a kadar on farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 2,0-6,0 arası asetat, pH 7,0-9,0 arası Tris HCl ve pH 10,0-11,0 arasında karbonat tamponları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile aktivitesi hesaplanmış ve "Aktivite-pH" grafikleri çizilmiştir. Sonuçları Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *P. carotovorum*'dan elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.5.2. *P. carotovorum*'dan elde edilen fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

P. carotovorum'dan elde edilip saflaştırılan fitaz enzimi optimum sıcaklıklarını tespit etmek için gerekli ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış ve “Aktivite-°C” grafikleri çizilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *P. carotovorum*'a ait fitaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunmuştur. *P. carotovorum*'dan elde edilen fitaz enzimi optimum sıcaklık sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. *P. carotovorum*'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplar ile belirlenebilir. Bu amaçla, sıvı veya katı besiyerlerinde saf olarak geliştirilen bakterilerden hazırlanan preparatlar spesifik boyalarla boyanarak inceleme yapılır. Mikroskoptaki incelemelerde, bakterilerin, boyutları, spor durumu, boyanma özelliği (Gram (-) veya (+), vb.) gibi özelliklerinin varlığı incelenir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

P. carotovorum morfolojik özellikleri bakımından; çubuk şeklinde, 0,5-0,6 µm çapında, 2 µm boyutunda, endospor oluşturmayan, Gram (-) bir bakteridir.

İzolatlar katı besiyerlerine nokta veya çizgi ekim şeklinde ekilerek, koloni meydana getirmeleri beklenir, koloni morfolojisi, mikroskopta incelenerek üstten görüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi belirlenir (Barış 2009).

P. carotovorum kültür özellikleri bakımından koloni şekli oval yapılı, renk olarak krem renginde, kuru bir koloni yapısına sahiptir.

P. carotovorum subps. carotovorum üzerinde bazı biyokimyasal testler yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar (Saygılı 2006) ile bizim yaptığımız test sonuçları birbirleriyle uygunluk göstermektedir. Yapılan test sonuçlarında *P. carotovorum subps. carotovorum* sitrat ve katalaz testlerinin pozitif olduğu; indol ve fosfataz aktivitesi bakımından negatif değere sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hücre duvar yapısı bakımından Gram (-) bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

Tanı ve karakterizasyon yapmak amacıyla kullanılan yöntemler konvensiyonel ve moleküler yöntemler olarak da sınıflandırılabilir (Adıgüzel 2006). Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları oluşturan makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı bir şekilde ortaya çıkan değişikliklerden kaynaklanarak geliştirilmiştir.

Moleküler çalışmalar karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) esas materyal olarak ele almakta ve bunlardan herhangi birinin veya kombinasyonlarının yardımıyla mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir. Özellikle ribozomal operonların dizi analizleri organizmalar ını birbirleri arasındaki filogenetik ilişkiyi saptamada ençok kullanılan yöntem olmaktadır (Lane *et al.* 1985; Kane *et al.* 1993; Vandamme *et al.* 1996; Woese 2000; Mora and Amann 2001; Martin 2002; Dworkin *et al.* 2006).

Bu çalışmada farklı alanlarda kullanımı olan *P. carotovorum* 'un fitaz enzim aktivitesi ve aktivitesini önemli ölçüde etkileyecek sıcaklık ve pH değerleri farklı değerlerde ölçülmüş, optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri araştırılmıştır.

P. carotovorum 'dan saflaştırılan fitaz enziminin optimum pH'sını saptamak amacıyla pH 2,0-11,0 aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. pH 2,0-6,0 aralığı için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 7,0-9,0 aralığı için 10mM'lık Tris/HCl tamponu ve pH 10,0-11,0 aralığı için ise 10 mM'lık karbonat tamponları ile enzimin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. *P. carotovorum* 'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan fitaz enziminin en yüksek aktiviteye pH 8,0'de sahip olduğu belirlenmiştir (Sarıbuğa 2013).

Daha önce yapılan çalışmalarda *P. carotovorum* bakterisinden fitaz enzimi çalışması yapılmadığından dolayı fitaz enziminin diğer bakteri türlerindeki aktiviteleri referans alınarak bulmuş olduğumuz sonuçlar ile karşılaştırma yapılmıştır. Tran ve ark. (2011), *Bacillus Sp.* MD.2 suşunun sıcaklık optimumunu 70°C olarak bulmuşlardır. Walsh ve ark. (2003), *Rhizopus oligoporus* ATCC 22959 ekstraselüler fitaz aktivitesi için optimum pH değerini 5.5 olarak bulmuşlardır. Kumar ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada ekstraselüler fitaz aktivitesi için optimum pH değerini *Bacillus subtilis* için pH 6.0- 6.5, *Bacillus amyloliquefaciens* için pH 7.0-7.8 ve *E.coli* için pH 5.0 olarak bulmuşlardır. Erkan (2014), yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* cinsi bakterinin optimum pH değeri 6.5 olarak bulmuştur.

Çalıştığımız bakterinin literatür çalışmalarında fitaz enzimi aktivitesinin çalışılmadığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma alandaki ilk çalışmadır.

P. carotovorum'un fitaz enzim aktivitesi sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda, Tran ve ark. (2011), *Bacillus Sp.* MD.2 suşunun sıcaklık optimumunu 70°C olarak bulmuşlardır. Kim ve ark. (2001), *Bacillus amyloliquefaciens*'te yaptıkları çalışmada ekstraselüler fitazın optimum sıcaklık değeri 80°C olarak bulmuşlardır. Erkan (2014), yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis*'in optimum sıcaklık değeri 60°C olarak bulmuştur. bulunmuştur. Yaptığım çalışma sonucunda *P. carotovorum* bakterisinin fitaz enzim aktivitesine bakılmamış olduğundan dolayı çalışmamızda optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiş ancak literatürle karşılaştırılmamıştır. En düşük aktivite ise 20°C'de görülmüştür.

Pectobacterium carotovorum'un filogenetik ağaçta yerinin belirlenmesi amacıyla çizim yapılmıştır. Sonuçta sistematik olarak üç ana grup oluşmuş ve bakterimizin bu gruplar ile yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; *P. carotovorum* bakterisinin optimum pH'sı 8.0 olarak bulunmuş olup, en düşük aktivite gösterdiği pH değeri ise 4.0 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değeri ise 60°C olup en düşük aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 20°C olarak bulunmuştur. *P. carotovorum* bakterisinin fitaz aktivitesi ilk defa çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ve bakterinin kültürel adaptasyon özelliğine göre fitaz enzimi üretimi açısından teknolojiye sunulabilir uygunlukta olduğu düşünülebilir.

Elde edilen bu sonuçlara göre, bu bakterinin ürettiği enzimin karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda kullanımının daha etkin ve kullanılabilirliğinin daha yaygın olabileceği düşüncesi çalışmalarımızın sonucuyla da desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Erzurum, 122s.
- Akçakoca, D., 2014. Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Sp. Suşlarından Fitaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Uludağ Üniversitesi.
- Akkaya, A., & Pazarlıoğlu, N. (2012). 21. Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji”. Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi, 1(1), 22.
- Aktürk, S., 2014. Fitaz Üreticisi *Aspergillus niger* İzolasyonu, Enzimin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Optimizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Andersson, R. A., Kõiv, V., Norman-Setterblad, C., & Pirhonen, M. (1999). Role of RpoS in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology*, 145(12), 3547-3556.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Arkut, A., 2013. Sucul Mikroorganizmalardan Fitaz Üretim Olanaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Barış, Ö. 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Atatürk Üniversitesi.
- Bilgin, E., & Dinçer, S. (2008). Toprak Bakterilerinden İzole Edilen Fitazların Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Bottger, E.C. (1989). Rapid Determination of Bacterial Ribosomal RNA Sequences by Direct Sequencing of Enzymatically Amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65: 171– 176.
- Caruso, A., Licciardello, G., La Rosa, R., Catara, V., Bella, P., 2016. Mixed Infection Of *Pectobacterium Carotovorum* Subsp *Carotovorum* And *P. Carotovorum* Subsp *Brasiliensis* in Tomato Stem Rot in. *Journal Of Plant Pathology*. 661-665s.
- Chen, K., Neimark, H., Rumore, P., Steinman, C.R., (1989). Broad-range DNA Probes for Detecting and Amplifying Eubacterial Nucleic Acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 19– 24.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. Khu-10. *J. Prot. Chem.* 20: 287–292.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 840-862.
- Cromwell, G.I., R.D. Coffey, G.R. Parker, H.J. Monegue and J.H. Randolph. 1995. Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *Journal of Animal Sciences*, 71: 1831-1840.
- Dadaşoğlu, F., 2013. Artvin Erzincan Erzurum Iğdır İllerinde Bazı Meyve Ve Sebzelelerde Yumuşak Çürüklüğe Sebep Olan Bakterilerin İzolasyonu Klasik Ve

- Moleküler Yöntemler İle Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., Mcsweeney, P. L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 259- 270.
- Dokuzparmak, E., Sirin, Y., Cakmak, U., & Ertunga, N. S. (2016). Purification and characterization of a novel thermostable phytase from the thermophilic *Geobacillus* sp. TF16. *International Journal of Food Properties*, 1-13.
- Dworkin, M.(Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. and Stackebrandt, E.(Editors), 2006. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- Erkan, K., 2014. Mikrobiyal Fitaz Üretimine Ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- Golkhandan, E., Kamaruzaman, S., Sariah, M., Abidin, M. A. Z., & Nasehi, A. (2013). Characterization of Malaysian *Pectobacterium* spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods. *European journal of plant pathology*, 137(3), 431-443.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Harmsen, D., Karch, H. (2004) 16S rDNA for Diagnosing Pathogens: a Living Tree. *ASM News* 70: 19–24.
- Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Fu, D., Shao, N., Yang, P., ... & Yao, B. (2009). Novel low-temperature-active phytase from *Erwinia carotovora* var. *carotovora* ACCC 10276. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(10), 1085-1091.
- Kane, M.D., Poulsen, L.K. and Stahl, D.A., 1993. Monitoring the Enrichment and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria by Using Oligonucleotide Hybridization Probes Designed from Environmentally Derived 16S rRNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 682-686.
- Karataş, M., 2012. Moleküler Biyoloji/Bakteri Genetiği. Nobel Akademik Yayıncılık. 251 s, Ankara.
- Konietzky, U. and R. Greiner. 2004. Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 1118.
- Kwon, S. W., Go, S. J., Kang, H. W., Ryu, J. C., & Jo, J. K. (1997). Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1061-1067.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *PNAS*, 82,6955-6959.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., Pihonen, M., 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 122:213-225.

- Lei, X.G. and C.H. Stahl. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 474-481
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. *Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blacwell Scientific Publications. p216.
- Leloğlu, N. ve Erdoğan, N., 1979. *Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 549, Erzurum.
- Martin, A.P., 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3673–3682.
- Mora, R.R. and Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.
- Nazerian, E., Sijam, K., Ahmad, Z. A. M., & Keshavarz, K. (2011). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 77(5), 292.
- Onkendi, E. M., Ramesh, A. M., Kwenda, S., Naidoo, S., & Moleleki, L. (2016). Draft genome sequence of a virulent *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* isolate causing soft rot of cucumber. *Genome announcements*, 4(1), e01530-15.
- Pandey, A., G. Szakacs, C.R. Soccol, J.A. Rodriguez-Leon and A.T. Soccol. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.*, 7: 203-217.
- Powar, V. K. and Jagannathan, V. (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151, 1102- 1108.
- Raghavendra, P., Halami, P.M., 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International Journal of Food Microbiology* 133, 129-134.
- Sandıkçioğlu, G., 2016. Fitaz Enzimi Üretimi ve Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel 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.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji*, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye.
- Selen, V., 2006. *Bacillus Amyloliquefaciens* ile α -Amilaz Üretiminin Katı Substrat Fermantasyonu ile İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fırat Üniversitesi.
- Shamna, K.S., Rajamanikandan, K.C.P., Mukesh, Kumar, D.J., Balakuma ran M.D., Kalaichelvan P.T., 2012 Extracellular Production of phytases by a Native *Bacillus subtilis* Strain, *Annals of Biological Research*, 3, 979-987s.
- Simons, P., H. Versteegh, A.W. Jongbloed, P.A. Kemme, P. Slump, K.D. Bos, M.G.E. Wolters, R.F. Beudeker and G.J. Verschoor. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*, 64: 525-540.
- Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.

- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus Thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterisasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Thieman, W. J., Palladino, M.A., 2013. Biyoteknolojiye Giriş, Palme yayıncılık, Ankara 2,9,123s.
- Tortoli, E. (2003). Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria of the 1990s. *Clin.Microbiol.Rev.*, 16: 319–354.
- Tran T.T., Hashim S.O., Gaber Y., Mamo G., Mattiasson B., HattuKaul R., 2011. Thermostable alkaline phytase from *Bacillus* sp. MD2: Effect of divalent metals on activity and stability, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1000-1007s.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. and Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, *Microbiol. Rev.*, 60, 407-438.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1): 29-60
- Waleron, M., Waleron, K., Lojkowska, E., 2013. Occurrence Of *Pectobacterium Wasabiae* In Potato Field Samples. *European Journal Of Plant Pathology*. 149-158s
- Waleron, M., Waleron, K., Lojkowska, E., 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *Avrupa Bitki Patoloji Dergisi*. 457-469s
- Walsh, G., Casey A., 2003. Purification and Characterization of Extracellular Phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Bioresource Technology*, 183188s.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol.Rev.*, 51: 221–271.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *PNAS*, 97(15), 83928396.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox. G.E., (1985). A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *Syst.Appl.Microbiol.*, 6: 143–151.
- Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H., & Greiner, R. (2015). Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 711-717.
- Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H., & Greiner, R. (2015). Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 711-717.
- Yavuz, H.A., 2013. Türkiye’de Tarımsal Biyoteknoloji İnovasyon Sistemi, Yüksek Lisans Tezi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Marmara Üniversitesi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Safa Mustafa

Soyadı: KILIÇ

Doğum Tarihi: 11.07.1992

Doğum Yeri: Merkez/ Erzincan

Medeni Hali: Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Erzincan Lisesi - Merkez/Erzincan (2006)

Lisans : Atatürk Üniversitesi
Ziraat Fakültesi (2010-2015)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2015-2017)

İŞ TECRÜBESİ

Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu (2014) – Stajer – Erzincan

Poli Grup San. Tic. Ltd. Şti. (2015-2016) – Üretim Mühendisi - Erzincan