ERZURUM MEZBAHALARINDAN TOPLANAN İŞKEMBE ÖRNEKLERİNDEN SELÜLOLİTİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mustafa Özkan BALTACI

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2015
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZURUM MEZBAHALARINDAN TOPLANAN İŞKEMBE ÖRNEKLERİNDEN SELÜLOLİTİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mustafa Özkan BALTACI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

ERZURUM MEZBAHALARINDAN TOPLANAN İŞKEMBE ÖRNEKLERİNDEN SELÜLOLİTİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Mustafa Özkan BALTACI tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~ (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30./07./2015 tarih ve 30./1040..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZURUM MEZBAHALARINDAN TOPLANAN İŞKEMBE ÖRNEKLERİNDEN SELÜLOLİTİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mustafa Özkan BALTACI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada, Erzurum'da yer alan resmi ve özel kombinalardan değişik zaman dilimlerinde (ilkbahar, yaz sonbahar, kış) alınan rumen örneklerinden, selülolitik özellik gösteren ve *Achromobacter, Bacillus, Brevibacillus, Citrobacter, Clostridium, Enterococcus, Escherichia, Exiquobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Macrococcus, Neiseria, Ocrobactrum, Paenibacillus, Paleobacter Shigella, Staphylococcus, Streptococcus* ve *Streptomyces* cinslerine ait toplam 37 örneğin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu yapıldı.

Selülolitik özellik gösteren ve birbirinden farklı olduğu düşünülen bakterilerin tuz, pH ve sıcaklık ihtiyaçları belirlendi. İzole edilen bu bakteri suşlarının %2-10 oranında tuz, 3-10 pH değerinde ve 10-45°C sıcaklıkta büyüyebildikleri tespit edildi. İlginç bir şekilde OZK24 suşunun%13 tuz oranı ve 11 pH değerinde ortamda varlığını devam ettirebildiği gözlemlendi.

Ayrıca bütün izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin sekans analizleri yapıldı. Bu sekans sonuçlarına göre OZK21 suşunun *Macrococus caseliflavus* türüne %98 oranında, OZK30 suşunun *Clostridium magnum* türüne %97 oranında benzemesi, bu suşların yeni tür olma potansiyeline sahip olduklarını gösterdi. Sekans sonuçlarının ardından izolatların filogenetik ağacı neighbour-joining metoduna göre oluşturuldu.

2015, 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Rumen, selülolitik bakteriler, 16s rRNA, izolasyon, karakterizasyon

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CELLULOLYTIC BACTERIA COLLECTED RUMEN SAMPLES FROM ERZURUM SLAUGHTER HOUSE

Mustafa Özkan BALTACI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

In this study, isolation, identification and molecular characterization of total 37 strains belonging to *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Exiquobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Macrococcus*, *Neiseria*, *Ocrobactrum*, *Paenibacillus*, *Paleobacter Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Streptomyces* and showing cellulolytic properties were performed with rumen samples taken from the slaughter houses in Erzurum at different times of the year (Spring, Summer, Autumn, Winter).

Salt, pH and temperature requirements of the bacteria which thought to be different from each other and showing cellulolytic properties were determined. These isolated bacterial strains were determined as they could grow in 2-10% salt ratio, 3-10 pH value and 10- 45°C temperature. Interestingly, it was observed that OZK24 strain could survive in the medium at 13% salt ratio and 11 pH.

Additionally, sequence analysis of 16S rRNA gene regions of all the isolates was performed. According to these sequencing results, 98% similarity of OZK21 strain to *Macrococus caseliflavus* and 97% similarity of OZK30 to *Clostridium magnum* was shown to have the potential to be a new species of these strains. Following the sequence results, the phylogenetic tree of the isolates was drawn using the neighbor-joining method.

2015, 89 pages

Keywords: Rumen, cellulolytic bacteria, 16s rRNA, isolation, characterization

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, bu tezin hazırlanması sırasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, stresli tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Bana, Erzurum Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarını kullanma imkanı veren Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a,

Tezimin her aşamasında hem sevincimi hem de hüznümü paylaşarak sürekli iletişimde bulunduğum, laboratuar çalışmalarımda ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Enver Fehim KOÇPINAR, Sayın Nurdan GÖNÜL, Sayın Sümeyya ARSLAN ve Sayın Şeyda Nur ÇAKIR'a

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında manevi desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN, Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a

Son olarak tüm hayatım boyunca maddi-manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım annem Ayşe BALTACI ve saygı değer babam M. Nazım BALTACI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Mustafa Özkan BALTACI
Temmuz, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Prokaryotik Sistematiği 2
1.1.1. Bakteri sistemetiğinde kullanılan yöntemler 5
1.1.1.a. Moleküler yöntemler 5
1.1.2. Dizi verilerinin analizi ve filogeni 14
1.2. Rumen 16
1.2.1. Rumen parametreleri 19
1.2.1.a. Rumen ortamı 19
1.2.1.b. Rumen nemi 19
1.2.1.c. Rumen sıcaklığı 20
1.2.1.d. Rumen pH'sı 20
1.2.1.e. Rumen uçucu yağ asitleri 20
1.2.1.f. Rumen amonyağı 21
1.2.1.g. Rumene madde giriş ve çıkışı 21
1.3. Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi 22
1.3.1. Rumen bakterileri 22
1.3.1.a. Rumen selülolitik bakterileri 22
1.3.1.b. Hemiselülotik rumen bakterileri 23
1.3.1.c. Amilolitik rumen bakterileri 24
1.3.1.d. Pektinolitik rumen bakterileri 24
1.4. Ekosistem Açısından Selülolitik Bakterilerin Önemi 25
2. KURAMSAL TEMELLER 27
3. MATERYAL ve YÖNTEM 32
3.1. Materyal 32

3.1.1. Kimyasallar 32
3.1.2. Çözeltiler 32
3.1.3. Besiyerleri 35
3.1.4. Kitler 38
3.2. Yöntem 38
3.2.1. Örnek toplanması 38
3.2.2. Selülolitik bakterilerin izolasyonu 38
3.2.3. Plaka boyama yöntemiyle selülolitik bakterilerin kantitatif taraması 39
3.2.4. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanılarının yapılması 39
3.2.4.a. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi 39
3.2.4.b. Fizyolojik özelliklerin tespiti 41
3.2.5. Biyokimyasal testler 42
3.2.5.a. Katalaz testi 42
3.2.5.b. Oksidaz testi 42
3.2.5.c. Nitrat redüksiyon testi 43
3.2.6. Moleküler testler 43
3.2.6.a. 16 S rRNA gen bölgesinin klonlanması 43
3.2.7. GTG_5-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi 52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 54
4.1. Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu 54
4.2. İzolatların Tuz, pH ve Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi 56
4.2.1. Tuz toleransı 56
4.2.2. Sıcaklık toleransı 57
4.2.3. pH toleranslarının belirlenmesi 58
4.3. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 60
4.4. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu 61
4.5. Amplifiye Edilen 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması 61
4.6. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizilerine Göre Benzerlik Oranları 62
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 74
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 90

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
BSA	: Bovin Serum Albumin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
IPTG	: İzopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
ITS-PCR	: Internally Transcribed Spacer PCR
M	: Molar
Mm	: Milimolar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RecN	: DNA repair and genetic recombination protein
Rep-PCR	: Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
RpoB	: DNA-directed RNA polymerase, beta subunit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
gr	: Gram
dk	: Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bakteriyal bir suşun karakterizasyonu ve sınıflandırılması arasındaki ilişkiyi gösteren akış diyagramı 3
Şekil 1.2. Ruminatlarda sindirim sisteminin kısımları 17
Şekil 1.3. Rumendeki mikroorganizma çeşitliliği 18
Şekil 2.1. *Ruminococcus flavefaciens*'in hücre dışı fibrolitik enzimlerinin inkübasyonu kaba arpa samanının yıkımına etkisi 30
Şekil 4.1. OZK1 ve OZK24 şuslarına ait petri görüntüleri 55
Şekil 4.2. OZK26, OZK27, OZK30, OZK32, OZK33 suşlarına ait petri görüntüleri 56
Şekil 4.3. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü 61
Şekil 4.4. Mavi-beyaz tarama 62
Şekil 4.5. Bazı izolatların koloni-PCR sonuçları 62
Şekil 4.6. OZK1, OZK2, OZK3, OZK4, OZK6, OZK26 ve OZK32 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 64
Şekil 4.7. OZK15, OZK16, OZK17, OZK19, OZK29 ve OZK33 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S Rrna gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 65
Şekil 4.8. OZK14 ve OZK25 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining 66
Şekil 4.9. OZK23, OZK24, OZK28 ve OZK30 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı ... 67
Şekil 4.10. OZK8, OZK10 ve OZK18 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 68

Şekil 4.11. OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK31, OZK34 ve OZK35 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 69
Şekil 4.12. OZK7, OZK21 ve OZK37 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 70
Şekil 4.13. OZK5, OZK9, OZK11, OZK12 ve OZK36 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı . 71
Şekil 4.14. Bakteri izolatlarının GTG_5- PCR elektroforez sonuçları 72
Şekil 4.15. Bakteri izolatlarının GTG_5- PCR elektroforez sonuçları 73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunda kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları 46
Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü 47
Çizelge 4.1. Selülolitik özellikteki suşlar ve bunların suşların izole edildiği mevsimler..... 54
Çizelge 4.2. İzolasyonu yapılan rumen bakterilerinin tuz toleransları 57
Çizelge 4.3. İzole edilen selülolitik rumen bakterilerinin sıcaklık toleransları 58
Çizelge 4.4. İzole edilen rumen bakterilerinin pH toleranslarının belirlenmesi 59
Çizelge 4.5. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri..... 60
Çizelge 4.6. OZK1, OZK2, OZK3, OZK4, OZK6, OZK26 ve OZK32 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları 64
Çizelge 4.7. OZK15, OZK16, OZK17, OZK19, OZK29 ve OZK33 izolatlarının, EzTaxon'da kayıtlı tip türlerin 16S Rrna gen dizilerine olan benzerlik oranları 65
Çizelge 4.8. OZK14 ve OZK25 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları 66
Çizelge 4.9. OZK23, OZK24, OZK28 ve OZK30 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları 67
Çizelge 4.10. OZK8, OZK10 ve OZK18 izolatlarının, EzTaxon'da kayıtlı tip türlerin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerlik oranları..... 68
Çizelge 4.11. OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK31, OZK34 ve OZK35 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları 69
Çizelge 4.12. OZK7, OZK21 ve OZK37 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları 70
Çizelge 4.13. OZK5, OZK9, OZK11, OZK12 ve OZK36 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları ... 71

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ve hızla artan dünya nüfusunun bir sonucu olarak, enerjiye olan talep sürekli artmaktadır. Bununla birlikte fosil enerji rezervlerinin sınırlı ve yakın bir gelecekte tükenecek olması günümüzde alternatif enerji kaynaklarının daha verimli bir şekilde değerlendirilmesi mecburiyetini doğurmaktadır. 1973 yılında yaşanan dünya enerji krizi, mevcut kaynakların tükenmek üzere olduğunu bizlere göstermekte bu da insanlığın, enerji konusuna olan ilgisini arttırmaktadır. Dünyada birçok ülke, tükenebilir enerji kaynaklarına olan bağımlılığı azaltmak için, yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarından daha fazla yararlanma yoluna gitmektedir. Selüloz bu yenilenebilir kaynakların başında gelmektedir (Özpınar 2007).

Selüloz, bitkilerin temel yapı taşı olup, doğada bulunan en yaygın polisakkarittir. Otçul hayvanların beslenmesinde de oldukça önemli bir besin kaynağıdır. Bu yüzden hayvanların bu besin kaynağından etkili ve verimli bir şekilde yararlanması; hem et, süt, yapağı, tiftik vb. verim özelliklerinde artışa, hem de daha sağlıklı bireylerin oluşmasına sebep olmaktadır. Temel bileşeni selüloz olan bitkilerin, hayvanlar tarafından alınmadan önce ya da alındıktan sonra parçalanmasının, hayvanların selülozu sindiriminde hayati önemi vardır. Zira selüloz inatçı yapısıyla parçalanmaya oldukça dirençlidir. Bu direnç, hem selülozun kristal yapısından hem de içinde bulunduğu hemiselüloz ve lignin gibi matris polimerlerden kaynaklanır. Selülozun pek çok doğal formunun suda çözünmemesi, onun parçalanmasının önündeki en zorlu engellerden biridir (Li *et al*. 2009)

Selüloz, bazı hayvan ve birkaç bakteri tarafından üretilse de, büyük oranda bitki duvarlarının ana maddesidir. Bu yönüyle bitki biyokütlesinin en bol bulunan bileşenidir. Bileşim ve anatomik yapı olarak çok farklılıklar gösterse de bitki kuru ağırlığının yaklaşık %35-50'sini selüloz oluşturur. Bazı durumlarda (pamuk gibi) selüloz neredeyse saf olarak bulunurken, çoğunlukla hemiselüloz ve lignin gibi başka biyopolimerik matrisin içine gömülü durumdadır. Bu polimerler sırasıyla bitki kuru ağırlığının %20-35 ve %5-30 kadarını oluştururlar. Bu matris ise, bitki biyokütlesinin

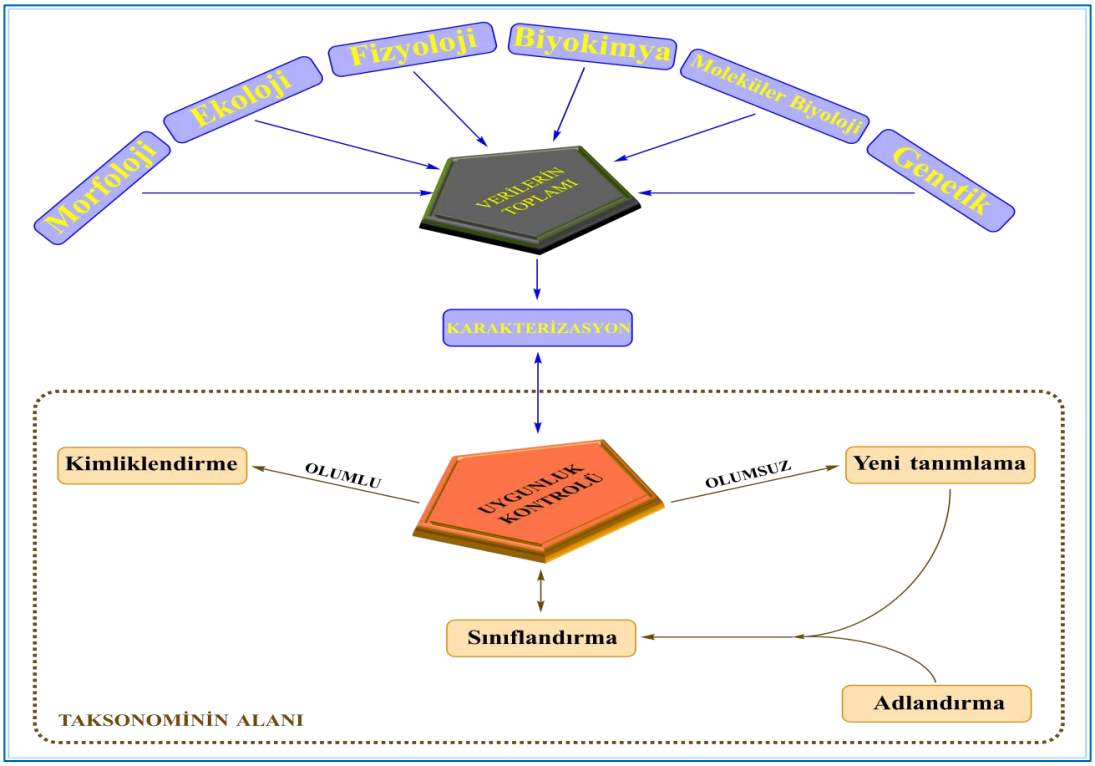
verimli bir şekilde kullanılmasına engel teşkil eder. Bitki biyokütlesi, tek öngörülebilen ve sürdürülebilir yakıt olmakla birlikte, insanlığın kullanımına sunulan önemli bir materyaldir. Aynı zamanda selülozik biyomateryallerin hem ucuz olması, hem de bol miktarda bulunmasından dolayıda oldukça caziptirler.

Bu önemli kaynağın kullanımının önündeki ana engel, inatçı denilebilecek derecede zor olan yapısının parçlanması için uygulanacak işlemlerin oldukça yüksek maliyetli olmasıdır. Bu zorluğu aşabilmek için selülolitik enzimlerin üretimini yapan mikroorganizmaların kullanılması faydalı bir strateji olmuştur. Selülolitik enzimlerin de üretildiği en cazip ortam hiç kuşkusuz rumen ortamıdır. Bu yönüyle selülolitik rumen bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve karakterizasyonu yani rumen ortamının prokaryotik çeşitliliğinin ortaya konulması çok büyük önem arz etmektedir.

1.1. Prokaryotik Sistematiği

Taksonomi genellikle sistematik kelimesiyle eş anlamlı kullanılmasına rağmen, birbirinden farklı iki biyolojik terimdir. Sistematik; organizmaları düzenli biçimde karakterize edip sıraya koyan bilimsel bir çalışmadır (Madigan and Martinko 2009). Cowan 1968 yılında prokaryotik sistematiğin taksonomiyi içinde barındırdığını belirtip, taksonominin içeriğini; sınıflandırma, isimlendirme ve tanılama olarak bilinen, birbiriyle ilgili üç alt bilim dalından oluştuğunu belirtmiştir. Stainer ise 1986'da taksonomiyi "biyolojik sınıflandırma sanatı" olarak tanımlamıştır (Ludwig and Klenk 2005) (Şekil 1.1). Sistematiğin ilk adımı olan sınıflandırma, organizmaları benzerlikleri ya da farklılıklarına göre taksonomik gruplara ayırır ve sonuçta sistematik bir düzen oluşturur. İki takson arasındaki akrabalık ilişkilerini göstermek için en kısa ve akılcı yol olan sınıflandırma, sabit bir isimlendirme ve güvenilir bir tanımlama için ön koşul olup, genellikle tanımlama ile karıştırılmaktadır (Trüper and Schleifer 2006; Goodfellow and Fiedler 2010). Bu nedenle de taksonominin iki bileşeninin de dikkatlice ele alınması gerektiğini belirtmişlerdir. Bunlardan ilki, türlerin ya da temel taksonomik birimlerin tanımlanması ya da kimliklendirilmesi, diğeri ise bu birimleri sıralayıp kataloglamak için uygun bir ilerleyişin planlamasıdır. İkinci adım olan isimlendirme, taksonomik bir

hiyerarşinin oluşturulmasında kullanılan terimlerden ve kurallardan oluşmaktadır. İsimlendirilmenin doğru şekilde yapılması için International Nomenclature of Bacteria (Lapage and Saniyeeath 1992)'nin birbirini izleyen basımlarında değinilen uluslararası kurallar ve tanımlanan isimler kullanılmaktadır. 1975 yılında yayımlanan 'Bacteriological Code' daki iki yeniliğin prokaryotik nomenclature (adlandırma) üzerinde geniş kapsamlı etkisi olmuştur. 1 Haziran 1980'den itibaren uluslararası literatüre girmiş olan türlerin tanınması için "Bakteri isimlerinin onaylanmış listesi" (Approved lists of bacterial names) isimli kaynakta yayınlanma zorunluluğu gelmiştir. Ayrıca yeni takson isimleri ancak International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM; eski ismi International Journal of Systematic Bacteriology) adlı dergide yayınlandıktan sonra geçerli olacağı belirtilmiştir. Bu düzenleme tür, cins ve diğer taksonomik seviyelerin onaylı yeni isimlerinin kabul edilmesi işleminin tümünün IJSEM tarafından üstlenildiğini ifade etmektedir (Goodfellow and Fiedler 2010).



Şekil 1.1. Bakteriyal bir suşun karakterizasyonu ve sınıflandırılması arasındaki ilişkiyi gösteren akış diyagramı

*Beşgen şekli karakterizasyon ve sınıflandırma arasındaki iki önemli adımı temsil etmektedir (Trüper and Schleifer 2006)'dan uyarlanmıştır.

Üçüncü ve son adım olan tanımlama; incelenen organizmanın daha önce belirli bir taksonomik kategoriye yerleştirilmiş bir organizma olup olmadığının araştırılması işlemidir. Bir organizma tanımlanırken kemotaksonomik, moleküler sistematik, nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla elde edilen fenotipik ve genetik özellikler temel alınmaktadır. Polifazik taksonomi olarak adlandırılan bu uygulama Colwell tarafından 1970 yılında yüksek kaliteli veri setleri elde etmek amacıyla literatüre kazandırılmıştır (Vandamme *et al.* 1996; Gillis *et al.* 2005, Goodfellow and Fiedler 2010). Polifazik taksonominin kullanılması, sınırlarının sürekli revize edildiği Actinobacteria ve Cyanobacteria gibi prokaryot grupların sınıflandırılmasında nitelikli gelişmelere yol açmıştır. Son derece korunmuş makromoleküllerin dizilenmesi özellikle 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi cins ve üzeri taksonomik seviyelerde filogeninin belirlenmesinde değerli bilgiler sağlamıştır (Rossello-Mora and Aman 2001). Bununla birlikte DNA:DNA homolojisi, moleküler parmak izi ve fenotipik tekniklerin birlikte kullanılmasıyla tür ve alt tür düzeyinde sınıflandırma yapmak mümkün olmuştur (Bassam *et al.* 1992; Coenye *et al.* 2005; Tindall *et al.* 2010). Prokaryotik türlerin tanımlanmasıyla ilgili bir standardın oluşturulması amacıyla 2002 yılında Ad-Hoc komitesi tarafından araştırıcılara çeşitli önerilerde bulunulmuştur. Bu da prokaryotik sistematiğin gelişmesine önemli katkı sağlanmıştır. Bu komitenin aldığı kararlardan biri prokaryotik tür tanımlanırken %70 ve üzeri DNA:DNA hibridizasyonu, %97'nin üzerinde 16S rRNA gen dizisi özdeşliği ve belirli derecede fenotipik tutarlılığın temel alınması önerilmiştir. Ayrıca yeni tanımlanan bakteri türlerinin en az iki kültür koleksiyonuna depozit edilmesi de karara bağlanmıştır (Coenye *et al.* 2005). Son yıllarda dizileme teknolojisinde kaydedilen gelişmeler artık prokaryotik organizmaların tüm genomunun analizine olanak sağlamıştır. Kasım 2009'da 1000. prokaryotik genom analizi tamamlanmıştır. Bu *Haemophilus influenzae* ve *Mycoplasma genitalium* ile 1995 yılında başlayan genom analizlerinin dönüm noktası olmuştur (Fraser *et al.* 1995; Lagesen *et al.* 2010). Genomunun nükleotit dizisi belirlenen bu 1000 prokaryotik organizmanın %7'si Archeae, geri kalan %93'lük kısmı Bacteria domainlerine aittir

(Lagesen *et al.* 2010). Prokaryotik taksonların tanımlanmasında kullanılan yöntemler Tindall *et al.* (2010) tarafından ayrıntılı olarak ele alınmış, genomik metodların güçlü ve zayıf yönleri Schleifer (2010) tarafından aydınlatılmıştır.

1.1.1. Bakteri sistemetiğinde kullanılan yöntemler

Son zamanlarda, prokaryot taksonomistleri güvenilebilir bir sınıflandırmanın, sadece sistematiğin kabul edilmiş bir modeli olan 'çok yönlü sistematik' teknikleriyle yapılabileceğinde hemfikirdirler. Prensip olarak çok yönlü sistematik bütün genotipik ve fenotipik bilgiyi birleştirmektedir. Genotipik bilgi; hücre yapısındaki nükleik asitlerden (DNA, RNA) elde edilirken, fenotipik bilgi, organizmanın fiziksel, biyokimyasal karakterlerinden ve genomdan eksprese edilen diğer özelliklerinden elde edilir. Bu yöntemler kullanılarak, genotipik ve fenotipik bilgi mümkün olduğu kadar geniş ölçüde araştırılabilmektedir ve bu sayede de bakterilerin farklı sistematik seviyelerde sınıflandırılması, karakterizasyonu yapılabilmektedir. Bakterilerin genotipik karakterizasyonunda kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir.

1.1.1.a. Moleküler yöntemler

1. 16S rRNA gen dizileme

16S rRNA gen dizileme, bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında, herhangi bir ortamdan izole edilen bakterilerin tanımlanmasında, 1980'lerden beri kullanılan güçlü bir tekniktir (Busse *et al.* 1996). 16S rRNA gen bölgesinin, bakteriler arasında evrensel ve işlevinin sabit olması, korunaklı bölgelerin yanında türe özgü değişiklik gösteren bölgeleri içermesi, bakterilerin cins veya tür seviyesinde araştırmacılara açık veritabanları kullanılarak tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Vandamme *et al.* 1996). Karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizi analizleri modern taksonominin vazgeçilmezleri arasındadır. 2000'li yıllardan itibaren PCR kullanımının ve DNA dizilemenin yaygınlaşmasının sonucu olarak; 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuarlarında bakteriyal izolatların doğru şekilde

tanımlanmasında ve yeni suşların literatüre kazandırılmasında kilit nokta olmuştur. 16S rRNA gen dizileri ile yapılan sınıflandırma, fenotipik tiplendirmeye dayalı sınıflandırmadan çok daha objektif ve güvenilir bir sınıflandırmadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuarlarında geleneksel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde (Gram boyama ve biyokimyasal testler) test sonuçları kültür koşullarından ve büyüme karakteristiklerinden etkilenmektedir. 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi; bakteri izolatlarının tanımlanmasında, özellikle mikrobiyoloji laboratuarlarında anormal fenotipik profiller gösteren, nadir görülen, geç büyüyen ya da kültürü yapılmayan bakterilerin karşılaştırılmasında oldukça önemli rol oynamaktadır. Mikrobiyal filogenetik akrabalıkların belirlenmesinde rRNA dizilerinin kullanılmasının avantajları bulunmasına rağmen; yalnızca rRNA dizilerini temel alan filogenetik ağaçların kullanılması bazı potansiyel problemleri beraberinde getirmektedir (Goldenfeld and Woese 2007). Öncelikle rRNA dizilerinin bazı karakteristikleri temel alınarak yapılan filogenetik ağaçlarda benzer nükleotidlerin sıklığı, farklı bölgelerdeki tekrarlı bölgelerin birbirinden bağımsız olmayışları, nesiller arasındaki tekrar oranlarındaki varyasyonlar, uzak akraba taksonlar arasındaki DNA hizalamalarında bazı anlamsızlıklar sebebiyle türlerin gerçekte olduğundan daha yakınmış gibi görünmelerine sebep olabilmektedir. Bu da filogenetik mutasyon oranının düşük olmasına, birbiri ile ilişkili türler arasında ayırt ediciliğinin az olmasına ve filogenetik markör olarak 16S rRNA dizisinin kullanımında, önemli bir dezavantajla karşı karşıya gelmemize neden olmaktadır. rRNA dizilerini temel alan filogenetik ağaç, bu genlerin filogenetik geçmişini doğru şekilde yansıtsa bile, bütün olarak türün geçmişini doğru yansıtmayabilir. Örneğin lateral gen transferiyle, bazı türlerin genomlarında farklı zamanlarda oluşmuş farklı özellikler, bir mozaik halinde bulunabilir. Her ne kadar rRNA dizilerinin türler arası transferi olasılık dışı gibi görünse de, diğer genlerde bu transfer olabilir. Bu sebeple bir genomun tarihini ve tür içindeki mozaikliği görmek adına aynı türde farklı gen bölgelerinin filogenisine bakmak önemlidir (Coenye *et al.* 2005). Sonuç olarak, rRNA dizilerinin birçok bakteride çoklu kopyalarının olduğu bilinmektedir. Bu türleri karşılaştırmakta kullanılan genler ortholog değil de paralog olabilir ve bu da oluşturulan gen ağaçlarının tür ağaçlarından farklı olabilme ihtimalini de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal sistematikle ilgilenen

araştırmacılar, rRNA dizileriyle karşılaştırabilecekleri diğer DNA dizilerine yönelmişlerdir.

2. Multilokus dizi analizi (MLST)

MLST global epidemiyoloji perspektifiyle geliştirilen, baz dizi temelli tiplendirme sistemidir (Chan *et al.* 2001). 16S rRNA gen dizileme analizleri bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde oldukça sık kullanılan temel bir metot olmasına rağmen, bilim adamları bazı noktaların gözardı edilmemesi görüşündedir. Bunlardan biri *Mycobacterium, Streptomyces* gibi bazı bakterilerde, 16S rRNA gen bölgesinin bir organizmada birden çok kopyasının bulunabilmesidir (Reischl *et al.* 1998; Ueda *et al.* 1999; Acinas *et al.* 2004). Ayrıca, 16S rRNA'nın, genomun küçük bir kısmını oluşturması, son derece korunaklı olduğundan dolayı oldukça yavaş değişikliğe uğraması, protein kodlamadığından dizi üzerindeki eklenme ya da silinmelerin takibinin zorluğu sebebiyle mikrobiyal çeşitliliğin ve filogenetik akrabalıkların belirlenmesinde tek başına kullanılması tavsiye edilmemektedir (Santos and Ochman 2004). Bu gibi sebeplerle özellikle Aktinomiset sınıflandırılmasında kullanılacak farklı hedef gen bölgelerinin ve alternatif genetik metotların arayışı gündeme gelmiştir (Kim *et al.* 2003). Bu aşamada en zor basamak, hangi gen bölgesi ya da gen bölgelerinin karşılaştırmada kullanılacağına karar verilmesidir. *recA, gyrB* veya *rpoD* benzeri yapısal genler veya 16S rRNA benzeri korunan makromoleküllerin dizi karşılaştırması, son yıllarda prokaryotik taksonomide standart uygulamalar haline gelmiştir (Miller and Kokjohn 1990; Davis *et al.* 1991; Yao and Vining 1994). Bununla birlikte, tek gen ağacı kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalar organizmalar arasında ilişkiyi yansıtmada yeterli olmayabilir. Çünkü yatay gen transferi (HGT), farklı mutasyon oranları ve rekombinasyon oranındaki farklılıklar, bunu engelleyebilir. Korunan ortolog proteinlerinin geniş kombine düzenlenmelerini temel alan ağaçlar daha güvenilir olarak görülmektedir (Golding and Gupta 1995; Coenye *et al.* 2005). Bakteriyolojide türlerin tanımlanması için Ad-Hoc komite en az beş yapısal gen bölgesinin filogenetik olarak yeterli bilgiyi sağlayacağını belirtmiştir (Stackebrandt *et al.* 2002). Alternatifler gün geçtikçe artmakla birlikte Aktinomiset sistematiğinde yapılan çalışmalar özellikle *rpoB,*

recA, gyrB, tufA, atpD, hsp65, secA1 üzerine yoğunlaşmıştır (Wellington 2009). Son yıllardaki çalışmalar, yapısal genlerdeki dizileme ile genom ilişkilerinin kesin olarak belirlenebildiğini ve tür seviyesinde tanımlamada kullanılabildiğini göstermiştir. Zeigler beş gen bölgesinden daha az bölge çalışıldığında, elde edilen sonuçların, DNA-DNA hibridizasyon çalışması sonucunda elde edilecek verilere denk ve uyum içerisinde bulunması gerektiğini vurgulamıştır. Adekambi ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında, çalışılacak gen bölgelerini seçerken dikkat edilmesi gereken kriterler şu şekilde özetlenmiştir:

i- 16S rRNA gen bölgesinde olduğu gibi seçilecek gen bölgesi, organizma tarafından hücrenin hayat döngüsü boyunca sürekli kullanılmalıdır.
ii- Genler genom içinde tek kopya halinde bulunmalıdır.
iii-Tek gen bölgesiyle çalışıldığında yeterli ayrımın sağlanabilmesi için en az 900 nt'lik bir bölge ile çalışılmalıdır.
iv- Kullanılan gen bölgesi, HGT ya da rekombinasyona meyilli olmamalıdır.
v- Birbiriyle bağlantılı genlerle çalışılmaktan kaçınılmalıdır.
vi- Uygun primerin dizayn edilip kaliteli ürün elde edebilmek için çalışılacak gen bölgesinin en az iki yüksek derecede korunmuş gen bölgesi içermesi gerekmektedir.
vii- Çalışılacak bölgeden elde edilen dizinin genom verileriyle uyuşması gerekmektedir.

Multilokus sekans analizleri; *Escherichia coli, Klebsiella, Rhizobium, Pseudomonas, Vibrio* gibi Gram (-) bakteri cinslerinde ve *Kitatospora, Mycobacterium, Micromonospora, Nocardia, Streptomyces* gibi birçok farklı Gram (+) bakteri cinslerinde başarıyla uygulanmıştır (Yamamoto and Harayama 1995; Kasai *et al.* 2000; Gaunt *et al.* 2001; Dauga 2002; Thaithongnum *et al.* 2006; Guo *et al.* 2008; Takeda *et al.* 2010).

3. *rpoB* gen bölgesi

MLST gen bölgelerinden biri olan *rpoB* gen bölgesi, bakterilerde DNA bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan bölgedir ve rifampisin gibi antimikrobiyal ilaçlar

için önemli bir hedeftir. DNA'yı kalıp olarak kullanarak RNA sentezini gerçekleştirir. RNA polimeraz enziminin merkezinde, dört farklı alt ünite bulunmaktadır. Bunlar *α2ββ′ω* konfigürasyonunda, alfa (*α*), beta (*β*), beta′ (*β′*), omega (*ω*) alt üniteleridir. *β*-alt ünitesinin yapısal gen bölgesi olan *rpoB* nükleotid dizisi, birçok bakterinin filogenetik analizlerinde başarıyla kullanılmış bir gen bölgesidir. *E. coli*'deki rifampisin direnci, *rpoB* bölgesindeki dört iyi bilinen bölgedeki nokta mutasyonu ile açıklanmıştır. (Hetherington *et al.* 1995). DNA bağımlı RNA polimerazın filogenetik analizlerde kullanılan diğer gen bölgeleriyle özellikle 16S rRNA gen bölgesiyle karşılaştırıldığında yakın akraba şuşların ayrımında genelde daha iyi sonuç verdiği düşünülmektedir (Mollet *et al.* 1997). *rpoB* gen bölgesinin nükleotid uzunluğu yaklaşık 3486-3495 nt iken, *recA* gen bölgesi 1041-1056 nt'dir. *rpoB* gen bölgesinin daha iyi ayrım yapma sebeplerinden biri de, 16S rRNA gen bölgesine nazaran daha büyük bir bölgeyi içermesidir.

Hızlı gelişen *Mycobacterium* (HGM) suşlarının taksonomik sınıflandırılmasında kullanılan gen bölgelerinden biri olarak *rpoB* görülmektedir. Kim *et al.* 2003 yılı araştırmalarına göre, cins düzeyinde aktinomisetleri ayırmada 16S rRNA gen bölgesinin yerine *rpoB* gen bölgesinin kullanımı iki sebebe dayandırılmıştır. İlki; *rpoB* gen bölgesinin yanlış sonuçlara sebep olacak ikinci bir paralog gen bölgesini bulundurmayışı, ikincisi ise; *rpoB* gen bölgesinin fonksiyonel bir gen bölgesi oluşudur. Bu nedenle yalnızca DNA dizisi değil aminoasit dizisinin de cins düzeyindeki ayrımlarda kullanılabilirliği vurgulanmıştır. Kim *et al.* 2004 yılında *Streptomyces* ve *Kitasatospora* cinslerinde *rpoB* gen bölgesinin bir bölümüyle gerçekleştirdikleri filogenetik analizlerde, *Streptomyces* cinsinde aynı tür içinde %99,7-100 gen bölgesi benzerliği elde ederken, türler arası seviyede %90,2-99,3 benzerlik gözlenmiş, elde edilen filogenetik ağaçların 16S rRNA gen bölgesinden elde edilenle uyumlu olduğu bulunmuş ve tür ayrımında kullanılabilecek güçlü bir teknik olduğu belirtilmiştir (Kim *et al.* 2003; Adekambi and Drancourt 2004; Guo *et al.* 2008).

4. *gyrB* gen bölgesi

Topoizomerazlar; DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu ve tamiri için gereklidir. TipI ve tipII olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. DNA giraz, topoizomeraz II'nin bir tipi olup, gyrA ve gyrB'yi kodlayan iki alt üniteden oluşmaktadır. Taksonomik sınıflandırmada kullanılması önerilen gen bölgelerinden birisidir. İlk kez 1995 yılında Yamamoto and Harayama (1995) tarafından, *gyrB* gen bölgesinin filogenetik analizlerde başarı ile kullanılabilecek bir markör gen olduğu açıklanmış, ardından yapılan çalışmalar ile bu gen bölgesine özgü evrensel primerler geliştirilmiş ve farklı cinslerde çalışılmaya başlanmıştır. Yamamoto *et al.* (1999) DNA:DNA hibridizasyonu (DDH) çalışmalarıyla birbirinden ayrılmış 18 genomik tür ile 46 *Acinetobacter* suşunun, *gyrB* gen bölgesi kullanılarak filogenetik analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda *gyrB* gen bölgesinden elde edilen verilerle gerçekleştirilen filogenetik gruplandırmanın DDH çalışmasından elde edilenlerle nisbeten uyumlu olduğu belirtilmiş, *gyrB* gen bölgesinin genomik tür seviyesindeki bakteriyel suşların taksonomik pozisyonunun belirlenmesinde kullanışlı bir markör olabileceği gösterilmiştir. *gyrB* gen bölgesi çalışmaları içinde hiç kuşkusuz Kasai *et al.* (2000) yayınladıkları çalışma bir dönüm noktası olmuştur. *Micromonospora* cinsine ait bilinen tüm türlerle yapılan *gyrB* gen bölgesi çalışması sonuçları, DDH sonuçlarıyla uyumlu bulunmuş ve cins, bu gen bölgesi temel alınarak revize edilmiştir. Yanez *et al. (*2003) *Aeromonas* cinsine ait tüm türlerle gerçekleştirdikleri filogenetik çalışmada, *gyrB* gen bölgesini filogenetik markör olarak kullanmış ve yaptıkları *gyrB* gen bölgesi temelli sınıflandırmanın, DDH ile uyumlu olduğunu, tüm *Aeromonas* türlerinin taksonomik sınıflandırılmasında bu gen bölgesinin kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

5. Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD-PCR)

RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) metodu bakteri sistematiğinde DNA yapısındaki polimorfizmi tespit etmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. RAPD; nükleotit dizilimi rasgele seçilmiş, yaklaşık 8-10 nükleotitten tek çeşit primer kullanılarak gerçekleştirilen, nükleotit dizi bilgisine

sahip olmaksızın polimorfizmin belirlendiği PCR çeşididir. (Bassam *et al.* 1992). Canlıların nükleotit dizilimin de gözlemlenen farklılık, primerin bağlanma yerinin değişmesine ve böylece PCR ürünleri arasında özgün bantların oluşmasına yol açar. Bu yöntemle elde edilen ürünlerin jel elektroforezi ile analizi sonucu meydana gelen bant profillerinin benzerlik/farklılık dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında bilgi edinilir (Temizkan vd 2004). Diğer metotlara nazaran hızlı bir teknik olmasına rağmen RAPD-PCR analizinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Pozitif sonucun güvenilirliğinin belirlenmesi için aynı laboratuar şartlarında farklı günlerde aynı DNA ile yapılan deneme sonuçlarının aynı olması ayrıca RAPD-PCR çoğaltımında kullanılacak DNA'nın mümkün olduğunca saf olması gerekmektedir.

Genelde nükleik asit parmak izi metotları türaltı ve/veya tür seviyesinde bilgi sağlar. Bu tekniklere örnek olarak AFLP (amplified fragment-length polymorphism PCR), PFGE (macrorestriction analysis after pulsed field gel elektrophoresis), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analizi, rep-PCR (repetitive element primed PCR) verilebilir. Fakat standardizasyon eksikliği yüzünden bu parmakizi metotlarından bazıları (örn, RAPD) farklı laboratuarlarda yapıldığında farklı sonuçlar verebildiğinden sonuçları karşılaştırmak oldukça güçtür. Bu yüzden DNA parmak izi metotları tür tanımlamasında çok kullanışlı olmamasına rağmen, tür ve alt tür seviyesindeki teşhislerde (identification) izolatın daha önce tanımlanmamış yeni bir taksonun mu, yoksa bir klonun mu üyesi olduğunu gösteren faydalı tekniklerdir (Tindall *et al.* 2010).

6. PCR ürünü restiriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), kısa DNA dizilerini spesifik olarak tanıyan ve bu dizileri yakın kısımlarından veya içlerindeki özgül bölgelerden kesen enzimlerdir. Sıklıkla kullanılan restriksiyon enzimleri arasında; *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I sayılabilir. Sayıları binleri bulan bu enzimler, Smith ve Nathans tarafından ortaya konulan basit bir yönteme göre isimlendirilmektedir. Bu isimlendirmeye göre, enzimin izole edildiği cinsin ilk harfi, daha sonra türün tanımlayıcı isminin ilk iki harfi ve en son olarak bazen soya ait bir harf ile birlikte ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamıyla enzimin izolasyon

sırası belirtilir (*E. coli* RY 13 soyu; *Eco*RI). Enzimlerin isimleri yalnızca enzimlerin orijinleri hakkında bilgi vermekte, kestiği dizilimler hakkında bilgi sağlamamaktadır (Sambrook *et al.* 2001). DNA'nın bu enzimlerden biri ya da birkaçıyla kesilmesinin ardından agaroz jel elektroforezine tabi tutulur. Etidyum bromürle boyanan jelde oluşan DNA fragmentlerinin yeri ve sayısının kıyaslandığı bu yönteme elde edilen çeşitliliğe'Restriction Fragment Length Polymorphism' adı verilir (Stackebrandt 2006).

İlk RE haritası Simian Virus 40 (SV40)'ın DNA'sının *Hind*III RE ile kesilmesiyle gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda onbir özgül fragment elde edilmiştir. Bu metotla DNA üzerindeki biyolojik öneme sahip bölgelerin pozisyonlarının belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. RFLP analizi bakteriyel DNA, ekstra-kromozomal DNA, viral genomun (DNA veya RNA) restriksiyon profillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yöntemde sırasıyla DNA izolasyonu, hedef bölgenin PCR'da çoğaltılması, çoğaltılmış DNA'nın saflaştırılması, DNA'nın RE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve görüntülenmesi yapılmaktadır (Stackebrandt 2006).

7. Genomik parmak izi analizi

Tüm organizmaların genomlarında tekrarlayan sekanslar bulunmaktadır. Ökaryotik genomlarda, DNA sekans organizasyonu tek-kopya sekanslardan meydana gelen çok sayıda tekrarın aralıklı olarak dağılmasıyla gerçekleşir. İnsan genomunda ($3x10^9$ baz çifti=bç) bulunan 300 bç Alu tekrarlayan DNA sekansları, tüm genomun %3-6'sını oluşturur ve haploid genom başına 300.000 kopya içerir. Prokaryotik genomlarda da düşük kopya sayılı tekrar sekansları bulunmaktadır (insersiyon sekansları, rRNA operonları, tRNA genleri, vb.). Bu sekanslar, kromozomal delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar gibi DNA'nın yeniden yapılanma sürecinde genomik yapıya önemli katkı sağlarlar (Rademaker and Savelkoul 2004). Prokaryotlarda tekrarlayan sekanslar ilk olarak *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli*'de tanımlanan REP (repetitive extragenetic palindrome) ve PU (palindromic unit) sekanslarıdır. REP benzeri sekanslar diğer prokaryotlarda da gösterilmesine rağmen konsensus sekansları bakteriden bakteriye değişebilmektedir. Bu sekansların rollerinin ne olduğu tam olarak

bilinmemektedir. Gen regülasyonunda rol aldıkları ve transkripsiyon sonlandırıcı oldukları düşünülmektedir. Gen ifadesinde mutlaka gerekli elementler olmamalarına rağmen, ifadeyi düzenleyici rollerinin bulunduğu düşünülmektedir (Rademaker and Savelkoul 2004). Bir diğer tekrarlayan birim ise ERIC (enterobacterial repetitive intergenic repeat unit) sekanslarıdır. Bu sekanslar kromozomlarda kodlanmayan transkriplenmiş bölgelerde bulunurlar ve bulundukları bölgeler türden türe değişiklik göstermektedir. Başlangıçta sadece *Enterobacteriaceae* ve *Vibrinoceae* türlerinde bulundukları düşünülen ERIC ve REP sekanslarının, birçok türde bulunduğu belirlenmiştir. Bu sekanslara yönelik primerler kullanılarak bakteri genomlarının parmak izi paternleri ilk olarak 1991'de belirlenmiştir. Bu bölgelerin milyonlarca yıldır korunduğu düşünüldüğünde, bu tekrarlanan elementlerin DNA-protein ilişkisinde önemli rolleri olduğu varsayılabilir (Rademaker and Savelkoul 2004). Bazı DNA giraz ve polimerazların REP sekanslarına bağlandıkları gösterilmiştir. Bu sekansların RNA'ya transkribe edildikleri ve RNA ara ürünleri olarak dağıldıkları düşünülmektedir (Rademaker and Savelkoul 2004). rep-PCR tiplendirme yönteminde birçok bakteri genomunda pekçok kopya halinde bulanan, doğal olarak var olan ve yüksek oranda korunmuş, tekrarlayan DNA dizilerine komplementer olan primerler kullanılmaktadır. rep-PCR karmaşık ve yüksek oranda özgül genomik parmak izleri oluşturur. Bu yöntem ''interrepeat spacer length polymorphism'' analizi olarak da tanımlanabilir. Bu primerlerin ve PCR'ın kullanımı REP, ERIC, BOX ve GTG_5 elemanları arasındaki farklı genomik bölgelerin selektif amplifikasyonu ile karakterizedir. Tekrarlayan diziler üç başlıkta toplanmıştır. Bunlar; REP dizileri, ERIC dizileri ve *Streptococcus pneumoniae*'nın BOX elemanıdır. Bu diziler genomda farklı gen içi pozisyonlarda bulunurlar. Oligonükleotit primerler REP ve ERIC bölgesindeki ters tekrarlardan dışarıya doğru, BOX bölgesinin box A altünitesinden DNA sentezini başlatacak şekilde tasarlanırlar. REP, ERIC ve BOX elemanları arasında kalan farklı genomik bölgeler, bu primerler kullanılarak selektif olarak PCR ile çoğaltılır. Bu protokoller sırası ile REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ve GTG_5 ile gösterilir ve genel olarak rep-PCR olarak adlandırılır (Rademaker and Savelkoul 2004). Suşlar arasında tekrar elementlerinin sayısı ve lokalizasyon farkı, moleküler tipleme için gerekli olan tipe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Bakteriyel izolatlardan elde edilen rep-PCR genomik fingerprintler tür, alt tür ve suş seviyesinde ayrım sağlamaktadır. rep-PCR ile tiplendirme kolay

uygulanabilir olması, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede kullanılabilmektedir (Rademaker and Savelkoul 2004). rep-PCR genomik parmakizi yönteminin bir avantajı da, kullanılan primerlerin çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerilerin tanısında, o organizmaya özgü parmak izi paternleri oluşturmasıdır. Bu yöntem de, genomik yapı ya da tekrarlayan diziler ile ilgili ön bilgiye ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu durum RAPD-PCR protokolleri için denemeyle ya da tesadüfen uygun rastgele primer gereksinimini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca rep-PCR konak DNA'sının (insan, hayvan ya da bitki) bulunduğu örneklerde de spesifik parmak izleri oluşmaktadır (Rademaker and Savelkoul 2004). İngiltere'de 20 hastaneden izole edilen 50 *Clostridium difficile* suşunda, tekrarlayan bölgelerin tespitine yönelik üç PCR yöntemi kullanılmıştır. ERIC-PCR yönteminin ayırt edici olmadığı, GTG_5-PCR'ın BOX-PCR'dan daha hassas olduğu ve suşların tek bir klondan kaynaklanmadığı gösterilmiştir. REP-PCR'da; palindromik kökte bulunan korunmuş 38 bç'lik DNA sekansları, ERIC-PCR'da ise ekstragenik bölgelerde bulunan 126 bç'lik DNA sekanslarına yönelik primerler kullanılırken, RAPD-PCR'da 10-20 bazlık rastgele seçilmiş primerler kullanılmaktadır. Her üç yöntemin *Francisella tularensis* suşlarının epidemiyolojik karşılaştırması için kullanıldığı bir çalışmada ayrım gücü en yüksek yöntemin rep-PCR (GTG_5) olduğu bildirilmiştir (Rademaker and Savelkoul 2004).

1.1.2. Dizi verilerinin analizi ve filogeni

Türlerin evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır ve filogenetik ağaç, bu tarihin grafiksel bir özeti olarak kabul edilir. Bu ağaç hangi organizma veya organizmaların birbirine daha yakın, hangilerinin ise uzak olduğunu belgeler. Tindall *et al.* (2010) göre organizmalar arasındaki genetik mesafeyi hesaplamak için bakteri sistematiğinde en sık kullanılan ve kullanımı tavsiye edilen parametrenin, Jukes and Cantor (1969) tarafından önerilen ve kendi isimleriyle anılan parametre olduğunu belirtmiştir. Bu modelde, tüm nükleotid pozisyonlarında bağımsız değişimin olduğu kabul edilir ve bu sebeple diğer üç bazın birbirine dönüşümünde eşit olasılık vardır. NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi genetik mesafe matriksinden faydalanarak kümelemeyi

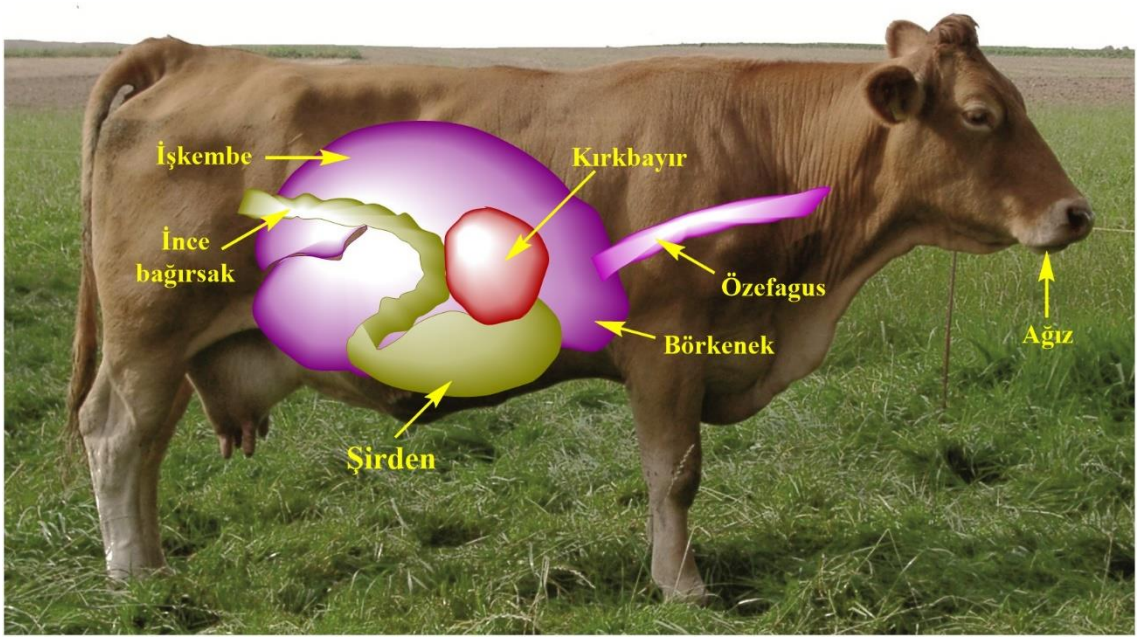
gerçekleştiren bir yöntemdir. Filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul eder. Bu sebeple OTU (Operational Taxonomic Units; Üzerinde çalışılan taksonomik birimler)'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanmasına olanak sağlar (Saitou and Nei 1987). UPGMA (Unweighted pair-group method using aritmetic averages; Aritmetik ortalamaları kullanan ağırlıksız eş-grup yöntemi) yöntemi, OTU arasındaki benzerlik algoritmasına dayalı bir gruplama yöntemidir. Genetik benzerliği en yakın olan iki OTU'dan başlayıp adım adım en uzak genetik benzerlik gösterene kadar tüm üniteleri bu bileşik topolojiye dahil etmektedir. Yöntem filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının sabit olduğunu kabul eder ve dalların köklerini esas alarak kümeleme yapmaktadır (Stackebrandt 2006). Maksimum-parsimoni (tutumluluk) metodu muhtemel ağaç topolojileri içinde en parsimonik ağacı bulmak için kullanılır. Tüm değişim sayısının en az olduğu ağaç en parsimonik olandır ve evrimsel olarak en yakın çıkarsamayı verir.

Ağaçların güvenilirlik derecesini istatiksel olarak değerlendirmek için kullanılan yaklaşımlardan biri ise seç-bağla (bootstraping) olarak adlandırılan yöntemdir. Seç bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Çalışmada kullanılan dizinin baz çifti kadar yeni bir dizi oluşturmak için bu pozisyonlardan birini rastgele seçer, bunu yeni dizinin ilk öğesi yapar ve seç bağla testine başlar. Daha sonra rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur ve bu ekleme orijinal verinin boyutu elde edilene kadar devam eder. Daha sonra yeni veri seti filogeni hesaplamak için kullanılır. Yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belirli bir dalın ortaya çıkma yüzdesi hesaplanır. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, o dalın gerçekte var olduğuna dair güven artmaktadır. Seç-bağla testi, belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir (Freeman and Herron 2007).

1.2. Rumen

Büyükbaş hayvanlar, farklı mikrobiyal toplulukları bünyelerinde barındıran rumen (işkembe) adı verilen bir sindirim organına sahiptirler. Ruminantlar olarak da bilinen bu hayvanlar, işkembelerinde yer alan mikroorganizmalar ile ruminantların temel besin kaynağı olan selülozu parçalamaktır. Bu bakteriler, bu işlevlerini salgıladıkları bir kaç enzimle yaparlar. Rumen içerisindeki önemli selülolitik bakteriler ve funguslar, sadece selülazı değil, aynı zamanda hemiselülaz ve pektinazları da içeren geniş bir enzim grubu içerirler. Birçok selülolitik rumen bakterisi polisakkaritleri enerji kaynağı olarak kullanmak için oldukça yüksek afiniteye sahiptir.

Evcil hayvan türleri arasında önemli bir yer tutan ruminantlar, bitki hücre duvarlarını yüksek oranlarda sindirebilen herbivorlardır. Bitkisel materyal ile beslenen memeli herbivorların sindirim kanalı temel olarak özofagus, mide, ince bağırsak, sekum ve kalın bağırsaktan oluşurken, Ruminant herbivorların ki ise mide rumen, retikulum, omasum ve abomasum olmak üzere dört kısımdan oluşur (Kenters *et al.* 2011) (Şekil 1.2).



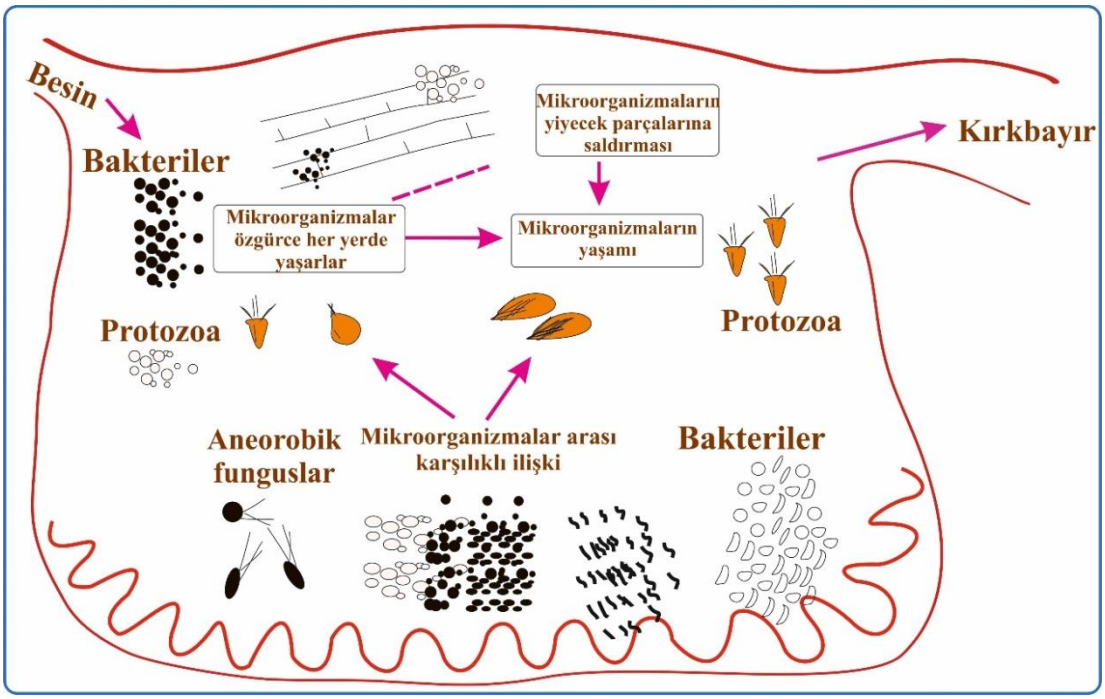
Şekil 1.2. Ruminatlarda sindirim sisteminin kısımları (Anonymous 2008a)

Tek mideli herbivorlara oranla ruminantlar, fibrilli materyalleri daha etkin bir şekilde sindirebilmektedir (Julliand *et al.* 1998). Çünkü rumen, fazla miktarlarda bitkisel materyalin uzun süreli muhafaza edilmesi ve içerisindeki mikroorganizmalar tarafından bu materyallerin sindirilmesini sağlamak üzere oldukça özel bir sindirim kanalına sahiptir (Selinger *et al.* 1996). Rumen, ruminantlarda sindirim sisteminin en büyük kısmını oluşturur ve retikulumla beraber, ineklerde hacmi 100–150 lt'ye, koyunlarda ise 10 lt'ye ulaşmaktadır (Hobson and Wallace 1982).

Rumen, redoks potansiyeli oldukça düşük olan oksijensiz bir ortam olup, bu hayvana kullandığı enerjinin korunmasında yardımcı olmaktadır. Rumendeki anaerobik ortamın sebebi, bitkisel materyallerin sindirimi esnasında oluşan gazlardır (karbon dioksit, metan, hidrojen). Diyetle alınan besinlerin içinde bulunan eser miktardaki oksijen fakültatif anaerob mikroorganizmalar tarafından kullanıldığından (Kamra 2005) rumen ortamında fakültatif anaerobik mikroorganizmalara rastlanılması doğaldır.

Ruminantların yaşamlarının farklı dönemlerinde rumenin bünyesinde bulunan temel besin maddeleri ve mikroorganizma çeşitliliği, miktarında değişiklikler

gözlemlenmektedir (Şekil 1.3). Yeni doğan canlılarda ön mideler daha küçük olduğu için, temel besinlerini süt oluştur ve alınan bu sütün sindirimini, rumende doğum sonrası dönemde bulunan mikroorganizma grubu olan *Lactobacillus, Streptococcus* ve *Clostridium* gibi bakteriler yapmaktadır. Bununla beraber, kaba yemin ve bitkisel materyallerin ilk alınmasıyla beraber yaşamlarında temel olarak ihtiyaç duydukları mikroorganizmaları bünyelerine katmış olurlar. Rumen mikroorganizmalarının, yetişkin hayvanlardan yavrularına; salya, emzirme ya da ortak kullanılan su ve yem aracılığıyla taşındığı düşünülmektedir. Yetişkin hayvanların geviş getirmeleri esnasında rumen içeriği ağıza gelmekte ve burada salyayla etkileşerek, rumen muhteviyatında bulunan mikroorganizmalar salyaya geçmektedir (Kamra 2005). Anaerobik fungusların yetişkin ruminantlardan, yavrularına geçişinde ise salya ve yemlerine bulaşmış olan dışkılarının sebep olduğu düşünülmektedir (Lowe *et al.* 1987b; Milne *et al.* 1989)



Şekil 1.3. Rumendeki mikroorganizma çeşitliliği (Anonymous 2008b)

1.2.1. Rumen parametreleri

Rumen ekolojik ortamının oluşmasında etkili olan faktörler şunlardır; nem, ısı, pH, anaerobik ortam, mikroorganizma varlığı, nötralizasyon, besin maddesi varlığı ve fermantasyon ürünleridir (Ergün vd 2001). Rumende sindirim faaliyetlerinin gerçekleşmesinde rol oynayan mikroorganizmaların varlığı doğumu takip eden ilk haftayla oluşmaya başlar ve hayvanın yaşamı boyunca devam eder. Hava girişine kapalı bir ortam olmasına karşılık yem tüketimi sırasında rumene giren az miktardaki oksijen burada bulunan mantarlar tarafından tüketilmektedir. Rumende bulunan mikroorganizmalar yaşamlarını, hayvanın tüketmiş olduğu besin maddeleri, bu maddelerin fermantasyon ürünleri ve birbirlerini tüketerek sürdürürler (Leng and Nolan 1982).

1.2.1.a. Rumen ortamı

Rumen, mikroorganizmaların besin maddelerinin bir kısmını sindirdiği bir fermantasyon ortamıdır. Bu ortamdaki mikrobiyal fermantasyonun sürekliliği, nem, sıcaklık, pH, uçucu yağ asidi (UYA) varlığı, NH_3, ortama besin madde giriş çıkışı, atık ürünlerinin etkisizleştirilmesi uzaklaştırılması, ortamın nötralizasyonu önemli rol oynar (Bölükbaşı 1989).

1.2.1.b. Rumen nemi

Rumende enzimatik reaksiyonların gerçekleşebilmesi ve mikroorganizmaların canlılığını koruyabilmesi için %90-95 oranında nemin kesinlikle bulunması gerekir. Bu ortamının nemi, salgılanan tükrük, yemlerin yapısında bulunan su ve hayvanın içtiği su tarafından oluşturur (Çalışkaner ve Demir 2001).

1.2.1.c. Rumen sıcaklığı

Rumen içi sıcaklık 37°C ile 42°C arasında değişmekte olup, ortalama rumen sıcaklığı ise 39°C'dir (Yokoyama and Jhonson 1998).

1.2.1.d. Rumen pH'sı

Rumende mikrobiyal aktivitenin optimum düzeyde gerçekleşebilmesi için rumen pH'sının, bazı araştırıcılara göre 5,5-7,0 (Church and Pond 1988) bazı araştırmacılara 7 göre ise 5,5-6,5 olması gerekmektedir (McDonald *et al.* 1981). Karbonhidratça zengin yoğun yem kullanımı rumen pH'sını düşürürken, protein ve selülozca zengin yem tüketimi ise artırmaktadır. Selüloz içerikli yemlerde rumen pH'sı 6,3-7,3, nişastaca zengin yemlerde ise 5,5-6,0 arasında değişmektedir (Kılıç 1985; Hoover 1986). Tükürük salgısı, içerdiği bikarbonat ve fosfat iyonları ile rumende tamponlama etkisi yaparak, asiditenin azalmasına yardımcı olmaktadır (Kılıç 1985: Çalışkaner ve Demir 2001).

1.2.1.e. Rumen uçucu yağ asitleri

Rumendeki mikrobiyal faaliyet sonucunda besin maddelerinin önemli bir kısmı son ürün olarak UYA'lerine dönüşür. UYA'leri rumen asiditesinin oluşmasına katkı yaptığı gibi ayrıca ruminatlarda önemli bir enerji kaynağıdır. UYA'lerinin başlıcaları asetik, propiyonik, bütirik, formik, valerik, izovalerik, kaproik, ve kaprilik asittir. Bunların yüzdelik oranları alınan rasyonun içeriği başta olmak üzere pek çok faktöre bağlı olmakla birlikte, %85'inden fazlasını asetik, propyonik, ve bütirik asit oluşturur. Rasyonun kaba yem miktarı arttıkça fermantasyon sonucu oluşan asetik asit oranı da artar (Bölükbaşı 1989; Ergün ve Tuncer 2001).

1.2.1.f. Rumen amonyağı

Yemle alınan azotlu bileşikler, rumen amonyağını oluşturan en önemli faktördür. Rumen mikroorganizmalarının önemli bir kısmının gelişmesi için gerekli olan rumen amonyak sınırları; 2 mg/100 ml ile 170 mg/100 ml arasında geniş bir varyasyon göstermektedir. Optimum sınır olan 5–23,5 mg/100 ml aralıkta ise mikrobiyal protein sentezi en yüksek orana ulaşır (Budağ 2003).

Rumen amonyak havuzunu oluşturan NH_3'ün kaynağını;

1. Rumende parçalanan gerçek proteinler
2. Rumende parçalanan protein yapısında olmayan azotlu bileşikler
3. Karaciğerden kana verilen ve tükürük yoluyla rumene geri dönen amonyak
4. Hava ve yem içerisinde bulunan ve rumen bakterileri (*Methanobacterium ruminantium*) tarafından fikse edilen serbest azot oluşturmaktadır (Taş 2008).

1.2.1.g. Rumene madde giriş ve çıkışı

Ruminant hayvanlarda kuru madde tüketimi artıkça, rumende oluşan mikrobiyal kitle miktarı da artmaktadır. Rasyondaki kuru maddenin sindirilme derecesi ile mikroorganizmaların çoğalma hızı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Rumende mikrobiyal faaliyetin tam olabilmesi için, rumene besin madde girişinin yeterli miktarda olması gerekmektedir. Rumene giren bu maddelerin niteliğinin yanında bu ortamda oluşan fermantasyon ürünlerinin uzaklaştırılması da gerekmektedir. Rumen duvarından geçebilecek boyutta bu emilimi bunların uzaklaştırılmasının bir yoludur. Diğer yol ise; belli bir küçüklüğe ulaşmış olan maddelerin rumenin ritmik hareketleri sonucunda omasuma gönderilmesidir. Böylece rumene madde girişi ve ortamdaki mikrobiyal aktivite, sağlıklı bir şekilde devam eder (Clark *et al.* 1992; Karslı 1998; Dewhurst *et al.* 2000).

1.3. Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi

Rumenin mikrobiyal ekosisteminde; bakteri (10^{10}-10^{11} hücre/ml), arkea (10^{7}-10^{9} hücre/ml), protozoa (10^{4}-10^{6} hücre/ml), mantar (10^{3}-10^{5} zoospor/ml) ve bakteriofajlar (10^{8}-10^{9} ml) bulunur (Kamra 2005; Klieve *et al.* 2005). Bu mikrobiyal ortam, bitkisel maddelerin hücre duvar yapısında bulunan ve sindirimi zor olan selülozik bileşikleri canlıların kullanabileceği forma dönüştürür. Ruminantların rumenlerinde, ruminant olmayan canlılara oranla farklılık gösteren mikrobiyal aktivite sayesinde selüloz benzeri karbonhidratlar sindirilerek uçucu yağ asitleri (UYA), karbondioksit, metan, amonyak ve mikrobiyal metabolitler oluşturulur. Bu mikroorganizma faaliyeti sonucu üretilen mikrobiyal proteinler ve vitaminler, ruminantların beslenmesinde oldukça önemlidir. (Dijkstra *et al.* 1998).

Rumende yaklaşık 200'den fazla bakteri türü izole edilmiş ve en az 20 türünün de rumende 10^{7}-10^{10} hücre/ml düzeyinde bir yoğunluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ortamda mililitredeki hücre sayısı 10^{7}'den fazla olan bakteriyal türler rumen ortamının baskın florası olarak kabul edilir (Martin 1994). Ruminantlar, rumende bulunan mikroorganizmalarla kurdukları simbiyotik ilişki sayesinde selüloz ve ksilandan oluşmuş olan bitkisel materyallerden enerji sağlarlar. Bakteriler ve funguslar bitkilerin hücre duvarını sindiren enzimleri sentezleyebilme yetisine sahiptirler ve selüloz sindirimine katkıları %80 kadardır (Zhang *et al.* 2007).

1.3.1. Rumen bakterileri

1.3.1.a. Rumen selülolitik bakterileri

Rumen içindeki bakteri türlerinin oranı hayvanların beslendiği yemin cinsine göre değişmekte olup, bu bakteri türleri rumen ekosisteminde değişime sebep olurlar. Rumen içerisinde, yemlerde bulunan selülozu sindirme yeteneği olan başlıca bakteri türleri *Fibrobacter succinogenes* ve *Ruminococcus flavefaciens*'dir. Bu türler yüksek selülaz üretim aktivitesine sahip olup, kristal formdaki selülozu sindiren mikroorganizmalardır

(Bryant 1973; Pettipher and Latham 1979; Forsberg 1981; Groleau and Forsberg 1981; Cheng 1984; Dehority 1993; Seo 2013). Rumende keşfedilen ve azda olsa selüloz sindirme potansiyeline sahip diğer bakteri türleri ise *Eubacterium* (*Cillobakterium*) *cellulosolvens* (Bryant 1959) *Clostridium lonsgisporium* ve *Clostridium locheadii*'dir (Weimer 1996). Rumen içindeki selüloz ve hemiselülozu sindirme kabiliyetleri olan bakteriler, selüloz sindiremeyen bakterilere göre daha fazla bulunmaktadır (Morris and Gylswyk 1980). Karakteristik olarak baskın halde bulunan rumen selülotik bakterileri yalnız selülozu besin maddesi olarak kullanırlar, *F.succinogenes ve ruminocula* ile birlikte selülozu sindirirler ve enerji kaynağı olarak yalnız nişasta içeren besi ortamında gelişirler. (Hungate 1966).

1.3.1.b. Hemiselülotik rumen bakterileri

Rumen içerisinde hemiselülaz aktivitesine sahip olan birkaç tür protozoa, fungus ve bakteri izole edilmiş olup, (Orpin and Joblin 1988; Stewart and Bryant 1988; Williams and Coleman 1988) bakterilerin hemiselülaz aktivitesi diğer mikroorganizmalardan daha yüksektir (Hespell and Bryan 1992; Hespell and Cotta 1995). Önemli hemiselülotik bakteri türleri hemiselülozu pentoz şekerlerine parçalama özelliğine sahiptir. Hemiselülotik mikrorganizmalar hemiselülozu substrat olarak kullanırlar. (Hespell 1987; Hespell and Whitehead 1990; Dehority 1993). Baskın florayı oluşturan *B. fibrisolvens*'inde selülozu parçalama kabiliyeti bulunmakta olup, bu organizma bitkilerin hücre duvarında bulunan ksilanı, selülozdan daha fazla sindirebilme potansiyeline sahiptirler (Dehority and Scott 1967; Morris and Gylswk 1980; Hespell 1987; Cotta and Zeltwnager 1995).

R. flavefaciens ve *R. albus* yem içerisindeki hemiselülozu parçalarlarken *Fibrobacter* ve *Ruminococcus* cinsine ait bazı türler ise hemiselülozu eneji kaynağı olarak kullanır (Morrison and Gylwyk 1980; Hespell 1987; Dehority 1991; Kamra 2005).

Rumendeki önemli selülolitik bakteriler depolimeraz enzimine sahip olup, yem içinde bozulmamış halde bulunan hemiselülozu parçalar. Bununla beraber yalnızca

Ruminococcus cinsine ait birkaç tür glikozidaz aktivitesine sahip olup, oligosakkaritleri enerji kaynağı olarak kullanırlar (Coen and Dehority 1970).

1.3.1.c. Amilolitik rumen bakterileri

Çeşitli mikrorganizmaların üretmiş olduğu α-amilaz, izomeraz, β-amilaz, glukoamilaz ve α-glukozidaz enzimlerinin birlikte bir seri reaksiyonu gerçekleştirerek nişastayı tamamen amilodekstrine kadar parçalarlar. α-amilaz, amilozun asıl zincirini oluşturan α-(1-4) bağlarını rastgele koparırken, İzo amilaz α-(1-6) yan dallarını, glukoamilaz ve β-amilaz amilodeksrini glikoz ve maltoza kadar parçalar. Çok sayıda amilolitik mikrorganizmanın α-glikozidaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (McAllister 1990; Flint and Forsberg 1995).

Bu bakterilerden *P. ruminocola, R. amylophilus, B, fibrisolvens* ve *S. bovis* türleri amilaz aktivitesi gösterirler ve nişastayı substrat olarak kullanarak enerji ihtiyaçlarını karşılarlar (Cotta 1988). *S. bovis* arpa, mısır ve buğdayda bulunan nişastayı, *R. amylophilus* ve *B. fibrisolvens'*e göre çok daha hızlı sindirir (McAllister *et al.* 1990a). *B. fibrisolvens* hücre içi; *S. bovis* ve *R. amylophilus* ise hücre dışı amilaz aktivitesine sahiptir (Cotta 1988). *S. bovis* çok fazla α-amilaz aktivitesine sahip olup, son ürün olarak laktik asit ürettiği için, hayvan yemlerinin besin değerini artırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılır (Russell and Rychlik 2001).

1.3.1.d. Pektinolitik rumen bakterileri

Pektinolitik bakterilerden; *P. ruminocula, Lachnospira multiparus* ve *B. fibrisolvens* türleri pektini tamamen sindirip enerji kaynağı olarak kullanırken, *S. dextrinosolvens, S.amilolytica, S.ruminatum, Lactobacillus acidofilus, L.helveticus, L. fermentum, Bifidobaterium globosum, B. thermophilum, B. ruminale* ve *B ruminatum* izolatları ise ancak ilgili substratı asit forma dönüştürmektedir. Pektinaz bulunan rumen sıvısına inoküle edilmiş *S. bovis* ve *S. ruminantium* türlerinin bu ortamda üreme

potansiyellerinin yüksek olduğu bilinmektedir (Wojciechowicz and Ziolecki 1984; Chesson and Forsberg 1988; Heinrichova *et al.* 1989; Kamra 2005).

1.4. Ekosistem Açısından Selülolitik Bakterilerin Önemi

Yaşam döngüsünün sürdürülmesinde fotosentetik reaksiyonlar önemli olup, bu proseste temel yapısını selülozun oluşturduğu bitkiler rol oynarlar. Karbon döngüsünün en önemli sonlandırıcıları, toprakta ve hayvanların rumenlerinde bulunan mikrobiyal biyotadır. Bu yüzden mikroorganizmalar tarafından biyosferdeki selüloz kullanımı, karbon döngüsü açısından oldukça önemlidir (Lynd *et al.* 2002).

Mikrobiyal selüloz kullanımı, bunu ana besin kaynağı olarak tercih eden ruminantlardan dolayı ekosistemde giderek artmaktadır. Bu organizmaların anaerobik sindirim ve kompostlaştırma gibi biyolojik işlevleri sonucunda, önemli kirletici ajan olarak karşımıza çıkan selülozun besin döngüsüne katılımı söz konusu olmaktadır. Besin döngüsünde bu kadar önemli rol oynayan selülolitik bakterilerin, selülozu parçalama prosesi hakkında yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Bunun sebebi ise, mikrobiyal selüloz kullanımının kendine özgü karmaşıklığından ve kültüvasyon esnasında karşılaşılan problemlerden kaynaklanmaktadır (Lynd *et al.* 2002).

Bu tezdeki amacımız, ruminantların doğal florasında bulunan, biyoteknolojik uygulamalarda yüksek öneme sahip olan selülolitik bakterilerin izolasyonunu, identifikasyonunu gerçekleştirmek ve böylece ulusal kültür koleksiyonunun oluşumuna katkı sağlamaktır. Yine bu sayede canlılar tarafından yüksek miktarlarda sentezlenen selülolitik enzimlerin bilimsel literatürlere kazandırmaktır.

Bu amaçla yapılan işlemler;

1. Ruminantlardan alınan rumen örneklerinden, selülolitik bakterilerin izolasyonu
2. İzole edilen selülolitik bakterilerin kültür koleksiyonlarının oluşturulması

3. Elde edilen bakterilerin, konvensiyonel ve moleküler yöntemler ile identifikasyonunu gerçekleştirilerek, literatüre kazandırılmasıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Selüloz doğal çevremizde en fazla bulunan biyolojik materyallerin başında gelir ve kompleks organik yapısından dolayı da, hem sindirimi zor hem de kullanımı kısıtlıdır. Bu biyokütlenin, biyoteknolojik proseslerde etkin bir biçimde kullanımı, kuşkusuz endüstriyel açıdan oldukça önemli olup, bu işlem genellikle doğada bulunan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (Li *et al.* 2009). Bu alanda yapılan önemli çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Braynt *et al.* (1973), *Ruminococcus albus* ve *Butyrivibro fibrisolvens*'in bazı suşlarının selülotik olduğunu fakat bunların sadece amorf biçimdeki selülozu sindirebildiklerini belirlemişlerdir.

Morris and Gylswyk (1980), farklı bakteri suşları kullanarak yapmış oldukları çalışma sonucunda *B. fibrisolvens* saf kültürlerinin normalde *F.succinogenes, R. albus* ve *R. flavefaciens'*den daha az selülozu sindirebilme kabiliyetinin bulunduğunu göstermişlerdir.

Bisaria and Ghose (1981), anaerobik fungusların ürettiği ekstraselüler enzim kompleksinin klasik etkisinin, endoglukanazlar tarafından ilk etapta doğrusal selüloz zincirindeki kırıkların meydana getirilmesi ve bunu takiben, ekzoglukanazların β-glukosidaz (sellobiaz) tarafından hidrolize edilen glukozlardan uzaktaki kırık bölgelerdeki selülozların serbest kalması olduğunu belirtmişlerdir.

Lowe *et al.* (1987), yaptıkları çalışmalarda ksilanlı ortamda, ksilanaz ve ksilobiaz enzimlerinin her ikisinin de kültür sıvısında ksilanın parçalanarak; ksiloz, ksilobioz ve ksilooligosakkaritlerin oluşmuna sebep olduklarını belirlemişlerdir.

Hespell *et al.* (1987) yapmış oldukları çalışmada, normalde selülolitik özellik göstermeyen *Prevotella (Bakteroides) ruminocola, Butyrivbrio fibrisolvens* ve

Eubacterium ruminantium türlerinin hemiselüloz ve selülozu sindirebildiklerini göstermişlerdir.

Sarkar *et al.* (1988), *Staphylacocus* cinslerinin normalde selülolitik aktivite göstermemesine rağmen, termitlerden elde ettikleri *Staphyloccocus* cinsine ait türlerin selülozu parçalayabildiğini tespit etmişlerdir.

Dehority (1991), Miron and Ben-Ghedalia (1993), selülotik olan *F. succinogones* ve *R. flavefaciens* türlerinin aynı besiyeri ortamında üretildiklerinde, hemiselülozu tam olarak sindiremediğini, selülotik olmayan *P. ruminocula* ve *B. fibrisolvens* bakterilerinin ise tamamen sindirdiğini gözlemlemişlerdir.

Steward *et al.* (1997), genç hayvanların özellikle süt emme döneminde ve yaşlı hayvanların konsantre yemle beslenme durumlarında *L.acidophilus, L.casei, L. fermentum, L.plantarum* ve diğer laktik asit bakterilerinin bu ruminantların rumenlerinden yaygın olarak izole edilebileceğini belirtmişlerdir.

Christopher *et al.* (1999) yaptıkları bir çalışmada, proteince zengin *Calliandra calothyrsus* bitkisiyle besledikleri koyun ve keçilerin rumenlerinden; *Clostridium botunilum, Pseudobutyrivibrio ruminis, Streptococcus bovis, ve Eubacterium spp.* türlerine ait toplam 15 proteolitik bakteri izole etmişlerdir.

Ekinci and Flint (2001), rumen ekosisteminin çok çeşitli mikroorganizma türlerini içerdiğini ve bu mikroorganizmaların, bitki hücre duvarının ana bileşeni olan selülozu sindirebilen enzim ve enzim sistemlerine sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Russell and Rychlik (2001), yaptığı bir çalışmada, rumende bulunan *R. albus, Butyrivibrio fibrisolvens, Streptococcus bovis*, and *Lactobacillus fermentens* türlerinin bakteriyosin üretme potansiyellerinin bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu bakteriyosinlerin, rumen florasında bulunan diğer bakterilerin gelişimini engellediğini

ve bunun da selülolitik suşların baskın flora haline gelmesine, dolayısıyla selülozun daha kolay sindirilmesine sebep olduğunu belirtmişlerdir.

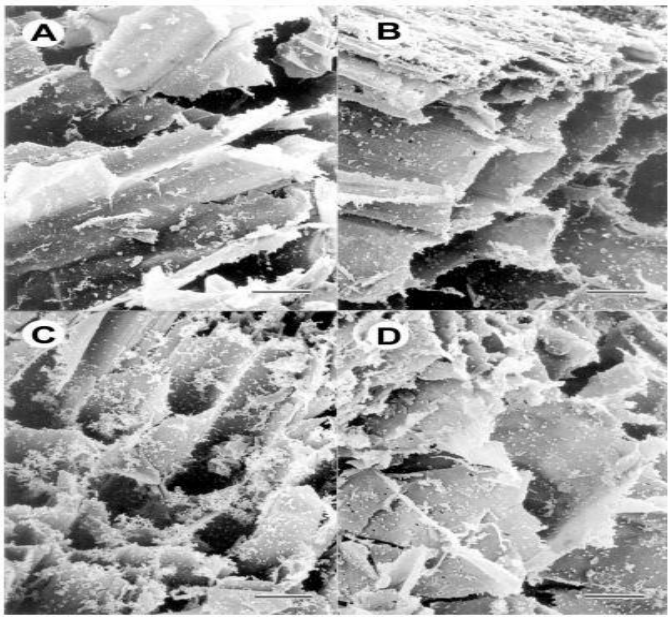
Kamra (2005), yapmış olduğu çalışmada selülozun sindiriminde hem aerobik hem de anaerobik bakterilerin rol aldıklarını herbivor hayvanlarda ve böceklerde ise bu parçalanmanın anaerobik koşullarda gerçekleştiğini göstermiştir.

Oyeleke and Okusanmi (2008) üç farklı ruminantın (koyun, sığır, keçi) rumen örneklerinden selülolitik özelliğe sahip *Streptococcus, Bacillus, Micrococcus* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin izolasyon ve identifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Li *et al.* (2009) Dünyada en fazla bulunan yenilenebilir enerji kaynağının selülozik materyaller olduğunu, fakat bu biyomateryalin polisakkarit formda kullanımının neredeyse imkansız olduğunu ve mutlaka hidroliz edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Maki *et al.* (2009) yaptığı bir çalışmada, selülozun sindiriminde genellikle ticari olarak satılan funguslar tercih edilse de, bu işlem için selülolitik bakterilerin kullanımının çok daha avantajlı sonuçlar vereceğini tespit etmişlerdir.

Wang *et al.* (2012), *Ruminococcus flavefaciens* tarafından üretilen hücre dışı fibrolitik enzimlerin, kuru yonca otu ve arpa samanının yıkımı üzerine etkisini araştırmışlar ve Şekil 2.1'de gösterilen sonuçları elde etmişlerdir. Buna göre β-glukanazın etkisi yüzeysel olurken, ksilanazın etkisi daha fazla olmuştur. Bunun sebebi selülozun bünyesinde bulunan hemiselüloz olup, en iyi bilinen formu ise ksilandır.



Şekil 2.1. *Ruminococcus flavefaciens*'in hücre dışı fibrolitik enzimlerinin inkübasyonu kaba arpa samanının yıkımına etkisi
A) Enzim yok; B) 28 µg/mL β-glukanaz; C) 280 µg/mL β-glukanaz D) 280 µg/mL ksilanaz. Çubuklar= 10 µm (Wang *et al.* 2012)

Adıgüzel vd. (2012a) Erzurumdan topladıkları et örneklerinden, 13 adet *Escherichia coli* straini izole edip, bu suşları konvensiyonel ve moleküler yöntemler kulanarak karakterize etmişler. Yaptıkları bu analizler sonucunda, rep-PCR yönteminin *Escherichia* cinsinin üyelerinin identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanabileceğini belirlemişlerdir.

Pouramezan *et al.* (2012) yaptıkları bir çalışmada, gut florasından sellülotik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonunu gerçekleştirmişler. Sonuçta elde ettikleri *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylacocus*, *Enterobacter* ve *Bacillus* cinsine ait izolatların selülolitik aktiviteye sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Adıgüzel vd. (2012b) Erzurum piyasasından topladıkları 140 adet et örneğinden, 15 tane *Salmonella* Thyphimurium suşu izole etmişler ve bunları fenotipik, genotipik yöntemler kullanılarak karakterize etmişlerdir. Sonuçta bu izolatların tür, alt tür ve hatta suş seviyesinde ki identifikasyonunda, rep-PCR'ın etkin bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Seo *et al.* (2013), yerli kore keçilerinin rumen örneklerinden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* JK7 suşunun yüksek düzeyde selülolitik ve ksilanolitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Nyonyo *et al.* (2014) inek rumen örneklerinden, kültüre edilebilir selülolitik ve ksilolitik bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişler. Toplamda 129 izolat elde etmişler ve 16S rRNA sekans analizi sonucunda, kültüre ettikleri bakterilerin %82,2'sinin *Firmicutes* filumuna ait olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan rumen örnekleri, Erzurum'da yer alan resmi ve özel kombinalardan temin edildi.

3.1.1. Kimyasallar

Karboksimetilseloz(CMC) (Sigma), K_2HPO4 (Sigma), KH_2PO4 (Sigma), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma), NH_4NO_3 (Sigma), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma), $CaCl_2$ (Sigma), NaCl, Congo Red, Gliserol, HCl, NaOH, H_2O_2, DMSO, $MgCl_2$, dNTP, TAE, Amfisilin, IPTG, X-gal, Dimetilformamid(Sigma), Soya pepton(Oxoid), Tripton(Oxoid), Agar(Oxoid) ve kazein(Sigma).

3.1.2. Çözeltiler

1XTAE ve TBE Tamponları

10X TAE/TBE	100 ml
ddH_2O	900 ml

100 ml 10XTAE veya TBE'den alınıp, hacmi 1000 ml ye tamamlandı.

Kalsiyum Klorür Solüsyonu (100 mM)

$CaCl_2$	1,11 gr
ddH_2O	100 ml

100 mM olacak şekilde (1,11 gr $CaCl_2$, 100ml saf su içinde çözülür) hazırlanıp, ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de bekletildi.

Amfisilin solüsyonu

Amfisilin	20 mg
ddH_2O	1 ml

20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlanıdı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal solüsyonu

X-Gal	40 mg
Dimetilformamid	1 ml

40 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C'de kullanılıncaya kadar bekletildi.

IPTG solüsyonu

IPTG	23,8 mg
ddH_2O	1 ml

23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C'de bekletildi.

KOH Solüsyonu

KOH	3 gr
ddH_2O	100 ml

3 gr KOH tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü ve otoklavlandı.

Lügol Solüsyonu

İyot	1 gr
KCl	2 gr
ddH_2O	100 ml

1 gr iyot ve 2 gr KCl tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Safranin Solüsyonu

Safranin	1gr
EtOH (%96)	10 ml
ddH_2O	100 ml

1 gr safranin öncelikle %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.

Kristal Violet Solüsyonu

Kristal violet	2 gr
EtOH (%96)	20 ml
ddH_2O	80 ml

2 gr kristal violet öncelikle %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 80 ml saf su eklendi.

%0,9'luk NaCl Solüsyonu

NaCl	0,9 gr
ddH_2O	100 ml

0,9 gr NaCl tartılıp, 100 ml saf su da çözüldü.

3.1.3. Besiyerleri

CMC-BHM

Kimyasal	gr/L
CMC	10
K_2HPO_4	1
KH_2PO_4	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
NH_4NO_3	1
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,05
$CaCl_2$	0,02
Agar	20

Selülolitik bakterilerin izolasyonu için kullanılan spesifik bir besiyeridir. Tabloda verilen kimyasalar tartılıp, bir miktar ddH_2O içerisinde çözüldü ve pH=6,8'e ayarlanıp, toplam hacmi 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı**.**

TSA (Triptic Soy Agar)(Oxoid CM0131)

Kimyasal	gr/L
Tripton	15
Soya pepton	5
NaCl	5
Agar	15

Triptic Soy Agar besiyerinden 40 gr tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

TSB (Triptic Soy Broth) (Oxoid CM0129)

Kimyasal	gr/L
Kazein	17
Enzymatic Digest of soybean meal	3
Dipotasyum fosfat	2,5
Glukoz	2,5

Triptic Soy Broth besiyerinden 30 gr alınıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Luria Bertani (LB) Broth (Sigma L3022)

Kimyasal	gr/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10

Luria Bertani Broth besiyerinden 20 gr tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Luria Bertani (LB) Agar (Sigma L2897)

Kimyasal	gr/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15

Luria Bertani Agar besiyerinden 35 gr alınıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Gitschier-Solüsyonu

Kimyasal	200ml için
1 M $(NH_4)_2SO_4$	16,6 ml
1 M Tris-HCl	67 ml
1 M MgCl	6,7 ml
0,5 M EDTA	1,3 ml
β-mercaptoetanol	2,08 ml

200 ml için; 1 M $(NH_4)_2SO_4$'den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8,8)'den 67 ml, 1 M MgCl'den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,8)' nin 1:100'lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14,4 ml β-mercaptoetanol Fun ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlanan solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml steril distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak 1,5 ml lik ependorf tüplerine paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Rademaker and Bruijn 1997).

3.1.4. Kitler

pGEM-T Easy Vector System: Promega-A1360; Wizard plus JV minipreps DNA prufication System: Promega-A1330; Promega wizard^{R} genomic DNA purification kit (A2360); Thermo AnaeroGen (ANOO25A)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek toplanması

Çalışmada kullanılacak olan Rumen örnekleri Erzurum piyasasından aseptik koşullara uygun bir şekilde alınarak laboratuar ortamına getirildi ve çalışma yapılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2. Selülolitik bakterilerin izolasyonu

0,5 gram Rumen örneği 50 ml steril %0,9'luk NaCl içeren falkon tüplere konuldu. 180 rpm de 1 saat süreyle 37°C'de homojenize edilerek, bir seri dilüsyon (10^{0} dan 10^{-7}'ye kadar dilüsyon serisi) hazırlandı. Hazırlanan bu dilüsyonlardan 100'er µl alınarak, Karboksimetilselozla (CMC) (pH 7,0) değiştirilmiş, CMC (10,0), K_2HPO_4 (1,0), KH_2PO_4 (1.0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), NH_4NO_3 (1,0), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,05), $CaCl_2$ (0,02), ve agar (20,0) içeren Bushnell Haas Medium (BHM) agar plakalarına yayıldı. Bu petriler hem aerobik ve hemde anaeorabik koşullarda 37°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Oksijensiz ortam sağlanması için petriler anaeobik jar içerisine alınıp, Thermo firmasına ait AnaeroGen bulunan anaerobik jar içerisi konulup, aynı ısıl derece ve süre ile inkübasyona bırakıldı. Sonuçta, petri üzerinde oluşan koloniler incelenerek birbirinden farklı olabilecekler seçildi ve bunların saf kültürleri hazırlandı (Singh 2013).

3.2.3. Plaka boyama yöntemiyle selülolitik bakterilerin kantitatif taraması

Değişik dilüsyon petrilerinden seçilen morfolojik olarak farklı olan koloniler, BHM-CMC plakalarına ekilerek 37°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi. Bu plakalar %0,1'lik kongo kırmızısı ile 20 dk muamele edildikten sonra, petri 1M NaCl ile yıkandı. Açık zon oluşturan örneklerin saf kültürleri hazırlanıp, %15-20'lik gliserol içeren stok besiyerlerine aktarıldı ve diğer karakterizasyon işlemlerine kadar, -86°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanılarının yapılması

3.2.4.a. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Seçilen bakterilerin bireysel morfolojileri, boyutlarının çok küçük olması nedeniyle ancak mikroskop ile saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelendi. Mikroskop altında, bakteriyal hücrelerin (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.), şekilleri ve boyanma özellikleri (Gram negatif veya pozitif, vb.) belirlendi (Arda 2000).

1. Gram boyama

Bu test ile, bakteri hücre duvarındaki farklılıklar ortaya konulmakta olup, bu amaç ile 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birincisi ve yaygın olarak kullanılanı; temiz bir lam üzerinde, genç bakteri kültüründen hazırlanan smear, kristal violet ile 1 dk boyanır. Bu boya hücreye nüfus etmesiyle hem Gram (+), hem de Gram (-) bakteriler, mor renge boyanır. Sürenin sonunda fazla boya hafif su akımı ile uzaklaştırılır. Preparatın üzerine lügol eklenir ve 1 dk bekletilir. Lügol bu aşamada mordan olarak kullanılır. Lügol uygulanan preparat, %96'lık etil alkol ile dikkatlice yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin

dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparat, safranin ile 20 saniye boyanır. Boyama süresi sonunda hafif su akımı ile yıkanan preparat kurutularak, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mor renk; Gram (+), pembe-kırmızı renk ise Gram (-) olarak değerlendirilir (Harley 2002; Özkan 2009; Acar 2009).

Bu metodlardan ikincisi ise; Gram (-) bakterilerin %3'lük KOH ile muamelesi sonucu, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve nükleer materyalin açığa çıkması nedeniyle, bir viskoz yapının oluşması esasına dayanır. Lam üzerine damlatılan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonu üzerine TSA'da geliştirilen 24-48 saatlik kültürden alınan bir öze dolusu bakteri, KOH solüsyonu ile 5–10 saniye karıştırıldıktan sonra, öze yukarı ve aşağıya doğru hareket ettirilir. Karışımda sakız gibi bir uzamanın olması Gram (-), olmaması ise Gram (+) olarak değerlendirilir (Farrab 2006; Saygılı 2006).

2. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi

Test izolatlarının endospor ihtiva edip etmediklerini belirlemek için, TSA besiyerine ekildi ve endospor oluşumuna neden olan stres şartlarında (sıcak-soğuk, yaşlanma, kuruma) bekletildi. Bu kültürlerden, incelemek için smear hazırlandı ve hazırlanan smear, kaynayan su banyosu üzerine yerleştirildi. Preparat malaşit yeşili ile tamamen boyandı ve üzerine kurutma kağıdı konuldu. Kurutma kağıdının sürekli olarak ıslak kalması sağlanarak, 5-7 dk malaşit yeşili ile boyamaya devam edildi. Süre sonunda, preparatın üzerindeki kurutma kağıdı kaldırılıp, preparat hafif su akımı ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı. Preparat, safranin ile 20-30 saniye kadar boyandı. Bu karşıt boya uygulamasından sonra, preparat hafif su akımı ile tekrar yıkanıp kurutuldu ve immersiyon objektifinde endospor durumları incelendi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

3. Hareketlilik testi

İzolatlar, TSB+%0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilerek bir gün inkübe edildi. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelendi (Arda 2000; Temiz 2000).

3.2.4.b. Fizyolojik özelliklerin tespiti

1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri tuz aralığının belirlenmesinde; farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10, %12 ve %13) sahip TSB besiyeri kullanıldı. Test suşları, ilgili besiyerine inoküle edildikten sonra, 37°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda selülolitik bakterilerin üeyebildikleri mininmum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometrede (OD_{600}) belirlendi.

2. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

Bakteri izolatlarının büyüme sıcaklıklarının belirlenmesinde TSB besiyerleri kullanıldı. Bu amaçla, izolatlar bu besiyerlerine inoküle edildi ve farklı sıcaklıklarda (5°C, 10°C, 15°C, 37°C, 45°C ve 55°C) inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede (OD_{600}) yapılan ölçümler sonucunda izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi (Harley and Prescott 2002).

3. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesinde; farklı pH değerlerine (pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9, pH:11 ve pH:13) sahip TSB besiyerleri kullanıldı. Test suşları, TSB besiyerlerine inoküle edilip, inkübasyon sonrasında spektrofotometrede (OD_{600}) yapılan

ölçümler sonucunda, izolatların büyüyebildikleri maksimum ve mininmum pH aralıkları tespit edildi (Dülger 1997).

3.2.5. Biyokimyasal testler

3.2.5.a. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatlarının, katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile belirlendi. Bu enzim, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayıp, H_2O ve O_2 gazına dönüştür ve O_2 gazının oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Bundan dolayı TSA'da geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen, bir öze dolusu alınarak lam üzerine konuldu ve üzerine bir damla %5'lik H_2O_2 damlatıldı. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirildi (Arda 2000; Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

3.2.5.b. Oksidaz testi

Bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle belirlendi. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum olayında görev almakta ve elektron transfer sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla aktarılarak, hücresel enerji oluşumuna sebep olmaktadır. Test; organizmanın sitokrom-c oksidase enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu test için %1 Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanıldı. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulup, üzerine TSA besiyerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklendi. Bakteride sitokrom c proteini varsa, bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek, mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. Bu durum oksidaz pozitif olarak değerlendirilip, renk değişiminin görülmemesi ise oksidaz negatif olarak kaydedildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Acar 2009).

3.2.5.c. Nitrat redüksiyon testi

Bu test, nitrat içeren bir besiyerinde (Nitrat besiyeri) anaerobik bir ortamda nitrifikasyon yapabilen obligat aerop bakterilerin ortamdaki nitratı kullanıp nitrit ve N_2'ye indirgemesi ile gelişmeleri, nitrifikasyon yapamayanların ise gelişmemeleri esasına dayanır (Adıgüzel 2006). TSA'da geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen steril çubuk öze ile tek bir koloni alınarak, nitrat besiyeri içeren tüplere saplama ekim yapıldı, üzerine 1 ml otoklavda sterilize edilerek sıcaklığı 50°C'ye düşürülen, %3'lük su agarı döküldü ve 25°C'de 5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Ortamın oksijenle ilişkisi kesilmiş olduğundan, nitrifikasyon yapabilen bakterilerin besi ortamındaki nitrattan faydalanarak gelişmeleri pozitif, nitrifikasyon yapamayanların gelişmemeleri ise negatif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006). Ayrıca bakterilerin gelişim gösterdiği bölgeye bağlı olarak fakültatif aerop ve fakültatif anaerop olarak kaydedildi (Adıgüzel 2006).

3.2.6. Moleküler testler

3.2.6.a. 16 S rRNA gen bölgesinin klonlanması

1. Genomik DNA izolasyonu

Selülolitik aktivite gösteren izolatlar, TSA besiyerinde 37°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Petrilerde gelişen organizmalardan tek koloni alınıp TSB besiyeri içeren 15 ml'lik falkon tüplere transfer edildi. Kültürler çalkalamalı inkübatörde (Markant and Pallauf 1996) 37°C'de, 150 rpm de 2 gün süre ile inkübe edildi. Daha sonra saflıkları kontrol edildikten sonra Promega wizard^R genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne uygun olarak genomik DNA'ları izole edildi.

İşlem:

- 4 ml TSB besiyerinde gelişen hücreler çöktürüldü. Çökelek 480 µl, 50 Mm EDTA (pH=8) içinde çözüldü. 120 µl, 10 mg/ml lizozim ilave edilerek, homojenize edildi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Elde edilen karışım 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenip süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonu eklenip, hafifçe pipetajlandı.
- Karışım 80°C'de 5 dk inkübe edilip, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Üzerine 3 µl RNase A eklenip, 3-5 kez alt üst edildi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklenerek üzerine 200 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklendi ve 20 saniye vortexlendi.
- 5 dk buzda inkübe edildikten sonra 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve süpernatant, içerisinde 600 µl oda sıcaklığında bekletilmiş, izopropanol bulunan yeni tüplere aktarıldı. Ependorflarda pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi.
- 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenip, süpernatant döküldü. Kurutma kağıdıyla sıvı iyice uzaklaştırıldı.
- Ependorflara 600 µl %70'lik EtOH eklenip, alt üst edildi ardından 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
- Süpernatant atılıp, EtOH uzaklaşsın diye 15-20 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Ependorflara 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenip, 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda DNA'ları içeren ependorf tüpler kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilir. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçüldü ve elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlanıldıktan sonra 260 nm'de absorbansı yeniden ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu ve yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak, A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılarak A_{260}/A_{280}=1-1,7 olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Adıgüzel 2006).

DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu (µg/ml)

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)=A_{260}**x**Seyreltme Faktörü (500)**x**50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) **x** İstenen Hacim (200 µl) **/** Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve bu hesaplamadan elde edilen değer, stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı verir. Bu miktar TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlanarak 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu yapıldı ve DNA tüpleri -86°C'de sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar saklandı (Adıgüzel 2006).

2. 16S rRNA PCR işlemi

Hedef bölge olarak bakteri sistematiği açısından önemli olan ve evrimsel açıdan korunmuş bölge olma özelliğini taşıyan 16S rRNA bölgesi, evrensel primerler kullanılarak *in vitro* koşullar altında çoğaltıldı.

Reaksiyonun hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için, 30 µl'lik reaksiyon hazırlandı. Bu amaçla; 3 µl 10 x PCR tamponu, 0,6 µl dNTPs, 0,3 µl 50 µM primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 0,3 µl 50 µM primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 1,2 µl DMSO, 1,8 µl $MgCl_2$, 0,3 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 14,1 µl steril saf su ile 25 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 3µl kalıp DNA (100 ng) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı.

Çizelge 3.1. 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunda kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsatrasyon	Miktar (µl)
PCR Buffer (sigma)	10X	3
dNTP	25 mM	0,6
$MgCl_2$	25 mM	1,8
27f	5 pmol	3
1492r	5 pmol	3
DMSO	%99	1,2
DDH_2O	-	14,1
Kalıp DNA	100 ng	3

PCR programı: Örnekler termal döngü cihazına konarak; denatürasyon basamağında 94°C'de 2 dk ve bunu takip eden denatürasyon için 94°C'de 1 dk, bağlanma basamağında 49°C'de 1 dk ve uzama basamağında 72°C'de 2 dk olmak üzere, bu üç basamak için toplam 36 tekrar olacak şekilde programlandı. Son tekrardaki ise uzama basamağı 72°C'de 5 dk olacak şekilde programlanarak, istenen DNA bölgeleri çoğaltıldı (Adıgüzel 2006).

Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü

İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

3. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

1,5 gr agaroz üzerine 150 ml 0,5XTBE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı ve 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jele 0,8 µg/ml olacak miktarda etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. Daha sonra 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 0,5XTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi.

Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 1 saat yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

4. Kompotent hücrenin hazırlanması

- *Escherichia coli* JM101 suşu stoktan canlandırıldı (3-4 faz ekim), gelişen bu kültürde ki tek bir koloni alınarak, içerisinde 4 ml LB broth bulunan 14 ml'lik tüpe inoküle edildi ve 37°C'de 1 gece süre ile çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer (Trüper and Schleifer) 10 ile çarpılır (seyreltme oranı). 3/zX10 formülü kullanılarak elde edilen rakam bize alınması gereken kültürü verir.
- 30 ml LB broth üzerine, hesaplamadan çıkan değer kadar kültür eklenerek, 37°C'de 60 – 90 dk inkübe edildi.
- 40. dk da alınan kültür, 10 kat seyreltilerek, OD_{600} ölçümü yapıldı ve 0,044-0,055'e ulaşıncaya kadar her 10 dk'da bir ölçüme devam edildi.
- Uygun değeri veren kültür 5 - 10 dk süre ile 4400 rpm'de çöktürüldü.
- Daha sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 10 ml 100 mM $CaCl_2$ eklenerek, 30 – 45 dk süre ile buzda bekletildi.
- Süre sonunda 4°C'de 10 dk 4400 rpm'de karışımın çökmesi sağlandı.Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine soğuk 2 ml 100 mM $CaCl_2$ eklendi ve buzdolabında bir gün bekletildi.

5. Ligasyon işlemi

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T_4 DNA ligaz

0,2ml lik tüplerde bir araya getirilen karışım 1 gece 16 derecede 13-15 saat bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar +4°C muhafaza edildi

6. Transformasyon işlemi

- Her bir ependorf tüpüne buzdolabından çıkardığımız kompotentten 200µl konuldu.
- Üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk buzda bekletildi.
- 2 dk süre ile 42°C'ye ayarlı su banyosunda sıcaklık şokuna uğratıldı.
- Üzerlerine 200 µl LB konulup yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C'de bekletildi.
- Daha sonra buzdolabında muhafaza edilen ve kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi sağlanan amfisilinli katı besi yerine, 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG yayıldı.
- Yüzey yeterince kuruduktan sonra, ligasyon ürünü + Kompotent hücre karışımından 150 µl alınarak petrinin ortasına konuldu ve drigalski ile iyice yayılımı sağlandı. Daha sonra petriler, 37°C'de yaklaşık 12-14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

7. Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

İnkübasyon sonunda petriler, inkübatörden çıkarılarak +4°C'de bir gece bekletildi ve petrilerde mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlemlendi. Daha sonra her petriden 5–10 kadar beyaz koloni kürdan ile alınıp, içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth bulunan tüplere inoküle edildi ve ekilen tüpler 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

8. Koloni PCR İçin Hazırlık ve PCR reaksiyonu

- Amfisilinli LB broth'da geliştirilen kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı.
- 10 dk kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra, 2 dk süreyle buzda bekletilerek ısı şokuna tabi tutuldu.
- Süre sonunda tüpler 5 dk 12000 rpm'de santrifüjlendi.
- 16,1 µl dH_2O, 3 µl tampon ($MgCl_2$'li), 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl $MgCl_2$ (25mM), 2 µl 50 µM T7 (5'-AATACGACTCACTATAG–3') primer, 2 µl 50 µM SP6 (5'–

ATTTAGGTGACACTATAG–3') primer, 0,3 µl *Taq* DNA pol, 1,2 µl DMSO ve 3 µl süpernatant eklendi.

- Denatürasyon (94°C 2 dk), amplikasyon (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 dk) 35 döngü, sonlanma (72°C 10 dk).
- EtBr ilaveli %1'lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif)-içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü.
- İstenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre seçilip, plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a ekildi.

9. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanıldı.

Bu amaçla;

- 4 ml amfisilinli LB broth da üretilen kültürler, 10000–12000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonundan 250 µl eklendi ve pipetlenerek homojenize olması sağlandı.
- Üzerine 250 µl Cell Lysis Solution ilave edilip, alt üst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu karışıma eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 350 µl Neutralization Solution ilave edildi ve 12000-14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüjlendi.
- Süpernatanttan yaklaşık 650–750 µl alınarak, içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ve 12000-14000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- Daha sonra kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklenip, tekrar 1 dk 12000-14000 rpm'de santrifüjlendi.

- Kolonun üzerine 250 µl Wash Solution ilave edilip tekrar 2 dk süre ile 12000-14000 rpm'de santrifüjlendi ve alta geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Tekrar 1 dk süre ile 12-14000 rpm'de oda ısısında santrifüjlendi.
- Kolon yeni bir tüpün içerisine alındı. Üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi ve 1 dk süre ile 12000-14000 rpm'de santrifüjlendi.
- Kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler ölçüm yapılıncaya kadar –20°C'de saklandı.

10. Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsada, elde edilen sonuçları destekleek amacıyla örnekler *Eco*RI ile kesime tabi tutuldu ve agaroz jelde yürütüldü.

11. Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

1- 998 µl saf su + 2 µl plazmit konularak OD_{260} da ölçüldü.
2- $A_{260} \times 50$ (sabit) × 500 (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu 100 – 200 ng olacak şekilde ayarlandı.
3- 30–50 µl uygun konsantrasyona sahip seçilerek plazmitler sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

12. DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi

Firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları BioEdit ile analiz edildi ve fasta formatına çevirildi. Öncelikle primerler bulundu ve primerlerden önde kalan kısımlar vektöre ait DNA sekansını içeren bu bölgeler çıkarıldı. Ardından diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi.

13. Sonuçların değerlendirilmesi

Anlamlı hale getirilen sekans verilerilerinin blast çalışması http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch &LINK_LOC=blasthome ve http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify internet adresleri kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar baz alınarak, bilgileri gen bankasına girildi.

3.2.7. GTG_5-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Test izolatlarının genomik parmak izi analizleri, GTG_5-PCR yöntemi ile evrensel primer kullanılarak gerçekleştirildi. PCR işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen polimorfik bant sonuçları, ikili matriks sistemine çevrildi (bant varlığı durumunda '1' olmaması halinde ise '0'). Ardından veriler SPSS 13.0 programıyla analiz edilerek benzerlikleri belirlendi.

Reaksiyonun Hazırlanması

PCR yapılacak her bir örnek için; 5 µl 5X Gitschier Buffer, 2.5 µl DMSO, 1.25 µl BSA, 1.25 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10mM), 4 µl primer GTG_5 (GTG GTG GTG GTG GTG), 0.3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 14.2 µl ddH_2O ile 27 µl lik reaksiyon karışım hazırlanarak karışıma son olarak 3 µl kalıp DNA (70 ng/µl) eklendi ve son hacim 30 µl'ye tamamlandı (Adıgüzel 2006).

PCR Programı

Örnekler PCR cihazına (3x32-well ProFlex^{TM} PCR system) konarak; denatürasyon basamağında 95°C'de 7 dakika ve bunu takip eden denatürasyon için 94°C'de 1 dakika bağlanma basamağında 53°C'de 1 dakika ve uzama basamağında 65°C'de 8 dakika olmak üzere, bu üç basamak için toplam 35 tekrar olacak şekilde programlandı. Son

tekrardaki ise uzama basamağı 65°C'de 16 dakika olacak şekilde programlanarak, istenen DNA bölgeleri çoğaltıldı (Adıgüzel 2006).

GTG5-PCR Ürünlerinin Elektroforezi

1,5 gr agaroz üzerine 150 ml 0,5XTAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı ve 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jele 0,8 µg/ml olacak miktarda etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. Daha sonra 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 0,5XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi.

Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dk süre ile yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Erzurum'da bulunan kamu ve özel sektöre ait kombinalardan, hayvanların beslenme özellikleri de göz önüne alınarak ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış olmak üzere farklı zamanlarda rumen örnekleri alındı. Bu örneklerden *Achromobacter, Bacillus, Brevibacillus, Citrobacter, Clostridium, Enterococcus, Escherichia, Exiquobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Macrococcus, Neiseria, Ocrobactrum, Paenibacillus, Paleobacter Shigella, Staphylococcus, Streptococcus ve Streptomyces* cinslerine ait selülolitik karakterde olan bakteriler izole edilerek, bunların tür düzeyindeki teşhisleri yapıldı. Bu amaçla izolatların bazı fenotipik ve genotipik özelliklerinin tespiti için, farklı konvensiyonel ve moleküler testler uygulandı.

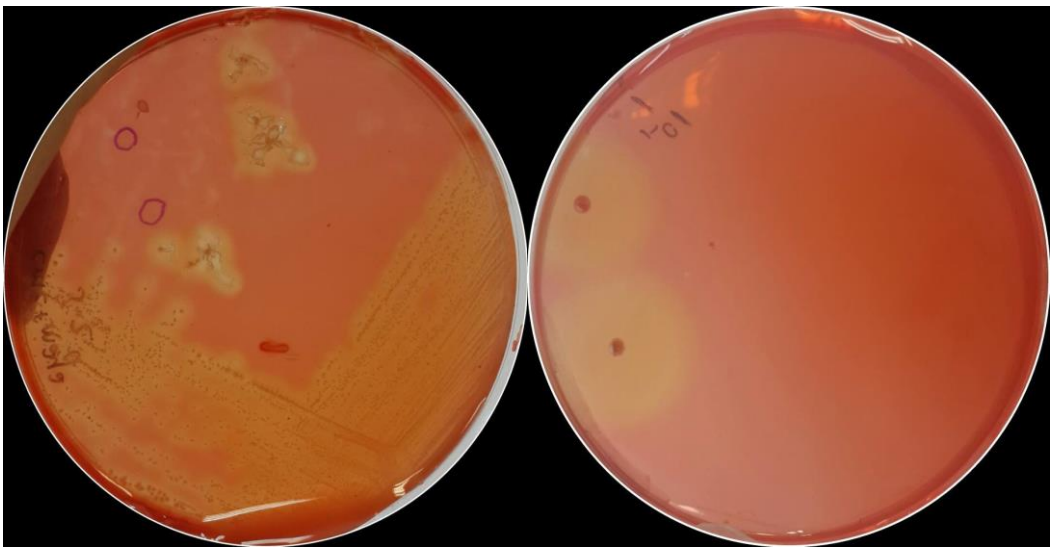
4.1. Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu

4 farklı mevsimde toplam 40 rumen örneğinden 150'nin üzerinde bakteri izole edildi. Bu suşlardan 5'i ilkbaharda, 7'si sonbaharda, 13'ü yazda ve 12'si ise kışta olmak üzere toplam 37 adet bakteriyal izolat seçilerek bu araştırmada kullanıldı (Çizelge 4.1).

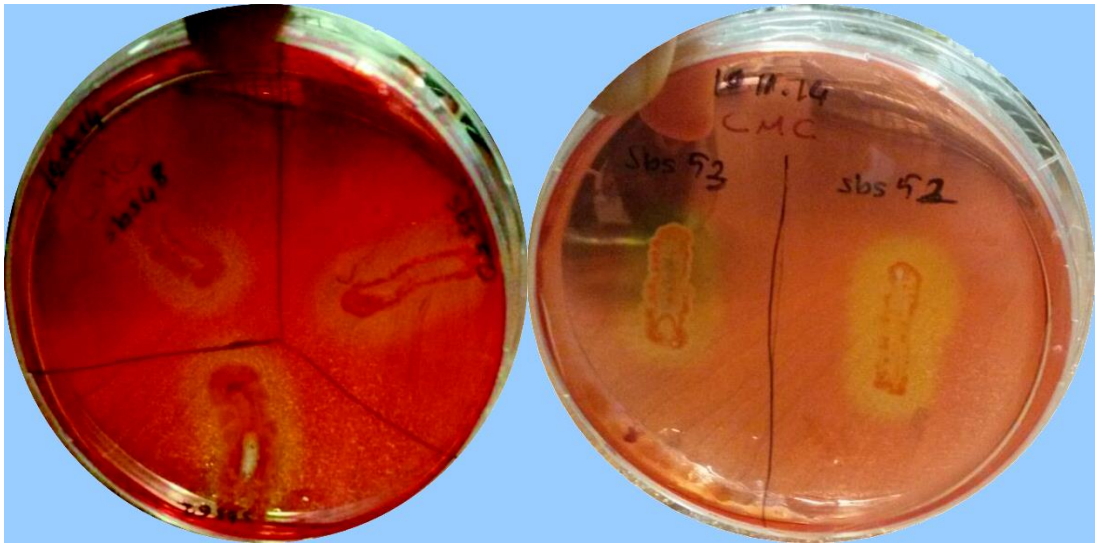
Çizelge 4.1. Selülolitik özellikteki suşlar ve bunların suşların izole edildiği mevsimler

Suşların İzole edildiği Mevsim	İzole Edilen Suşlar
Yaz	OZK13, OZK14, OZK15, OZK16, OZK17, OZK18, OZK19, OZK20, OZK21, OZK22, OZK 23, OZK24, OZK25
Kış	OZK1, OZK2, OZK3, OZK4, OZK5, OZK6, OZK7, OZK8, OZK9, OZK10, OZK11, OZK12
İlkbahar	OZK33, OZK34, OZK35, OZK36, OZK37
Sonbahar	OZK26, OZK27, OZK28, OZK29, OZK30, OZK31, OZK32

CMC-BHM seçici besiyerinde, karbon kaynağı olarak sadece selüloz bulunur. Dolayısıyla bu besiyerine ekimi yapılan numunelerdeki bakteriyal formlar, büyüyebilmeleri için tek karbon kaynağı olan selülozu parçalamaları gerekmektedir. Selülozu da parçalayabilmeleri için, mikroorganizmaların selülaz enzim aktivitesine sahip olmaları gerekir. Bu amaçla, bahsedilen besiyeri ortamı kullanılarak selülolitik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için bakteri suşları selektif besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriler inkübatörden çıkarılarak %1'lik kongo kırmızısıyla 20 dk muamele edilip, 1M NaCl ile 15 dk süre ile yıkandı. Bu işlem sonrasında açık sarı zon veren bakterilerin selülolitik aktiviteye sahip oldukları değerlendirilerek ve bu strainlerin saf kültürleri hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi. Şekil 4.1'de bazı izolatlara ait petri görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 4.1. OZK1 ve OZK24 şuslarına ait petri görüntüleri



Şekil 4.2. OZK26, OZK27, OZK30, OZK32, OZK33 suşlarına ait petri görüntüleri

4.2. İzolatların Tuz, pH ve Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi

4.2.1. Tuz toleransı

Saflaştırılan selülolitik suşların, değişen tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10, %12 ve %13) sahip sıvı besiyerlerine inokülasyonu sonucu elde edilen tuz tolerans sonuçları Çizelge 4.2'de verilmektedir.

Çizelge 4.2. İzolasyonu yapılan rumen bakterilerinin tuz toleransları

	%2	%4	%6	%8	%10	%12	%13
OZK1	+	+	-	-	-	-	-
OZK2	+	+	-	-	-	-	-
OZK3	+	+	-	-	-	-	-
OZK4	+	+	-	-	-	-	-
OZK5	+	+	+	-	-	-	-
OZK6	+	+	-	-	-	-	-
OZK7	+	+	-	-	-	-	-
OZK8	+	+	+	-	-	-	-
OZK9	+	+	+	-	-	-	-
OZK10	+	+	+	-	-	-	-
OZK11	+	-	-	-	-	-	-
OZK12	+	-	-	-	-	-	-
OZK13	+	+	-	-	-	-	-
OZK14	+	+	-	-	-	-	-
OZK15	+	+	+	-	-	-	-
OZK16	+	+	-	-	-	-	-
OZK17	+	+	-	-	-	-	-
OZK18	+	+	+	-	-	-	-
OZK19	+	+	+	-	-	-	-
OZK20	+	+	-	-	-	-	-
OZK21	+	+	+	+	+	-	-
OZK22	+	+	-	-	-	-	-
OZK23	+	-	-	-	-	-	-
OZK24	+	+	+	+	+	+	+
OZK25	+	+	-	-	-	-	-
OZK26	+	+	-	-	-	-	-
OZK27	+	+	-	-	-	-	-
OZK28	+	+	-	-	-	-	-
OZK29	+	+	+	-	-	-	-
OZK30	+	-	-	-	-	-	-
OZK31	+	+	-	-	-	-	-
OZK32	+	+	-	-	-	-	-
OZK33	+	+	+	-	-	-	-
OZK34	+	+	-	-	-	-	-
OZK35	+	+	-	-	-	-	-
OZK36	+	-	-	-	-	-	-
OZK37	+	+	+	+	-	-	-

4.2.2. Sıcaklık toleransı

İzole edilen suşlar, farklı sıcaklıklarda (5°C, 10°C, 15°C, 37°C, 45°C ve 55°C) inkübasyona bırakılarak üreyebildikleri sıcaklık aralıkları belirlendi. Yapılan bu analizler sonucunda izolatların tamamının üreyebildiği optimum sıcaklık değerinin 37°C olduğu, kardinal sıcaklık değerinin ise 10-55°C arasında değiştiği gözlemlendi.

Çizelge 4.3. İzole edilen selülolitik rumen bakterilerinin sıcaklık toleransları

	5°C	**10°C**	**15°C**	**37°C**	**45°C**	**55°C**
OZK1	-	-	+	+	-	-
OZK2	-	-	+	+	-	-
OZK3	-	-	+	+	-	-
OZK4	-	-	+	+	-	-
OZK5	-	-	+	+	-	-
OZK6	-	-	+	+	-	-
OZK7	-	-	+	+	-	-
OZK8	-	+	+	+	+	-
OZK9	-	+	+	+	+	-
OZK10	-	+	+	+	+	-
OZK11	-	+	+	+	-	-
OZK12	-	+	+	+	-	-
OZK13	-	-	-	+	-	-
OZK14	-	-	-	+	+	-
OZK15	-	+	+	+	-	-
OZK16	-	+	+	+	-	-
OZK17	-	+	+	+	-	-
OZK18	-	+	+	+	-	-
OZK19	-	+	+	+	-	-
OZK20	-	-	-	+	+	-
OZK21	-	-	-	+	+	-
OZK22	-	-	-	+	-	-
OZK23	-	-	+	+	+	-
OZK24	-	+	+	+	+	+
OZK25	-	-	+	+	-	-
OZK26	-	-	+	+	-	-
OZK27	-	+	+	+	-	-
OZK28	-	+	+	+	-	-
OZK29	-	-	+	+	-	-
OZK30	-	-	+	+	-	-
OZK31	-	-	+	+	-	-
OZK32	-	-	+	+	-	-
OZK33	-	-	+	+	-	-
OZK34	-	-	+	+	-	-
OZK35	-	-	+	+	-	-
OZK36	-	-	+	+	+	-
OZK37	-	-	+	+	+	-

4.2.3. pH toleranslarının belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen bakteriler, çeşitli pH değerlerine (pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9, pH:11 ve pH:13) sahip besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerin gelişebildikleri optimum, maksimum ve minimum pH değerlerinin tespiti OD_{600} nm'de gerçekleştirildi. Yapılan bu analiz

sonucunda, OZK24 ve OZK32 kodlu bakterilerin gelişebildikleri maksimum pH değerinin, diğerlerinden farklı olarak 11 olduğu tespit edildi. Ayrıca tüm suşların pH 5-9 aralığında üreyebildikleri ve optimum pH değerinin ise 7 olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.4. İzole edilen rumen bakterilerinin pH toleranslarının belirlenmesi

	pH: 3	**pH: 5**	**pH: 7**	**pH:9**	**pH:11**	**pH:13**
OZK1	-	-	+	+	-	-
OZK2	-	-	+	+	-	-
OZK3	-	-	+	+	-	-
OZK4	-	-	+	+	-	-
OZK5	-	-	+	+	-	-
OZK6	-	-	+	+	-	-
OZK7	-	+	+	+	-	-
OZK8	-	+	+	+	-	-
OZK9	-	+	+	+	-	-
OZK10	-	+	+	+	-	-
OZK11	-	-	+	-	-	-
OZK12	-	-	+	-	-	-
OZK13	-	+	+	+	-	-
OZK14	-	+	+	+	-	-
OZK15	-	+	+	+	-	-
OZK16	-	+	+	-	-	-
OZK17	-	+	+	-	-	-
OZK18	-	+	+	+	-	-
OZK19	-	+	+	+	-	-
OZK20	-	+	+	+	-	-
OZK21	-	+	+	+	-	-
OZK22	-	+	+	+	-	-
OZK23	-	+	+	+	-	-
OZK24	-	+	+	+	+	-
OZK25	-	+	+	+	-	-
OZK26	-	+	+	+	-	-
OZK27	-	+	+	+	-	-
OZK28	-	+	+	+	-	-
OZK29	-	+	+	+	-	-
OZK30	-	+	+	+	-	-
OZK31	-	+	+	+	-	-
OZK32	-	-	+	+	+	-
OZK33	-	+	+	+	-	-
OZK34	-	+	+	+	-	-
OZK35	-	+	+	+	-	-
OZK36	-	+	+	+	-	-
OZK37	-	+	+	+	-	-

4.3. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

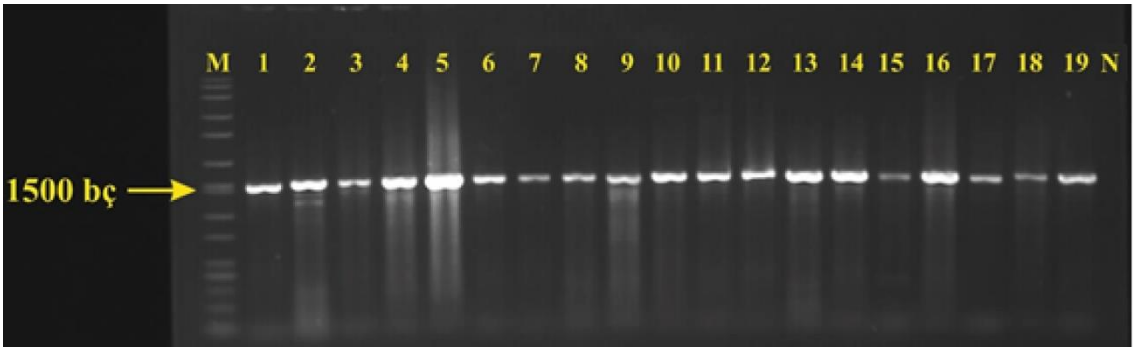
Elde edilen izolatların morfolojik, fizyololojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi testler gerçekleştirildi. Bu analizler sonucunda; hücre morfolojisi, endospor, gram, oksidaz, katalaz, nitrat ve hareketlilik testleri bakımından farklı sonuçlar veren izolatların varlığı tespit edildi.

Çizelge 4.5. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

	Endospor	**Gram**	**Oksidaz**	**Katalaz**	**Nitrat**	**Hareketlilik**	**Oksijen ihtiyacı**	**Morfoloji**
OZK1	-	-	-	+	+	+	Fakültatif	Basil
OZK2	-	-	-	+	+	+	Fakültatif	Basil
OZK3	-	-	-	+	+	+	Fakültatif	Basil
OZK4	-	-	-	+	+	-	Fakültatif	Basil
OZK5	+	+	+	+	-	-	Aerop	Basil
OZK6	-	-	-	+	+	+	Fakültatif	Basil
OZK7	-	-	+	+	-	+	Aerop	Kok
OZK8	-	+	+	+	-	-	Fakültatif	Kok
OZK9	+	+	-	+	+	+	Aerop	Kok
OZK10	-	+	+	+	+	+	Fakültatif	Basil
OZK11	-	-	-	+	+	+	Aerop	Basil
OZK12	-	-	-	+	+	+	Aerop	Basil
OZK13	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK14	-	+	-	+	+	-	Fakültatif	Kok
OZK15	-	+	-	-	+	-	Fakültatif	Kok
OZK16	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK17	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Basil
OZK18	-	+	+	+	+	+	Fakültatif	Kok
OZK19	-	+	-	-	-	+	Fakültatif	Kok
OZK20	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK21	-	+	+	+	-	-	Anaerop	Kok
OZK22	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK23	-	+	-	+	-	-	Anaerop	Çubuk
OZK24	-	+	+	+	-	+	Aerop	Çubuk
OZK25	-	+	-	+	+	-	Fakültatif	Kok
OZK26	-	-	-	+	-	+	Fakültatif	Çubuk
OZK27	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK28	-	-	+	+	-	-	Aerop	Çubuk
OZK29	-	+	-	-	-	+	Fakültatif	Kok
OZK30	+	-	+	-	-	-	Anaerop	Kok
OZK31	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK32	-	-	+	+	+	-	Fakültatif	Çubuk
OZK33	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK34	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK35	-	+	-	-	-	-	Fakültatif	Kok
OZK36	+	+	-	+	-	+	Fakültatif	Çubuk
OZK37	+	-	+	-	-	-	Aerop	Çubuk

4.4. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

16S rRNA gen bölgesine spesifik üniversal primerler kullanılarak, ilgili alan çoğaltıldı (Şekil 4.3.).

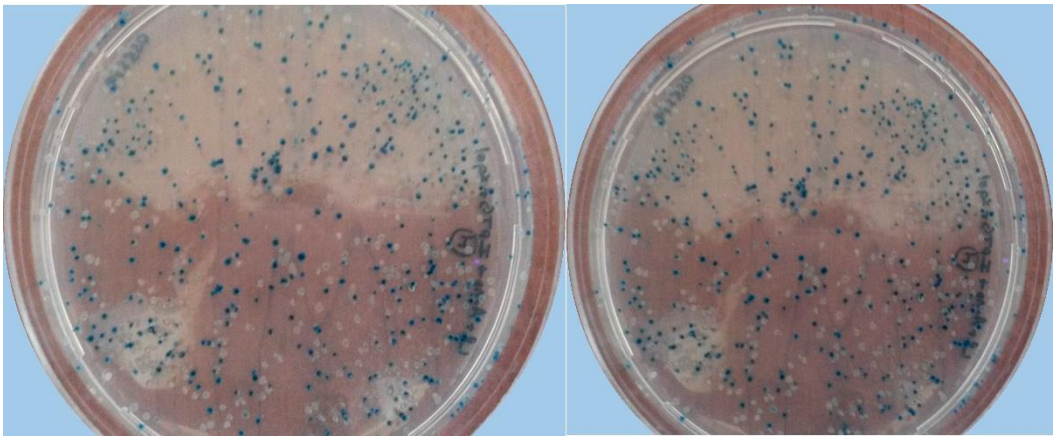


Şekil 4.3. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü

Toplanan rumen örneklerinden selülolitik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, DNA'ları ekstrakte edildi ve evrensel primer seti (27F-1492R) kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Sonuçta tüm izolatların 1500 bç büyüklüğünde tek bir bant içerdiği tespit edildi.

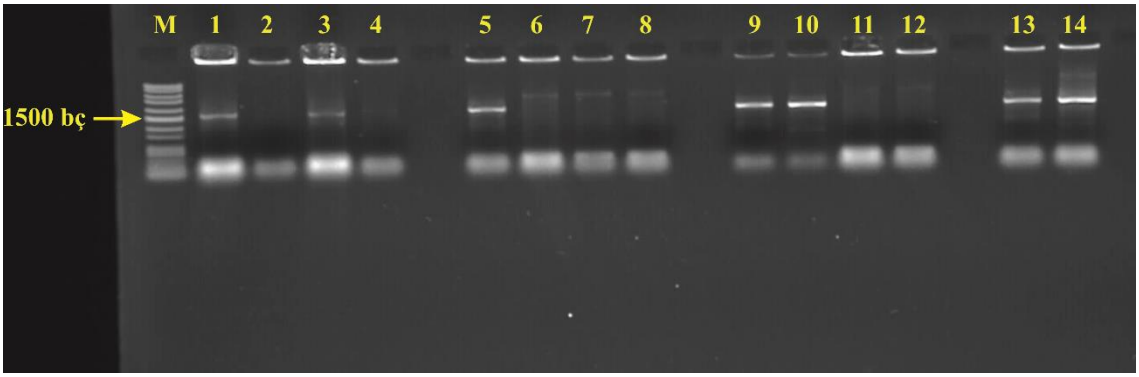
4.5. Amplifiye Edilen 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması

Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid dizisinin analizinin büyük oranda belirlenebilmesi için klonlama çalışması oldukça önemli olup, bu amaçla, ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Ardından bakteriler, amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayılıp, inkübasyona bırakıldı ve sonuçta, mavi, beyaz kolonilerin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Mavi-beyaz tarama

Beyaz koloniler, genimizin insert olduğunu düşündüğümüz koloniler olup, her beyaz koloni kesinlikle pozitif değerlendirilmediğinden bunun kontrolü için koloni PCR yapıldı. 1500 bç'lik DNA markır hizasında bant veren koloniler seçilip (Şekil 4.5), plazmit izolasyonu için antibiyotikli besiyerine aktarıldı. Pozitif sonuç veren izolatların plazmitleri izole edilip, sekansa gönderildi (Macrogen, Hollanda).



Şekil 4.5. Bazı izolatların koloni-PCR sonuçları

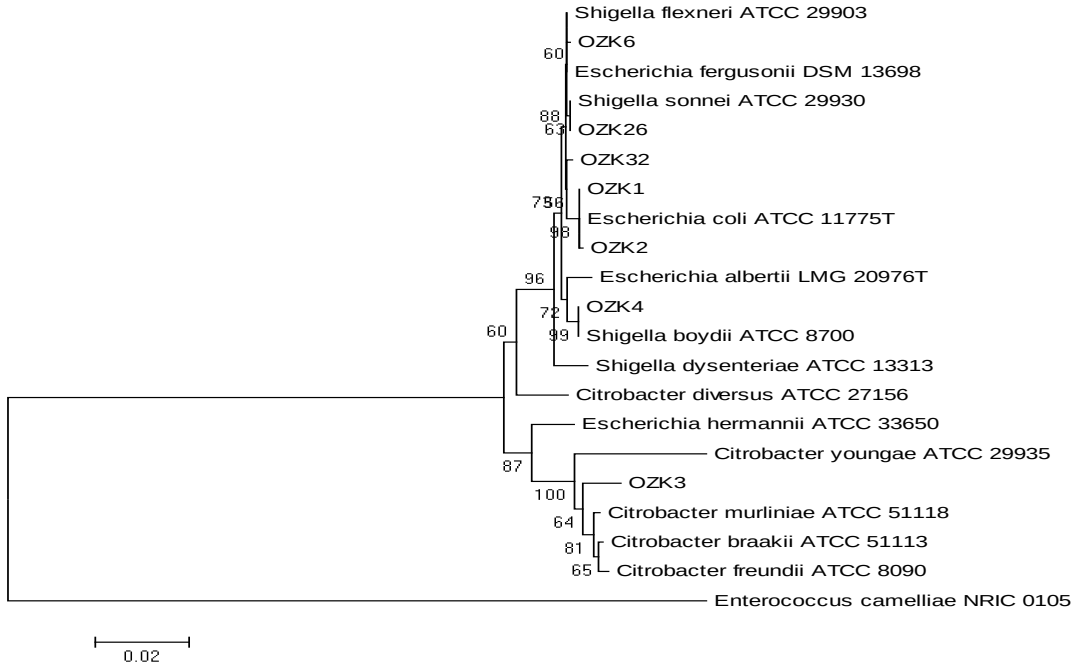
4.6. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizilerine Göre Benzerlik Oranları

Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA dizisinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımıdır. Bu amaçla ilk olarak, rumen örneklerinden izole edilen 37 adet selülolitik izolatın 16S rRNA

genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank'ta var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Analizler sonucunda, OZK1, OZK2 ve OZK6 suşlarının *Escherichia coli'*ye, OZK26'nın, *Escherichia fergusoni'*ye, OZK4 ve OZK32'nın *Shigella boydii'*ye, OZK3'nın *Citrobacter youngae'*ye, OZK15, OZK19 ve OZK29'nın *Enterococcus devriesei'ye,* OZK33'ün *Enterococcus casseliflavus*'a OZK16'nın *Lactococcus lactis*'e OZK17'nin *Lactobacillus zeae'*ye, OZK14'ün *Staphylococcus caprae'*ye, OZK25'in *Staphylococcus haemolyticus'*a, OZK24'ün *Exiguobacterium mexicanum'*a, OZK28'in *Ochrobactrum intermedium'*a, OZK8 ve OZK10' un *Streptomyces violaceochromogenes'*e, OZK18'in *Streptomyces ambofaciens'*e, OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK34 ve OZK35'in *Streptococcus infantarius'*a, OZK31'in *Streptococcus henryi* e, OZK7'in *Neisseria macacae'*e, OZK37'in *Achromobacter mucicolens*'e, OZK21'in *Macrococcus caseolyticus'*a, OZK5'in *Bacillus oceanisediminis'*e, *O*ZK9'un *Bacillus licheniformis'*e, OZK11 ve OZK12'nin *Brevibacillus agri*'ye, OZK36 suşunun ise *Paenibacillus validus'*a benzerlik gösterdiği tespit edildi.türler oldukları belirlendi. Elde ettiğimiz bu verilerin doğruluğu EzTaxon programı kullanılarak, teyit edildi. Çizelge 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11'da her cins için ayrı olarak bu sonuçlar gösterilmiştir. Ayrıca, bu izolatların bulundukları taksonomik pozisyonlar dikkate alınarak, gen bankasında yer alan yakın türlerle aralarındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla 16S rRNA genlerine ait baz dizinleri MEGA 4 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve neighbour-joining programıyla 16S rRNA genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaçlar çizildi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14). Bu 16 cinse ait 37 izolatın 16S rRNA gen dizileri Ekler bölümünde verilmektedir.

Çizelge 4.6. OZK1, OZK2, OZK3, OZK4, OZK6, OZK26 ve OZK32 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK1	OZK2	OZK6	OZK26	OZK4	OZK32	OZK3
Escherichia coli	**99,5**	**99,2**	**99,2**	99,4			
Escherichia fergusonii	98,8	98,4	99,2	99,0			
Escherichia albertii	98,6	98		98,4			
Escherichia hermannii	97,6	97,1		97,9			
Shigella boydii				98,4	**99,2**	99,2	
Shigella sonnei				**99,8**	99,1	99,7	
Shigella flexneri					99,1	**99,8**	
Shigella dysenteriae					98,2	98,9	
Citrobacter youngae							**99,6**
Citrobacter freundii							98,8
Citrobacter murliniae							98,7

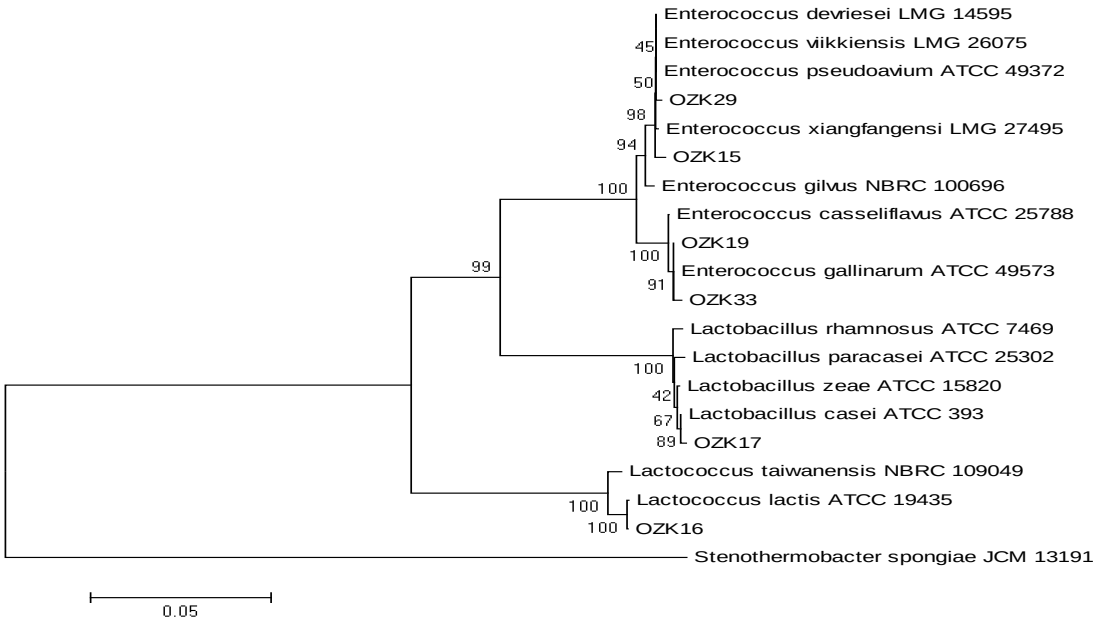


Şekil 4.6. OZK1, OZK2, OZK3, OZK4, OZK6, OZK26 ve OZK32 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi.

Çizelge 4.7. OZK15, OZK16, OZK17, OZK19, OZK29 ve OZK33 izolatlarının, EzTaxon'da kayıtlı tip türlerin 16S Rrna gen dizilerine olan benzerlik oranları

	OZK15	OZK19	OZK29	OZK33	OZK16	OZK17
Enterococcus devriesei	**99,7**	98,5	**99,9**	98,3		
Enterococcus viikkiensis	99,7	98,5	99,9	98,3		
Enterococcus pseudoavium	99,7	98,4	99,9	98,2		
Enterococcus xiangfangensis	99,6	98,4	99,8	98,2		
Enterococcus malodoratus	99,2	98,5	99,4	98,3		
Enterococcus gilvus	99,2	98,5	99,4	98,3		
Enterococcus casseliflavus		99,8	98,6	**99,6**		
Enterococcus gallinarum		**99,6**	98,6	99,4		
Lactococcus lactis					**99,9**	
Lactococcus taiwanensis					98,4	
Lactobacillus zeae						**99,7**
Lactobacillus paracasei						99,1
Lactobacillus casei						99,0
Lactobacillus rhamnosus						98,8

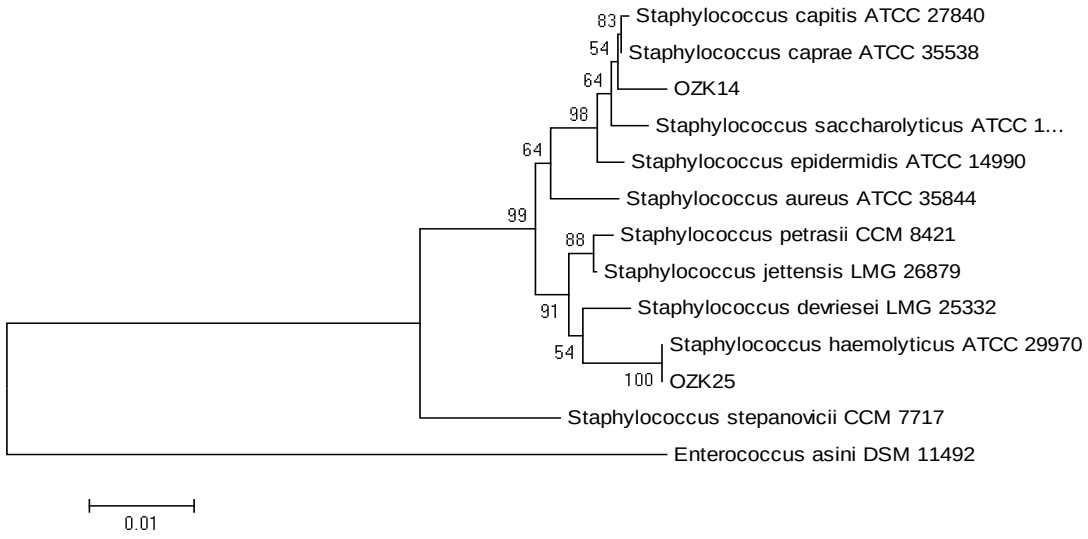


Şekil 4.7. OZK15, OZK16, OZK17, OZK19, OZK29 ve OZK33 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S Rrna gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi.

Çizelge 4.8. OZK14 ve OZK25 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK14	OZK25
Staphylococcus caprae	**99,4**	
Staphylococcus capitis	99,4	
Staphylococcus saccharolyticus	99,0	
Staphylococcus epidermidis	99,0	
Staphylococcus aureus	98,5	
Staphylococcus haemolyticus		**99,6**
Staphylococcus devriesei		99,4
Staphylococcus petrasii		99,3
Staphylococcus jettensis		99,3

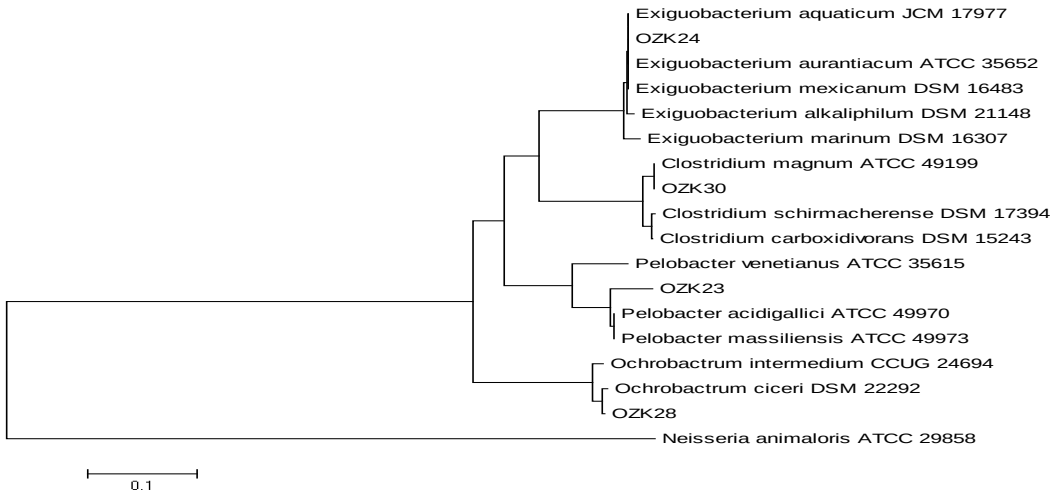


Şekil 4.8. OZK14 ve OZK25 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi.

Çizelge 4.9. OZK23, OZK24, OZK28 ve OZK30 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK23	OZK24	OZK28	OZK30
Pelobacter carbinolicus	**88,8**			
Pelobacter massiliensis	88,6			
Pelobacter acidigallici	82,4			
Pelobacter venetianus	82,3			
Exiguobacterium mexicanum		**99,8**		
Exiguobacterium aquaticum		99,6		
Exiguobacterium aurantiacum		99,4		
Exiguobacterium alkaliphilum		99,2		
Exiguobacterium marinum		98,4		
Ochrobactrum intermedium			**99,7**	
Ochrobactrum ciceri			99,1	
Clostridium magnum				**97,1**
Clostridium carboxidivorans				96,3
Clostridium scatologenes				96,1

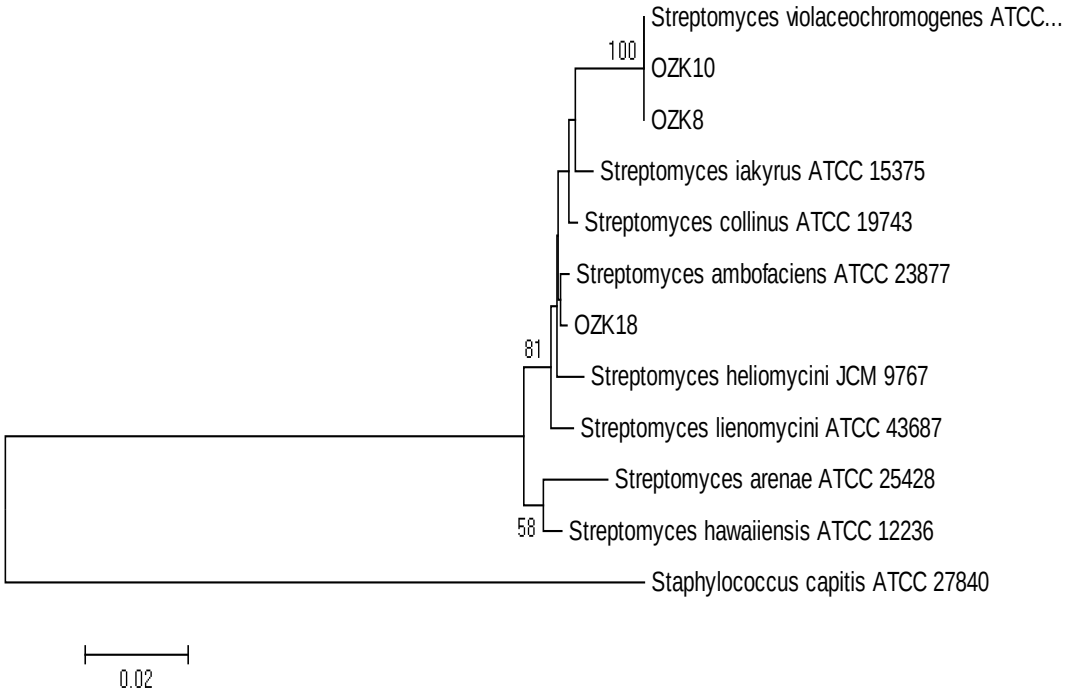


Şekil 4.9. OZK23, OZK24, OZK28 ve OZK30 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi

Çizelge 4.10. OZK8, OZK10 ve OZK18 izolatlarının, EzTaxon'da kayıtlı tip türlerin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerlik oranları

	OZK8	OZK10	OZK18
Streptomyces violaceochromogenes	**99,1**	**98,9**	
Streptomyces iakyrus	99,0	98,9	
Streptomyces arenae	98,6	98,4	
Streptomyces hawaiiensis	98,6	98,4	
Streptomyces collinus		98,4	
Streptomyces ambofaciens			**99,7**
Streptomyces lienomycini			99,4
Streptomyces heliomycini			99,3

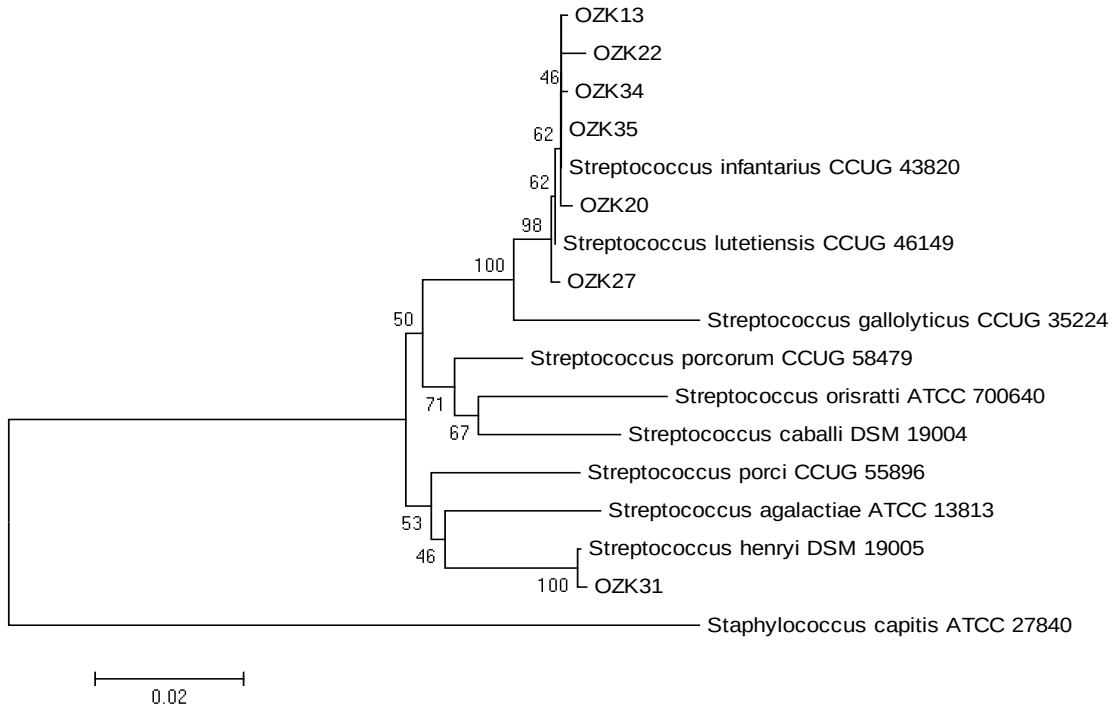


Şekil 4.10. OZK8, OZK10 ve OZK18 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi

Çizelge 4.11. OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK31, OZK34 ve OZK35 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK13	OZK20	OZK22	OZK27	OZK34	OZK35	OZK31
Streptococcus infantarius	**99,8**	**99,8**	**99,8**	**99,7**	**99,7**	**99,7**	
Streptococcus lutetiensis	99,8	99,8	99,8	99,6	99,7	99,7	
Streptococcus gallolyticus	98,8	98,8	98,7	98,6	96,9	98,5	
Streptococcus porcorum	97,2	97,2	97,2	97,1	97,1	97,1	
Streptococcus henryi							**99,8**
Streptococcus porci							95,8
Streptococcus orisratti							95,7
Streptococcus caballi							95,7
Streptococcus agalactiae							95,6

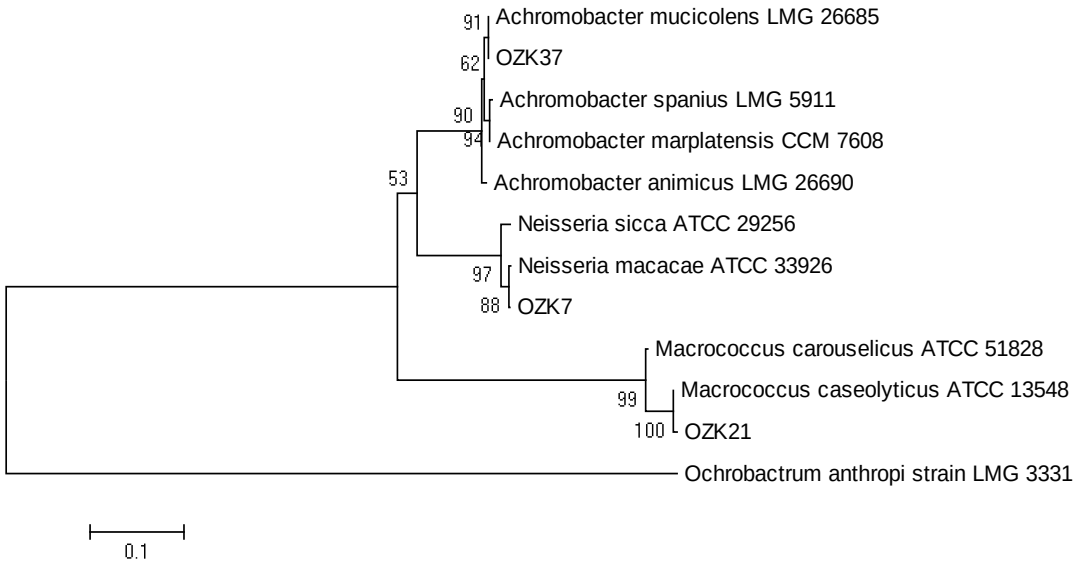


Şekil 4.11. OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK31, OZK34 ve OZK35 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi

Çizelge 4.12. OZK7, OZK21 ve OZK37 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK7	OZK37	OZK21
Neisseria macacae	**98,9**		
Neisseria flava	98,8		
Neisseria sicca	98,8		
Achromobacter mucicolens		**99,9**	
Achromobacter animicus		99,5	
Achromobacter spanius		99,4	
Achromobacter marplatensis		99,4	
Macrococcus caseolyticus			**98,4**
Macrococcus caseolyticus			98,3
Macrococcus carouselicus			96,9

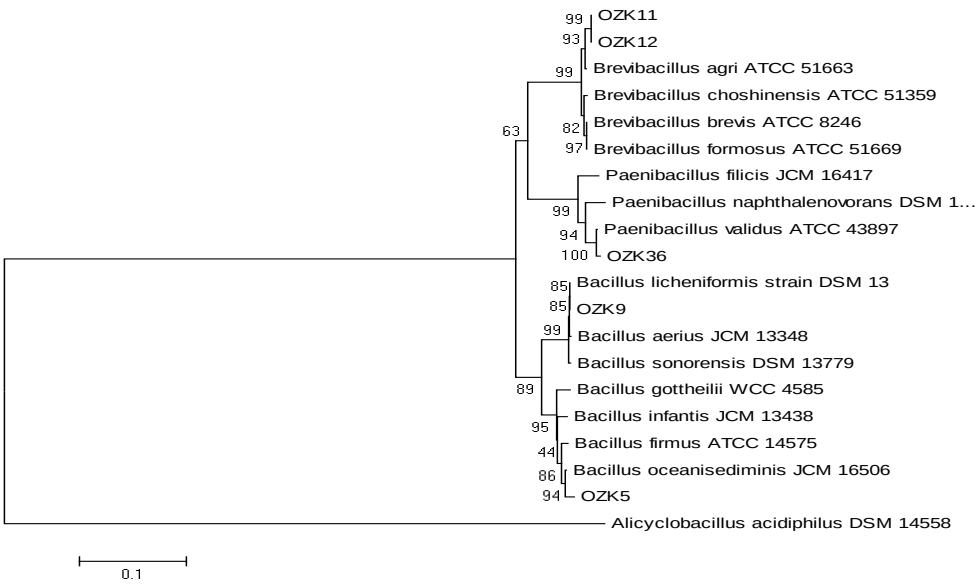


Şekil 4.12. OZK7, OZK21 ve OZK37 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi.

Çizelge 4.13. OZK5, OZK9, OZK11, OZK12 ve OZK36 test izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin, EzTaxon'daki tip türlere olan benzerlik oranları

	OZK5	OZK9	OZK11	OZK12	OZK36
Bacillus oceanisediminis	**98,8**				
Bacillus firmus	98,2				
Bacillus infantis	97,3				
Bacillus gottheilii	97				
Bacillus licheniformis		**98,9**			
Bacillus aerius		98,8			
Bacillus sonorensis		98,7			
Brevibacillus agri			**98,7**	**98,7**	
Brevibacillus brevis			98,3	98,2	
Brevibacillus choshinensis			98,2	98,1	
Brevibacillus formosus			98,2	98,2	
Paenibacillus validus					**99,7**
Paenibacillus naphthalenovorans					96,7
Paenibacillus filicis					96,6

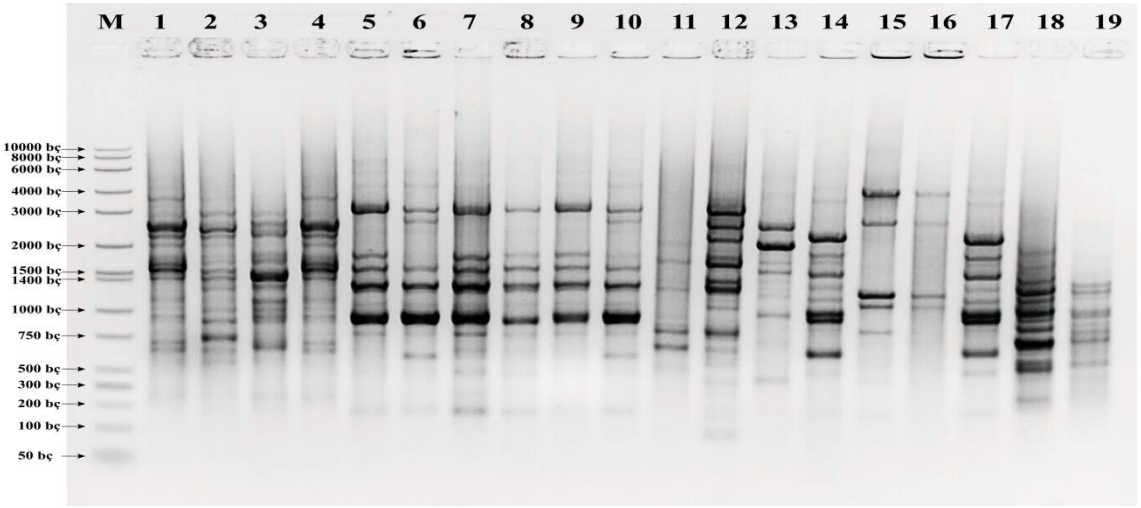


Şekil 4.13. OZK5, OZK9, OZK11, OZK12 ve OZK36 test izolatları ve tip türlerine ait 1508 nt (nükleotid)'lik 16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

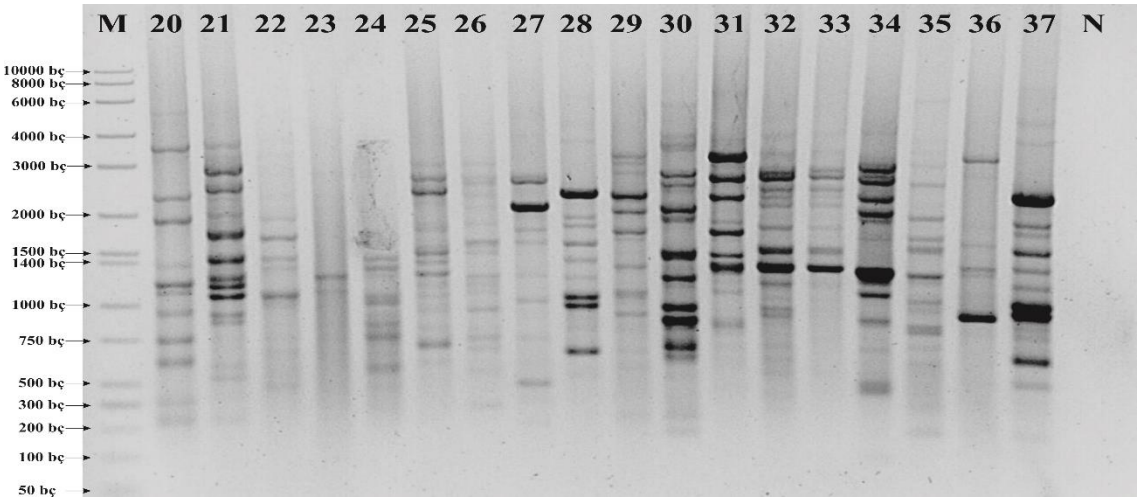
*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi

4.7. GTG_5-PCR Amplifikasyon Sonuçları

Test edilen izolatlara ait GTG_5-PCR amplifikasyon sonuçları aşağıda özetlenmiştir. Buna göre; **OZK1, OZK2** ve **OZK6** kodlu izolatlar 600 ile 3800 bç arasında 12 bant; **OZK13**, **OZK20, OZK22, OZK27, OZK34** ve **OZK35** kodlu izolatlar 200 ile 4000 bç arasında 8 bant; **OZK31** kodlu izolat 400 ile 2500 bç arasında 5 bant; **OZK25** ve **OZK15** kodlu izolatlar 500-3000 bç arasında 8 bant; **OZK19** ve **OZK29** kodlu izolatlar 750 ile 4000 bç arasında 5 bant; **OZK33** kodlu izolat 700 ile 4000 bç arasında 9 bant**;** **OZK3** kodlu izolat 100 ile 3500 bç arasında 11 bant; **OZK23** kodlu izolat 200 ile 2000 bç arasında 12 bant; **OZK16** kodlu izolat 200 ile 3500 bç arasında 11 bant; **OZK17** kodlu izolat 200 ile 3000 bç arasında 12 bant; **OZK8** kodlu izolat 1000 ile 2500 bç arasında 6 bant**; OZK 10** kodlu izolat 1000 ile 1400 bç arasında 2 bant vermiştir. **OZK18** kodlu izolat 600 ile 1500 bç arasında 8 bant, **OZK4, OZK32** ve **OZK24** kodlu izolatlar 500 ile 3000 bç arasında 7 bant, **OZK37** kodlu izolat 600 ile 4000 bç arasında 12 bant; **OZK21,** kodlu izolat 500 ile 3000 bç arasında 10 bant; **OZK5** ve **OZK9** kodlu izolatlar 750 ile 4000 bç arasında 12 bant; **OZK30** kodlu izolat 200 ile 3500 bç arasında 13 bant, (**Şekil 4.14** ve **Şekil 4.15).**



Şekil 4.14. Bakteri izolatlarının GTG_5- PCR elektroforez sonuçları
*Yüklenen jel sırası; M) Markır, 1) OZK1, 2) OZK2, 3) OZK6, 4) OZK26, 5) OZK13, 6) OZK20, 7) OZK22, 8) OZK27, 9) OZK34, 10) OZK35, 11) OZK31, 12) OZK14, 13) OZK25, 14) OZK15, 15) OZK19, 16) OZK29, 17) OZK33, 18) OZK3, 19) OZK23.



Şekil 4.15. Bakteri izolatlarının GTG_5- PCR elektroforez sonuçları
*Yüklenen jel sırası; M) Markır, 20) OZK16, 21) OZK17, 22) OZK8, 23) OZK10, 24) OZK18, 25) OZK4, 26) OZK32, 27) OZK24, 28) OZK28, 29) OZK7, 30) OZK37, 31) OZK21, 32) OZK5, 33) OZK9, 34) OZK11, 35) OZK12, 36) OZK36, 37) OZK30, N) Negatif kontrol.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada en fazla bulunan yenilenebilir enerji kaynağı, selülozik materyaller olmasına karşın, bu biyomateryalin polisakkarit formda iken kullanılmadığından mutlaka hidroliz edilmesi gerekmektedir. (Li *et al*. 2009) Bu hidrolizin en iyi gerçekleşe bildiği yer ise rumen ortamıdır. Rumen ekosistemi, bakteri, protozoa ve fungusları içeren çok sayıda mikroorganizma içerir. Bu canlılar, bitki hücre duvarının ana bileşeni olan selüloluzu yıkabilen, enzim ve enzim sistemlerine sahiptirler (Ekinci and Flint 2001).

Selülozun sindirilmesinde ticari olarak genellikle funguslar kullanılsa da bu işlem için selülolitik bakteriler daha uygundur, çünkü onlar funguslara göre daha kısa sürede üreyebiliyor ve besin gereksinimleri de onlara göre daha azdır (Maki *et al*. 2009).

Bu bilgiler ışığında, yapılan bu tez çalışmasında, farklı zaman aralıklarında toplanan rumen örneklerinden selülolitik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Sonuçta elde edilen 150'nin üzerindeki mikroorganizmadan, toplam 37'sinin selülozu sindirebilme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Saf kültürler halinde stoklanan bu 37 izolat, çeşitli konvensiyonel ve moleküler testlere tabi tutularak identifiye edildi.

İzolatların fizyolojik özelliklerinden sıcaklık, oksijen ve pH istekleri belirlendi. 5°C'den başlayarak 55°C'ye kadar devam eden sıcaklıklar kullanıldı. Örneklerin tamamında 5°C'de üremenin olmadığı, OZK8, OZK9, OZK10, OZK11, OZK12, OZK15, OZK16, OZK17, OZK18, OZK19, OZK24, OZK27 ve OZK28 kodlu izolatların ise 10°C'de gelişebildiği gözlemlendi. Ayrıca 55°C üreyebilen tek şuşun OZK24 olduğu belirlendi. Lo´pez-Corte´s *et al*. (2006), *Exiguobacterium mexicanum* izolatının 20-41°C'de gelişirken 45°C'de üreyemediğini belirtmiştir. Biz ise yaptığımız bu çalışma sonucunda, bu türe benzerlik gösteren OZK24 suşunun 10-55°C'de gelişebildiğini tespit ettik. Bu da bu organizmann kardinal sıcaklık değerinin benzediği organizmaya göre daha geniş ve biyoteknolojik proseslerde kullanılanılabilme potansiyelinin daha yüksek olduğunu gösterdi.

İzolatların gelişebildiği pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan pH tolerans testleri (pH:3-12) sonucunda; organizmaların tamamının üreyebildikleri pH değerinin 5-9, optimum büyüme pH'larının ise pH:7 olduğu belirlendi. Ayrıca yapılan bu pH testleri sonucunda, sadece OZK24 (*Exiguobacterium mexicanum*) suşunun pH:11'de gelişebildiği gözlemlendi. Lo´pez-Corte´s *et al*. (2006), bizim çalışmamıza paralel olarak *Exiguobacterium mexicanum*' un pH: 10 gibi alkali ortamda yaşayabildiğini tespit ettiler. Colins *et al*. (1983)'ın bilim literatürüne kattığı *Exiguobacterium* cinsinin üyelerinin alkalofilik ve %10 NaCl içeren ortamlarda yaşayabildiğini belirlediler. Çalışmamızda, aynı cinsin bir üyesi olduğunu belirlediğimiz OZK24 suşunun literatür verileriyle paralel bir şekilde alkali ve yüksek tuz (%13) konsantrasyonuna sahip besiyerinde üreyebildiğini tespit ettik. Madern *et al*. (2000) yaptıkları bir araştırmada, hem halofilik hem de halofilik özellik taşımayan mikroorganizmalara ait aynı proteinin ekspresyon ve saflaştırma işlemini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta halofilik bakteriye ait proteini, halofilik olmayan mikroorganizmaya göre daha yüksek konsantrasyon değerlerinde elde etmişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışması sonucunda karakterizasyon işlemini tamamladığımız OZK24 şusunun, yüksek tuz konsantrasyon değerlerinde ürediğini gözlemledik. Literatür verisi (Madern *et al.* 2000) dikkate alındığında bu bakteriden saflaştırılacak endüstriyel açıdan önemli olan enzim veya enzimlerin, yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilme potansiyellerinin fazla olacağı düşüncesindeyiz. Buraya kadar yapılan tüm konvensiyonel test sonuçlarına göre, izolatların sahip olduğu fenotipik özellikler, literatür verileriyle uygunluk göstermektedir (Wieser and Busse 2000; Brettar *et al*. 2002; Frühling *et al*. 2002; Rodrigues *et al*. 2006; Louboudy *et al*. 2007; Cai *et al*. 2008; Chamkha *et al*. 2011; Görmez 2011).

Son yıllarda sistematik çalışma gerçekleştiren bilim insanları, bakterilerin familya, cins ve tür düzeyinde tanılanması için, 16S rRNA'yı da içeren makromolekül bölgelerinin analizinden yaygın bir şekilde faydalanmaktadırlar (Acar 2009; Adiguzel *et al.* 2009; 2011; Adiguzel *et al.* 2012) . Bunun nedeni, 16S rRNA bölgesinin evrimsel süreçte mutasyona kapalı ve korunmuş olmasıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda aynı cinse ait türlerin 16S rRNA genlerinin dizin analizleri arasındaki benzerliğin %97'den az, aynı türe ait suşların ise bu oranın %97'den daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca,

aralarında 16S rRNA gen dizisi açısından %95 benzerlik gösteren bakterilerin ise aynı cinse ait türler olduğu , %97'den fazla benzerlik gösteren organizmalar arasında mutlaka hibridizasyon çalışması yapılması gerektiği ifade edilmiştir. (Madigan and Martinko 2010). Meier-Kolthoff *et al.* (2013) %98,5' in altında benzerlik oranına sahip şuslar arasında DNA:DNA hibridizasyon analazine gerek olmadığı ve ilgili izolatların yeni tür olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, izolatların tanı ve karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen konvensiyonel testlerin, identifikasyonda tek başına yeterli olmamasından dolayı (Adıgüzel 2006), bu testlere ek olarak moleküler yöntemler kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak 16S rRNA dizi analiz yöntemi uygulandı. İzolatların 16S rRNA bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılıp, uygun bir klonlama protokolü (Adıgüzel *et al.* 2011) kullanılarak klonlandı ve sekans analizleri yaptırıldı. Analiz sonucunda; OZK1, OZK2 ve OZK6 suşları *Escherichia coli'*ye, OZK26 suşu, *Escherichia fergusoni'*ye, OZK4 ve OZK32 suşlar *Shigella boydii'*ye, OZK3 suşu *Citrobacter youngae'*ye, OZK15, OZK19, ve OZK29 suşları *Enterococcus devriesei'ye,* OZK33 *suşu Enterococcus casseliflavus'*a OZK16 suşu *Lactococcus lactis*'e OZK17 suşu *Lactobacillus zeae'*ye, OZK14 suşu *Staphylococcus caprae'*ye, OZK25 suşu *Staphylococcus haemolyticus'*a, OZK24 suşu *Exiguobacterium mexicanum'*a, OZK28 suşu *Ochrobactrum intermedium'*a, OZK8 ve OZK10 suşları *Streptomyces violaceochromogenes'*e, OZK18 suşu *Streptomyces ambofaciens'*e, OZK13, OZK20, OZK22, OZK27, OZK34 ve OZK35 suşları *Streptococcus infantarius'*a, OZK31 suşu *Streptococcus henryi'*e, OZK7 suşu *Neisseria macacae'*e, OZK37 suşu *Achromobacter mucicolens*'e, OZK21 *suşu Macrococcus caseolyticus'*a, OZK5 suşu *Bacillus oceanisediminis'*e, OZK9 *suşu Bacillus licheniformis'*e, OZK11 ve OZK12 suşları *Brevibacillus agri*'ye, OZK36 *suşu ise Paenibacillus validus'*a ait izolatlar oldukları ortaya çıkarıldı.

Öte yandan %88 oranında *Pelobacter carbinolicus*'*a* benzerlik gösteren OZK23 izolatının ise, bu türe hatta cinse ait bir mikroorganizma olmadığı ve yeni bir cins olarak taksonomiye kazandırılması gerektiği düşünülmektedir. Çünkü aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin baz dizileri arasındaki benzerliğin %95-97 arasında

olduğu, farklı cinse ait olan organizmalar arasındaki benzerliğin ise %95'den daha az olduğu bilinmektedir. (Sezgin 2007; Madigan and Martinko 2010). Buna ek olarak, Meier-Kolthoff *et al.* (2013) %98,5'in altında benzerlik oranına sahip şusların DNA:DNA hibridizasyonu yapılmaksızın yeni tür olabileceğini bilgisinden yola çıkarak, OZK30 ve OZK21 izolatlarının sırasıyla göstermiş oldukları %97 ve %98 bezerlik oranlarıyla, yeni tür olma potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, izolatların tanı ve karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen konvensiyonel testlerin, identifikasyonda tek başına yeterli olmamasından dolayı (Adıgüzel 2006), bu testlere ek olarak moleküler yöntemler kullanıldı. Bu amaçla yapılan analizlerden bir diğeri GTG_5-PCR olup, bu teknik, ekosistemdeki çeşitliliği, suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymada ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmaların tür ve tür altı seviyede ayırımında kullanılan oldukça etkin ve basit bir yöntemdir (Adıgüzel *et al.* 2012). Yapılan bu çalışmada GTG_5-PCR yönteminin organizmalar arasındaki genetik polimorfizmi ortaya koymada, literatür veriyle paralel olarak oldukça başarılı olduğu tespit edildi (Adıgüzel 2006; Adıgüzel *et al*. 2012a; Adıgüzel 2012b, Yanmis *et al*. 2015 Adıgüzel and Yürekli 2015).

Adıgüzel vd. (2012), et örneklerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarını, fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak karakterize etmişler. Sonuçta rep-PCR yönteminin bizim verilerimize paralel olarak, *E. coli* suşları arasında ki genotipik farklılıkları ortaya koymada oldukça başarılı olduğunu gözlemlemişledir.

İdentifikasyon çalışması sonucunda, OZK14 ve OZK15 izolatlarının, *Staphyloccocus* cinsine ait selülolitik karakterdeki türler oldukları belirlendi. Bizim sonucumuza benzer bir biçimde, Sarkar *et al.* 1988 yılında, yaptıkları çalışmada *Staphylococus* cinslerinin normalde selülolitik aktivite göstermemesine rağmen, termitlerden elde ettikleri *Staphyloccocus* türlerinin selülozu parçalayabildiğini bildirmişlerdir.

Seo *et. al* (2013), yerli Kore keçilerinin rumenlerinden *Bacillus licheniformis JK7* suşunu izole etmiş ve bu bakterinin fakültatif, selülolitik ve ksilanotik olduğunu belirtmiştir. Bizde yaptığımız bu analiz analizler sonucunda OZK9 (*B. licheniformis*) suşumuzun literatür verisiyle paralel bir şekilde fakültatif ve selülolitik özellik gösterdiğini tespit ettik.

Bunun dışında, OZK15, OZK19, OZK29 ve OZK33 suşlarının *Enterococcus* cinsinin üyeleri olduğu tespit edildi. Robert and Bernailer 2003 yılında yaptıkları çalışmada insan kolonundan elde ettikleri *Enterococcus* cinsinin üyelerinin selülolitik karaktere sahip olduğunu yine Upadhyaya *et al.* (2012) termitlerin gutlarından izole ettikleri, *Citrobacter* ve *Enterococcus* cinslerine ait türlerin selülozu parçalama potansiyellerinin oldukça yüksek olduğunu gözlemlediler. Bizde literatür verileriyle uyumlu olarak, OZK30, OZK15, OZK19, OZK29 ve OZK33 suşlarının selülozu sindirebilme kabiliyetlerinin oldukça yüksek olduğunu belirledik.

Sonuç olarak, izolasyonu yapılan OZK25, OZK24, OZK37, OZK5, OZK1, OZK33, OZK29, OZK19 ve OZK15 suşları fırsatçı patojen olmaları ve tanımlanan 37 bakterinin, 32'sinin fakültatif anaerop veya anaerop karakterde olmaları nedeniyle bu bakterilerin endüstriyel anlamda kullanılma potansiyelleri oldukça düşüktür. Vedat KARAKAŞ'ın 2006 yılında yaptığı yükseklisans tez çalışmasında, rumen bakterilerinin selülaz enzimini kodlayan gen bölgesini, *L. plantarum'*a aktarmış ve selülolitik özellikte olmayan bir bakteriye bu özelliği katmıştır. Bu çalışma temel alınarak yüksek selülaz aktivitesi gösteren ama patojen veya anaerobik olan rumen bakterilerinin selülaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak patojen olmayan ve aerobik solunum yapan bir bakteri türüne aktarılması, bu organizmaların endüstriyel amaçla kullanımının önündeki bu engeli ortadan kaldıracağı düşünülmektedir. Bu şekilde rumen bakterilerinin yüksek selülolitik özelliğiyle, gen aktarılacak bakterinin patojen olmama ve aerobik solunum yapabilme özelliklerinin birleştirilmesi sonucu oluşacak transgenik mikroorganizmaların, biyoteknolojik açıdan çok büyük önem arzedeceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Acinas, S. G., L. A. Marcelino, V. Klepac-Ceraj, M. F. Polz. 2004. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple rrn Operons. Journal of Bacteriology 186(9): 2629-2635.

Adekambi, T., Drancourt, M. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. Int J Syst Evol Microbiol, 54, 2095-2105.

Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, 17 (1), 37-45.

Adekambi, T., Shinnick, T., Raoult, D., Drancourt, M., 2008. Complete *rpoB* Gene Sequencing as a Suitable Suoolement to DNA-DNA Hhybridization for Bacterial Species and Genus Delination. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 58, 1807-1814.

Adıgüzel, A., 2001. Erzuruma bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde brucella abortus antikorlarının ELISA ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adiguzel, A., Inan, K., Sahin, F., Arasoğlu, T., Gulluce, M., Belduz, A.O., Barıs, O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). Turk J Biol, 35, 267-274.

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. J Microbiol Methods, 79, 321-328.

Adiguzel, G., Gulluce, M., Bozoglu, C., Yanmis, D., Gormez, A., Atasever, M., Adiguzel, A., 2012. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail beef in Erzurum, Turkey. Journal of Pure and Applied Microbiology, 6(3), 1033-1041.

Anonymous 2008a http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/microbiology.html

Anonymous, 2008b http://www.fao.org/docrep/003/w4988e/W4988E01.htm

Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46: 548s.

Arda, M., 2012. Temel Mikrobiyoloji. Veterinerlik Fakültesi, Ankara.

Barış, Ö., 2008. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Barry, T.N., Duncan. S.J., 1984. The role of condensed tanning in the nutritional value of lotus pedunculatus for sheep. 1. Voluntary intake. British Journal of Nutrition, 51(3), 485-491.

Bassam, J.B., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 70-76.

Bisaria, V. S. Ghose, T. K., 1981. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology, 3(2), 90-104.

Bölükbaşı M.F., 1989. Fizyoloji Ders Kitabı (Vücut Isısı ve Sindirim). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1, 209-226.

Brettar, I., Christen, R., and Hofle, M.G., 2002. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic–anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 2211–2217.

Bryant, M. P., 1959. Bacterial species of the rumen. Bacteriol. Rev., 23,125–153.

Bryant, M. P., 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Fed Proc 32(7), 1809-1813.

Bryant, M. P., Robinson, I. M., 1961. An Improved Nonselective Culture Medium for Ruminal Bacteria and Its Use in Determining Diurnal Variation in Numbers of Bacteria in the Rumen. Journal of Dairy Science, 44(8), 1446-1456.

Budağ, C., 2009. Baklagil Tane Yemleri ve Ruminant Beslemede Kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 14(2), 88-101

Busse, H.J., Denner, E.B., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotech., 47(1), 3-38.

Cai, J., Wang, Z., Cai, C., and Zhou, Y., 2008. Characterization and identification of virulent Klebsiella oxytoca isolated from abalone (Haliotis diversicolor supertexta) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. Journal of Invertebrate Pathology, 97, 70–75.

Chamkha, M., Trabelsi, Y., Mnif, S., and Sayadi, S., 2011. Isolation and characterization of Klebsiella oxytoca strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. Journal of Basic Microbiology, 51, 580–589.

Chan, M.S., Maiden, M. C., Spratt, B. G., 2001. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. Bioinformatics, 17(11), 1077-1083.

Cheng, K,J., Stewart,C.S., Dinsdale. D., Costertone, J.W., 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci Technol . 10:93-120

Chesson, A., Forsberg, C.W., 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pp.;251-284. In "the rumen microbial ecosystem" (P.N.hobson ed.). Elsevier Applied Science, London.

Church,D.C., Pond,W.G.,1988.Basic Animal Nutrition and Feeding. John Wiley and Sons.Inc.,New York.

Clark, J. H., Klusmeyer, T. H., Cameron, M.R., 1992. Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the düodeneum of Dairry Cows. J.Dairy.Sci., 75, 2304-2323.

Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev, 29(2), 147-167.

Çalışkaner, Ş., Demir, E., 2001. Hayvan Besleme Fizyolojisi ve Metabolizma. Ders Kitabı No.20. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın No.55 (XIII+291). Tokat.

Çalışkaner, Ş., Demir, E., 2001. Hayvan Besleme Fizyolojisi ve Metabolizma. Ders Kitabı No.20. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın No.55, Tokat.

Dauga, C., 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 531-547.

Davis, E.O., Sedgwick, S.G., Colston, M.J., 1991. Novel structure of the *recA* Locus of *Mycobacterium tuberculosis* implies processing of the gene product. J. Bacteriol., 173, 5653-5662.

Dehority, B. A. 1991. Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. Proc Nutr Soc., 50(2), 149-159.

Dehority, B.A., 1969, Pectin-fermentating bacteria isolated from the bovine rumen. J. Bacteriol. 99:189-196.

Dehority, B.A., 1993. Microbial ecologyof cell wall fermantation, pp.425-453. In "forage cell wall structure and digestibilty" H.G. Jung, D.R. Buxton R.D. Hatfield and Ralph (ed).ASA CSSA- SSSA Madison USA.

Dewhurst, R. J., Davies, D. R., Merry, R. J., 2000. Microbial Protein Supply From The Rumen. Anim.Feed Sci.Tec., 85, 1-21.

Dijkstra J., France J., Davies, D.R., 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. J. Dairy. Sci., 81, 3370–3384.

Ekinci, M.S., Flint, H.J., 2001. Expression of bifunctional genes encoding xylanase and β-(1,3-1,4)-glucanase in gram-positive bacteria. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 25, 771-775.

enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe 2 (5), 263–284.

Ergün, T., Tuncer, Ş.D., Çaplan, İ., Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan, M.K., Küçükersan, S., Şehu, A., 2001. Hayvan Besleme ve Besleme Hastalıkları. Medipres, Ankara.

Fraser, C.M., Gocayne, D.J., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., *et al.*, 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science, 270, 397–403.

Freeman, S., Herron, J.C., 2007. Evolutionary analysis, 4th edition. Pearson Education. Frost, A.J., 1953. A review of canine and feline nocardiyosis with the report of a case. Australian Veterinary Journal, 35(1), 22-25.

Frühling, A., Schumann, P., Hippe, H., Straubler, B., and Stackebrandt, E., 2002. *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1171–1176

Gaunt, M.V., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 2037-2048.

Gillis, M., P. Vandamme, P. De Vos, J. Swings and K. Kersters 2005. Polyphasic Taxonomy. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. D. Brenner, N. Krieg, J. Staley and G. Garrity, Springer US: 43-48.

Goldenfeld, N., Woese, C., 2007. Connections Biology's Next Revolution. Nature, 445, 369.

Golding, G.B., Gupta, R.S., 1995. Protein-based phylogenies support a chimeric origin for the eukaryotic genome. Mol. Biol. Evol. 12(1), 1-6.

Goldstein, B.P., Selva, E., Gastoldo, L., Berti, M., Pallanz, R., Ripamonti, F., Ferrara, P., Denaro, M., Rioli, V., Cassani, G., 1987. A40926, a new glycolipid antibiotic with anti-Neisseria activity. Antimicrob. Agents Chemother., 31, 1961-1965.

Goodfellow, M. ve Cross, T., 1984. Classification. In: The biology of the actinomycetes, eds Goodfellow M, Mordarski J.G and Williams S.T. Academic Press, 7-164.

Goodfellow, M., Davenport, R., Stainsby, F.M. ve Curtis, T.P., 1996. Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. J. of Ind. Microbiol., 17 (3-4), 268-280.

Goodfellow, M., Fiedler, H.P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. Antonie van Leeuwenhoek, 98, 119–142.

Goodfellow, M., Işık, K., Yates, E., 1999. Actinomycete systematics: An unfinished synthesis. Nova acta Leopoldina NF80, 312, 47-82 .

Goodfellow, M., Kumar, Y., Labeda, D.P., Sembiring, L., 2007. The *Streptomyces violaceusaniyeiger* clade: a home for *Streptomycetes* with rugose ornamented spores, Antonie Van Leeuwenhoek, 92, 173–199.

Goodfellow, M., Lechevalier, M.P., 1989. Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9AL, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. Williams ST, Williams ve Wilkins, Baltimore, 4, 2350-2361.

Goodfellow, M., Maldonado, L.A., 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, vol.3, 843-888.

Goodfellow, M., Manfilo, G.P., Chun, J., 1997. Towards a practical species, concept for cultivable bacteria. In Species: The biodiversity, (Edited by M.F. Claridge, H.A., Dawah, and M.R. Wilson) Chapman and Hall, London. 25-59.

Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1977. Nocardioform Bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 31, 159-180.

Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1978. Numerical and chemical methods in the classification of *Nocardia* and related taxa. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektion skrankteiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement, 6, 43-51.

Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1984. Circumscription of the genus. In: Kubica, G.P. and Wayne, L.G. (eds.): The Mycobacteria; New York: Marcel Dekker, 1-24.

Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., 1993. Handbook of new bacterial systematics. Academic Press Ltd., London.

Goodfellow, M., Simpson, K.E., 1987. Ecology of streptomycetes. Front. Appl. Microbiol., 2, 97-125.

Goodfellow, M., Stanton, L.J., Simpson, K.E., Minnikin, D.E., 1990. Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. J. Gen. Microbiol., 136, 19-36.

Goodfellow, M., Weaver, C.R., Minnikin, D.E., 1982. Numerical classification of some rhodococci, corynebacteria and related organisms. J. Gen. Microbiol., 128, 731-745.

Görmez, A., 2011. Erzurum İlinde Kayısı Ağaçlarından izole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Tanısı, Karakterizasyonu ve Çeşit Reaksiyonları. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y., 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 149-159.

Gupta, R.S., 2009. Protein signatures (molecular synapomorphies) that are distinctive characteristics of the major cyanobacterial clades. Int J Syst Evol Microbiol., 59, 2510-2526.

Gurtler, V., Smith, R., Mayall, B.C., Pötter-Reinemann, G., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R.M., 2001. *Nocardia veterana* sp. nov., isolated from human bronchial lavage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 933-936.

Gurtler, V., Stanisich, V.A., 1996. New Approaches to Typing and Identification of Bacteria Using the 16S-23S rDNA spacer, Microbiology, 142, 3-16.

Harley, J.P., Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw−Hill Companies, 466p.

Heinrichova, K., Wojciechowicz, M., Ziolecki, A., 1989. A pectinolytic enzyme of Selenonomonas ruminantium.J. Appl. Bacteriol.66:169-174

Hespell, R.B., Cotta, M.A., 1995. Degradation and utilization by Butyrivibrio fibrisolvens H17c of xylanase with differnt chemical and physical properties. Applied and Environmental Microbiology 61:3042-3050

Hespell, R.B., O'Bryan-shah, P.J., 1992 Prufication and characterization of an aL-arabinofuranosidase from Butyrivibrio fibrisolvens GS113 Applied and Environmental Microbiology 58:1082-1088

Hespell, R.B., Wolf, R., Bothast, R.J., 1987. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 53, 2849-2853.

Hetherington, S.V., Watson, A.S., Patrick, C.C., 1995. Sequence and Analysis of the *rpoB* Gene of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 2164-2166.

Hobson, P.N., Wallace, R.J., 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. Crit. Rev. Microbiol. 9, 253-320.

Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., Engelhardt, H., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 3963–3967.

Hoover,W.H., 1986. Chemical Factors Involved in Ruminal Fiber Digestion. J.Dairy Sci., 69:2755-2766.

Hungate, R.E., 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, London, UK.

Hungate, R.E., 1969. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Methods In Microbiology, Academic Press. London. p. 117-132.

Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In Mammalian protein metabolism, vol. 3, Edited by H.N. Munro.New York:Acedemic Press. 21-132.

Julliand, V., Rıondet, C., Vaux, A., Alcaraz, G., Fonty, G., 1998. Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. Anim. Feed Sci. Technol., 70, 161-168.

Kamra, D.N., 2005. Rumen Microbial Ecosystem. Current Science, 89 (1), 124-135.

Karslı, M. A., 1998. Ruminal Microbial Protein Synthesis in Sheep Fed Forages of Varying Nutritive Value. PhD Thesis, Iowa State University, Ames Iowa.

Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S., 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. J Clin Microbiol., 38(1), 301-308.

Kasai, H., Tamura, T., Harayama, S., 2000a. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB* based phylogeny and DNA relatedness. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 127–134.

Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen P H. 2011. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. J Microbiol Meth., 84, 52-60.

Kılıç. A., 1985. Sığırcılıkta Kaba Yem Tüketimi Üzerine Etki Eden Etmenler. Yem Sanayii Dergisi 48, S. 3-1

Kim, B. J., Kim, C. J., Chun, J., Koh, Y. H., Lee, S. H., Hyun, J. W., Cha, C. Y., Kook, Y. H., 2004. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitatospora* based on partial RNA polymerase *β*-subunit gene (*rpo*B) sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 593-598.

Kim, B. J., Koh, Y. H., Chun, J., Kim, C. J., Lee, S. H., Cho, M., Hyun, J.W., Lee, K.H., Cha, C.Y., Kook, Y.H., 2003. Differentiation of Actinomycete Genera Based on Partial *rpoB* Gene Sequences. J. Microbiol. Biotechnol., 13(6), 846-852.

Kim, B., Al-Tai, A.M., Kim, S.B., Somasundaram, P., Goodfellow, M., 2000. *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanaseproducing streptomycete. Int J Syst Evol Microbiol., 50, 505–509.

Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., Goodfellow, M., 1999. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 49, 7–17.

Kim, K. S., Ko, K. S., Chang, M. W., Hahn, T. W., Hong, S. K., Kook, Y. H., 2003. Use of rpoB sequences for phylogenetic study of Mycoplasma species. FEMS Microbiol Lett., 226(2), 299-305.

Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. Journal of Microbiological Methods, 84, 81-87.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comperative studies of nucleotide sequences. Mol. Evol., 16(2), 111-120.

Klieve, A.V., Yokoyama, M.T., Forster, R.J., Ouwerkerk, D., Bain, P.A., Mawhinney, E.L., 2005. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic Ruminococcus spp. of ruminal origin. Appl Environ Microbiol., 71, 4248–4253.

Kroppenstedt, R. M., 2001. *Nocardia veterana* sp. nov., isolated from human bronchial lavage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 933-936.

Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J.M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., Stackebrandt, E., 2005. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea sp.* nov., *Micromonospora echinoaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetica* sp. nov.,

Micromonospora sagamiensis sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 28, 328–339.

Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Goodfellow, M., 1990. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. Syst. Appl. Microbiol., 13, 148-160.

Kroppenstedt, R.M., 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. Chemical Methods in Bacterial Systematics, Academic Press, London. 173–199.

Kroppenstedt, R.M., Goodfellow, M., 1992. The family *Thermomonosporaceae*. The Prokaryotes. Berlin: Springer, 1085-1110.

Kroppenstedt, R.M., Goodfellow, M., 2006. The family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallina*, *Actinomadura*, *Spirillospora* and *Thermomonospora*. In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, vol. 3, 682-724.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software fr evolutionary analysis of DNA and protein sequences, Briefing in Bioinformatics, 9 (4), 299-306.

Lagesen, K., Ussery, D. W., Wassenaar, T. M., 2010. Genome Update: The Thousandth Genome A Cautionary Tale. Microbiology, 156, 603-608.

Lapage, S. P., Saniyeeath, P. H. A. 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria. ASM Press.

Leng, R. A., Nolan, J. V., 1982. Protein Nutrition of The Lactating Dairy Cow.J.Dairy Sci., 67, 1072-1089.

Li, W., Huan, X., Zhou, Y., 2009. Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 383:397-400.

Louboudy, S.S., Bayoumi, R.A., El-Sahrawey, M.H., and Abd-El-Baseer, M.A., 2007. Isolation, Purification, Characterization and Physiological Behavior of Drinking Water-Borne Pathogenic Bacteria. N. Egypt. J. Microbiol., 17, 105-120.

Lowe, S. E., M. K. Theodorou and A. P. Trinci 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. Applied and Environmental Microbiology, 53(6), 1216-1223.

Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trıncı, A.P.J. 1987a. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. Applied and Environmental Microbiology, 53, 1210-1215.

Ludwig, W., Klenk, H.P. 2005. A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 506–577

Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2009. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Onbirinci Baskıdan Çeviri, Syf 324-325.

Maki, M., Leung, T. And Quin, W., 2009. The Prospects of Cellulase-Producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int. J. Biol. Sci. 5:500-516.

Markant, A., Pallauf, J., 1996. Metallothionein and zinc as potential antioxidants in radical-induced lipid peroxidation in cultured hepatocytes. J Trace Elem Med Biol., 10(2), 88-95.

Martin, S.A., 1992. Effects of extracellular pH and phenolic monomers on glucose uptake by Fibrobacter succinogenes S85. Lett. Appl. Microbiol., 15(1) 26–28.

Martin, S.A., 1994. Nutrient transport by ruminal bacteria: A Review. J. Anim. Sci., 72, 3019–3031.

Mc Donald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., 1981. Animal Nutrition. Third Editon. Longman Group Ltd., London.

McAllister, T., 2000. Learning more about rumen bugs: genetics and environmental factors affecting rumen bugs. Southern Alberta Beef Review, 2, 2921-2927.

Miller, R.V., Kokjohn, T.A., 1990. General microbiology of *recA*: enviromental and evolutionary significance. Annu. Rev. Microbiol., 44, 365-394.

Milne, A., Theodorou, M.K., Jordan, M.G.J., King-Spooner, C., Trıncı, A.P.J., 1989. Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva and in pure culture. Experimental Mycology, 13, 27-37.

Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identifiction. Molecular Microbiology, 26 (5), 1005-1011.

Morris, E. J., Van Gylswyk, N. O., 1980. Comprasion of the actin of rumen bacteria on cell walls from *Eragrostis tef.* J. Agric.Sci.(Camb), 95, 313-323.

Orpin,C.G., Joblin, K.N., 1988. The rumen anaerobic fungi.pp. 129-150. In 'The Rumen Microbiol ecosystem'. Ed P.N.Hobson.Elsevier Sci. Publ.Co. New York

Oyeleke, S. B. Okusanmi, T. A., 2008. Isolation and characterization of cellulose hydrolysing microorganism from the rumen of ruminants. African Journal of Biotechnology, 7(10), 1503-1504.

Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Özpınar, Ö., 2007. Termofilik-Selülolitik Bakteri Clostridium Thermocellum Kullanılarak Selüloz ve Selülolitik Atıkların Parçalanması Ve Şeker Birikiminin Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gebze İleri teknoloji Enstitüsü.

Pettipher,G.L., Latham, M.J., 1979. Characteristics of enzymes produced by Ruminococcus flavefaciens which degrate plant cell walls.J.Gen. Micro.110:21-27.

Pouramezan, Z., Ghezelbash, G.R., Romani, B., Ziaei, S., Hedayatkhah, A., 2012. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite Microcerotermes diversus (Silvestri). Mikrobiologiia, 81(6),796-802.

Rademaker, J. L. W., Savelkoul, F. J., 2004. Computer-assisted pattern analysis of electrophoretic fingerprints and database construction, Chapter 7.5. In: G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans, & J. D. van Elsas (Eds.), Molecular microbial ecology manual. 2nd ed. (pp. 1-50), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B.J., Ninet, B., Hirschel, B., Emler, S., 1998b. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol., 36, 1761-1764.

Rodrigues, D.F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., Tiedje, J.M., 2006. Characterization of Exiguobacterium isolates from the Siberian permafrost. Description of Exiguobacterium sibiricum sp. nov. Extremophiles, 10, 285–294

Rossello-Mora, R., Aman, R., 2001. The Species Concept for Prokaryotes, FEMS Microbiology Reviews, 25, 39-67.

Russell, J.B., Rychlik, J.L., 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Sci, 292, 1119 – 1122.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos, S. R., Ochman, H., 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. Environmental Microbiology, 6(7), 754-759.

Sarkar, A., Varma, A., Sarkar, A., 1988. Influence of cellulolytic organisms associated with a termite, Odontotermes obesus, on carbon mobility in a semiarid ecosystem. Arid Soil Research and Rehabilitation, 2(2), 75-84.

Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.

Schleifer, K. H., 2010. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. Syst. Appl. Microbiol., 32, 533–542.

Selinger, L.B., Forsberg, C.W., Cheng, K.J., 1996. The rumen: a unique source of

Seo, K. T., Park, I. H., Kwon, H., Piao, M. Y., Lee, H. C., Ha, J. K., 2013. Characterization of Cellulolytic and Xylanotic Enzymes of Bacillus licheniformis JK7 isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. J. Anim. Sci., 26, 50-58.

Stackebrandt, E., 2006. Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. (Stackebrandt, E., Ed.) Springer. 320s.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P, Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol., 52, 1043-1047.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 479-491.

Stainer, R.Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M.L., Paintes, P.R., 1986. The microbial world, 5th. ed. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.

Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P., 1997. The rumen bacteria. In: Hobson PN, Stewart CS. Editors. The Rumen Microbial Ecosystem. Second Edition. London, Blackie Academic & Professional, 10–55.

Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gonoi, T., Mikami, Y., 2010. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. Journal of Medical Microbiology, 59, 165-171.

Tamura, T., Hatano, K., Suzuki, K., 2006. A new genus of the family *Micromonosporaceae*, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 1959-1964.

Tamura, T., Hayakawa, M., Hatano, K., 2001. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Virgosporangium* gen. nov., with descriptions of *Virgosporangium ochraceum* sp. nov. and *Virgosporangium aurantiacum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1809-1816.

Taş, E., 2008. Fiğ Tane Yeminin Norduz Kuzularında Bazı Rumen ve Kan Parametreleri İle Rumen Protozoaları Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.

Temizkan, G., Yılmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N., 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, 116-117s, İstanbul.

Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A., Vuddhakul, V., 2006. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the most probable number technique by PCR. Aquaculture, 261(1), 1-9.

Tindall, J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwing, W., Kampfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 249-266.

Trüper, H., and Schleifer, K. 2006. Prokaryote Characterization and Identification. The Prokaryotes. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt, Springer New York: 58-79.

Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., Kataoka, M., 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol., 181, 78-82.

Van Belkum, A., 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR: a literature review. Clin. Microbiol. Rev., 7, 174-184.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev., 60 (2), 407-438

Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Yang, W., 2001, Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the digestion of alfalfa hay and barley straw by cellulolytic ruminal bacteria, Asian-Australas J Anim Sci. 25(1), 66–74.

Wang, Y., Ramirez-Bribiesca, J. E., Yanke, L. J., Tsang, A., McAllister, T. A., 2012. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on the Microbial Attachment and Digestion of Barley Straw In vitro. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 25(1), 66-74.

Weimer, P.J., 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? J. Dairy Sci. 79:1496-1502

Wellington, E.M., 2009. *Actinobacteria*. Encyclopedia of Microbiology. (Moselio Schaechter, Editor), Oxford:Elsevier, 26-44.

Wieser, M.,and Busse, H.J., 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 1087–1093.

Williams, A.G., Coleman, G.S., 1988. The rumen protozoa, p.77-128. In the "The Rumen Microbial Ecosystem".(P.N.Hobson ed.). Elsevier Applied Science, London

Wojciechowıcz, M., Heinrichova, K., Ziolecki, A., 1982. An exopectate lyase of Butyrivibrio fibrisolvens from the bovine rumen. J.Gen.microbiol.128:2661-2665.

Wojciechowicz, M., Ziolecki, A., 1984. A note on the pectinolytic Enzyme of Streptococcus bovis. J.appl.Bacterriol.56: 515-518

Yamamoto, S., and Harayama, S., 1995. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of Pseudomonas putida strains. Applied and Environmental Microbiology, 61(3), 1104-1109.

Yamamoto, S., Bouvet, P.J., Harayama, S., 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 87-95.

Yanez, L., Groffen, J., Valenzuela, D. M., 2003. c-K-ras mutations in human carcinomas occur preferentially in codon 12. Oncogene 1: 315-318, 1987.

Yao, W., and Vining, L. C., 1994. Cloning and sequence analysis of a recA-like gene from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. FEMS Microbiol Lett., 118(1-2), 51-56.

Yokoyoma, M.T. Johnson, K.A., 1998. Microbiology of The Rumen and Intestine.Vol.7.the Ruminant Animal Digestive Phsyology And Nutrition. (Ed:D.C.Church).Prentice-Hall Inc.,Illinois.

Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M., Yu, X., 2008. A comperative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van Leeuwenhoek, 93, 241-248.

Zhang, J., Liu, Z., 2004. Repetitive-element PCR genomic fingerprinting of the genus *Streptomyces*, Acta Microbiol. Sin., 44, 281–285.

Zhang, Y., Gao W., Meng Q., 2007. Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fibre particle size. Arch. Anim. Nutr., 61, 114 – 125.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2009 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.