

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ**  
**ENSTİTÜSÜ**

**YEREL *Bacillus* İZOLATLARININ**  
**TİPLENDİRİLMESİNDE MOLEKÜLER**  
**BİYOLOJİK YAKLAŞIMLAR**

**Şaziye Serda KAYMAN**  
**Yüksek Lisans Tezi**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE**

**2007**



T.C.  
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL *Bacillus* İZOLATLARININ  
TİPLENDİRİLMESİNDE MOLEKÜLER  
BİYOLOJİK YAKLAŞIMLAR

Şaziye Serda KAYMAN  
Yüksek Lisans Tezi  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE  
2007

## ÖZET

**Tez Başlığı:** Yerel *Bacillus* İzolatlarının Tiplendirilmesinde Moleküler Biyolojik Yaklaşımlar.

**Yazarın Adı:** Ş. Serda KAYMAN

DNA düzeyindeki farklılıkları saptamak için kullanılan genotipik tiplendirme yöntemlerinin ayırt ettirici özelliği klasik tiplendirme yöntemlerine göre çok yüksektir. Bu tez çalışması kapsamında, daha önce  $\alpha$ -amilaz, alkalen proteaz ve lipaz üretkenliklerine göre seçilmiş ve manuel testler ile ticari kitler kullanılarak ön tiplendirilmeleri yapılmış olan 25 yerel *Bacillus* izolatının 16S rDNA dizi analizi, ARDRA ve ribotyping moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak adlandırılması ve bu yöntemlerin G.Y.T.E. Biyoloji Bölümü Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında rutin olarak kullanımının sağlanması hedeflenmiştir.

Bu hedefler doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalarda *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC)'dan sağlanan *Bacillus* soyları referans olarak kullanılmıştır. Yerel *Bacillus* izolatlarının PCR ile çoğaltılan 16S rDNA'larının dizilimleri CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter®) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen 16S rDNA baz dizilimleri NCBI BLAST hızlı tarama programı kullanılarak GenBank veri tabanındaki nükleotit dizileriyle “align” edilmiş ve yerel izolatların en yüksek benzerlik gösterdikleri *Bacillus* türleri belirlenmiştir. 25 yerel izolattan 21'i için atanan tür adları, manuel ve ticari kitler ile elde edilen sonuçlara göre önerilen olası tür adları ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Farklı bulunan izolatlardan P20 *B. cereus* grubu, P22 *B. flexus*, A28 ve A26 ise *B. subtilis* ile benzerlik göstermiştir.

Referans *Bacillus* soyları eşliğinde gerçekleştirilen 16S ve *rrn* ARDRA çalışmalarında *Sau3AI*, *MboII* ve *CfoI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. *rrn* operonunu çoğaltmaya yönelik PCR'larda özgül olmayan ikinci bir ürün gözlenmiş, PCR koşullarını optimize etmeye yönelik gerçekleştirilen çeşitli denemelere (enzim, primer tutunma sıcaklığı, PCR döngüleri, termal döngü cihazı, kalıp DNA'nın

özütlenme yöntemi vb.) karşın bu ürünün çoğalması engellenememiştir. Bu nedenle, *rrn* ARDRA çalışmaları, hem tüm izolat ve referans soyları içerecek şekilde saf olmayan *rrn*-PCR ürünleri ile hem de seçilen 11 yerel izolat ve 10 referans soyun jelden izole edilen 4,5 kbç büyüklüğündeki *rrn* operonları ile gerçekleştirilmiştir. *rrn*-ARDRA jel profilleri, Vilber Lourmat Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülendikten sonra sistem yazılımı BIO 1D++ ile, UPGMA (unweighted pair group match avarage) yöntemi kullanılarak dendogramlara dönüştürülmüştür. 16S ARDRA profilleri ise, o dönemde uygun görüntüleme sistemi ve yazılımı bulunmadığı için, gözle incelenerek tablolaştırılmış ve referans soylarla benzerlikleri irdelenmiştir.

*EcoRV*, *ClaI* ve *HindIII* enzimlerinin kullanıldığı ribotyping çalışmaları kapsamında, *rrn* operonuna yönelik 5 primerden oluşan OligoMiks-5'in, "DIG Oligonucleotide Tailing Kit" (Roche) kullanılarak DIG-dUTP ile veya T4 polinükleotit kinaz kullanılarak [ $\gamma$ - $^{33}$ P]ATP ile işaretlendiği denemeler gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle de, pozitif kontrol olarak kullanılan 16S rDNA ve filtre üzerindeki belirli bir bölgede alınan spotlar, oligonükleotitlerin etkin şekilde işaretlendiğine ve özgül olarak 16S rDNA dizilerine tutunduğunu göstermiştir. Ribotyping ve *rrn*-PCR yöntemlerine yönelik optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Gerekli alt yapının tamamlanmasının ardından AFLP, DNA-DNA hibridizasyonu gibi ayırt ettiriciliği geçerli diğer yöntemlerin de yerel *Bacillus* izolatlarının moleküler tiplendiriminde kullanılması planlanmaktadır. Buraya dek yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, P20 ve P22 soyları için daha önce önerilen tür isimlerinden bütünüyle farklı türlere işaret etmektedir. Diğer moleküler temelli analizler sonucu elde edilecek veriler özellikle bu iki izolatu sınıflandırmak adına ayrıca önem taşımaktadır.

## SUMMARY

**Title of Thesis:** Molecular Biological Approaches in Typing Endemic *Bacillus* Isolates.

**Author:** Ş. Serda KAYMAN

Genotypic typing methods which are used for detecting differences at DNA level has a relatively higher discriminatory power than the classical typing methods. The aim of this study was to identify 25 endemic *Bacillus* isolates, that are previously selected on the basis of  $\alpha$ -amilase, alkaline protease and lipase productivity and preliminarily typed by using manual tests and commercial kits, by 16S rDNA sequencing, ARDRA and ribotyping methods and to ensure rutin utilization of these methods in Gebze Institute of Technology, Biology Department, Enzyme Molecular Genetics Laboratory.

In studies carried out to achieve these goals, *Bacillus* species supplied by *Bacillus* Genetic Stock Center (BCGS) were used as references. PCR amplified 16S rDNA sequences of the endemic *Bacillus* isolates were obtained by CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter®). These 16S rDNA sequences were aligned against the nucleotide sequences in the GenBank database using NCBI BLAST tool and the highest similarities were determined. When the potential species names assigned depending on the results of the manual tests and commercial kits evaluated 21 names out of 25 were matching. However, P20 seemed to be a member of the *B. cereus* group, P22 showed maximum similarity with *B. flexus*, while A28 and A26 isolates were similar to *B. subtilis*.

Reference *Bacillus* species accompaniment to the endemic isolates were included in 16S and *rrn*-ARDRA studies and *Sau3AI*, *MboII* and *CfoI* restriction enzymes were used for the analysis. During the experiments of PCR amplification of the *rrn* operon, amplification of a second unspecific product was observed. Despite the effort to optimize the PCR conditions (enzyme, primer annealing temperature, PCR cycles, PCR machine, the extraction method of the template DNA), the production of the unspecific PCR product couldn't be prevented. Therefore, *rrn*

ARDRA studies were carried out, including all the endemic isolates and reference species, with both impure *rrn* PCR products and the 4,5 kb *rrn*-operons of selected 11 endemic isolates and 10 reference species which are derived from the gel. *rrn*-ARDRA gel profiles were converted into denogrames with BIO 1D++ system software using UPGMA (unweighted pair group match average) method after image capturing with Vilber Lourmat Ifinity-3026 WL/26M. 16S ARDRA profiles were visually evaluated because of the lack of such a system then.

In ribotyping studies *EcoRV*, *ClaI* and *HindIII* enzymes were used and Oligomix-5, which is consisting of five primers targeting the *rrn*-operon, was labeled with both DIG-dUTP and  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP in separate experiments. With both approaches banding patterns obtained only for 16S rDNA which was used as a positive control and in a small area on the membrane. These results indicate that the oligonucleotides were effectively labeled and specifically binding 16S sequences. The optimization studies for ribotyping and *rrn*-PCR still last.

Methods such as AFLP and DNA-DNA hybridization has a high discriminatory power and we are planning to use these methods in molecular typing of endemic *Bacillus* isolates, too. Evaluation of the results obtained with all of the methods performed showed that P20 and P22 isolates are showing no match with the preliminary typing results. Utilization of other molecular typing methods would be valuable especially for these two isolates.

## TEŞEKKÜR

Bana ekip çalışmasının ve bilginin değerini, bir insanın kendine güvenmesinin önemini öğreten, en sıcak bilimsel konularda en yeni teknolojiler ile çalışma imkanı sunan, bilimsel kimliği ve iş ahlakı ile örnek olan değerli hocam Prof.Dr. Füsün Gümüşel’e teşekkür ederim.

Değerli danışmanım Yrd.Doç.Dr. Saliha İşsever Öztürk’e hiç esirgemediği güler yüzü, gerek tez çalışması kapsamındaki deneyler gerekse tez yazımı sırasındaki yol göstericiliği ve insan üstü sabrı için teşekkür ederim.

Bu tez çalışması kapsamında gece gündüz demeden çalışan, tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bitmek tükenmek bilmeyen sorularıma her zaman güler yüzle cevap veren, varlıklarından güç aldığım sevgili çalışma arkadaşlarım Ar.Gör. Merve Tuzlakoğlu Öztürk ve Ar.Gör. Nagihan Akbulut’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan yerel *Bacillus* izolatlarının kaynaklarından saflaştırılması ve ön tiplendirimlerinin yapılmasında emeği geçen arkadaşlarım Uzman Hüseyin Balcı’ya ve Mutlu Battal’a teşekkür ederim.

Neşeli halleri ile en kötü günde bile beni gülümsetmeyi başaran güzeller güzeli can arkadaşım Ar.Gör. Hülya Akdemir’e ve bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Ar.Gör. Özlem Akkaya’ya teşekkür ederim.

Güler yüzü ve nasihatleri ile destek olan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Yosun Mater’e, gerek ders gerekse tez aşamasında her zaman yanımda olan yol arkadaşım Ar.Gör. Irmak Şah’a ve bana her zaman destek olan arkadaşım Ergun Kaya’ya teşekkür ederim.

Beni en iyi şekilde yetiştirebilmek için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan, kendime inanmadığım zamanlarda bile bana inanmaya devam eden, attığım her adımda, aldığım her kararda beni koşulsuz destekleyen, en değerli varlıklarım canım annem, canım babam ve kahramanım ağabeyime teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK (TBAG-105T-188) tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                                                                                             |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                                                                   | iv   |
| SUMMARY .....                                                                                                                               | vi   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                                               | viii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....                                                                                                                    | ix   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                                                                                         | xi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                                                        | xiii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                                                     | xvi  |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                              | 1    |
| 1.1. MOLEKÜLER TİPLENDİRME TEKNİKLERİ.....                                                                                                  | 10   |
| 1.1.1. ARDRA (Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi)....                                                                     | 10   |
| 1.1.2. Ribotyping.....                                                                                                                      | 13   |
| 1.1.3. DNA Dizi Analizi .....                                                                                                               | 15   |
| 1.1.4. DNA-DNA Hibridizasyonu, Denatüre DNA Moleküllerinin Yeniden Bir Araya Gelmesi (“reassosiation”) ve G+C İçeriğinin Belirlenmesi ..... | 18   |
| 1.1.5. PFGE .....                                                                                                                           | 20   |
| 1.1.6. Southern Blot (SB).....                                                                                                              | 21   |
| 1.1.7. RFLP .....                                                                                                                           | 22   |
| 1.1.8. AFLP .....                                                                                                                           | 23   |
| 1.1.9. RAPD ve AP-PCR (arbitrarily primed PCR).....                                                                                         | 24   |
| 1.1.10. RISA (ITS-PCR) .....                                                                                                                | 25   |
| 1.1.11. REP-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR .....                                                                                                  | 26   |
| 1.1.12. DGGE ve TGGE .....                                                                                                                  | 28   |
| 1.1.13. T-RFLP .....                                                                                                                        | 30   |
| 1.2. TEZİN AMACI.....                                                                                                                       | 31   |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....                                                                                                                  | 32   |
| 2.1. Genomik DNA Özütlemeleri .....                                                                                                         | 32   |
| 2.1.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması.....                                                                                                | 32   |
| 2.1.2. Genomik DNA Özütleme Yöntemleri .....                                                                                                | 33   |
| 2.1.2.1. CTAB Yöntemi .....                                                                                                                 | 33   |
| 2.1.2.2. TEST Yöntemi .....                                                                                                                 | 34   |
| 2.1.2.3. Hızlı Yöntem.....                                                                                                                  | 35   |
| 2.1.2.4. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) Protokolü .....                                                                     | 36   |
| 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....                                                                                                 | 37   |
| 2.2.1. 16S rDNA’ların PCR ile Çoğaltılması.....                                                                                             | 37   |
| 2.2.2. <i>rrn</i> Operonunun PCR ile Çoğaltılması.....                                                                                      | 39   |
| 2.2.3. 16S rDNA Dizi Analizi.....                                                                                                           | 43   |
| 2.2.3.1. CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter®).....                                                                            | 43   |
| 2.2.3.2 16S rDNA PCR Ürünlerinin Wizard® SV Gel and PCR Arındırma Sistemi (Promega) ile Saflaştırılması.....                                | 43   |
| 2.2.3.3. GenomeLab™ Boyalı Sonlandırıcı Kullanılan Döngü-Dizi Analiz Kiti (Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing).....    | 44   |
| 2.2.3.4 16S rDNA Dizi Analizi için PCR .....                                                                                                | 45   |
| 2.3. PCR ile Çoğaltılmış Ribozomal DNA’nın Restriksiyon Analizi (ARDRA) ..                                                                  | 47   |
| 2.3.1. 16S rDNA ARDRA .....                                                                                                                 | 47   |
| 2.3.2. <i>rrn</i> -ARDRA .....                                                                                                              | 48   |
| 2.3.2.1. Wizard® SV Jel ve PCR Saflaştırma Sistemi Protokolü.....                                                                           | 49   |
| 2.3.3. Metaforlu Jel (%1) .....                                                                                                             | 49   |

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4. “RIBOTYPING” (Ribotiplendirme) .....                                                            | 50  |
| 2.4.1. Mikrodiyaliz .....                                                                            | 50  |
| 2.4.2. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim .....                                                        | 51  |
| 2.4.3. İşaretleme Karışımının Hazırlanışı .....                                                      | 52  |
| 2.4.3.1. DIG ile İşaretleme .....                                                                    | 52  |
| 2.4.3.2. Radyoizotop ile İşaretleme .....                                                            | 52  |
| 2.4.4. Agaroz Jeldeki Bantların Vakumlu Transfer Cihazı ile Membrana Aktarımı .....                  | 53  |
| 2.4.5. Membranın Hibridizasyonu .....                                                                | 54  |
| 2.4.5.1. DIG İşaretleli Oligomiks-5 ile Hibridizasyon .....                                          | 54  |
| 2.4.5.2. <sup>33</sup> P işaretleli Oligomiks-5 ile Hibridizasyon .....                              | 56  |
| 2.5. ÇÖZELTİLER .....                                                                                | 57  |
| 2.6. Kullanılan Primerler .....                                                                      | 64  |
| 2.7. Kullanılan Cihazlar .....                                                                       | 64  |
| 2.8. Kullanılan Sarf Malzemeleri .....                                                               | 66  |
| 3. BULGULAR .....                                                                                    | 69  |
| 3.1. GENOMİK DNA ÖZÜTLEMELERİ .....                                                                  | 69  |
| 3.2. PCR .....                                                                                       | 70  |
| 3.2.1. 16S rDNA PCR .....                                                                            | 70  |
| 3.2.2. rrn-PCR .....                                                                                 | 71  |
| 3.3. 16S rDNA DİZİ ANALİZİ .....                                                                     | 91  |
| 3.4. ARDRA .....                                                                                     | 106 |
| 3.4.1. 16S ARDRA .....                                                                               | 106 |
| 3.4.1.1. CfoI .....                                                                                  | 106 |
| 3.4.1.2. MboII .....                                                                                 | 118 |
| 3.4.1.3. Sau3AI .....                                                                                | 130 |
| 3.4.2. rrn-ARDRA .....                                                                               | 140 |
| 3.4.2.1. Özgün olmayan ikincil ürünün varlığı dikkate alınmadan gerçekleştirilen ARDRA analizi ..... | 140 |
| 3.4.2.1.1. Jel profilleri .....                                                                      | 140 |
| 3.4.2.1.2. Dendogramlar .....                                                                        | 144 |
| 3.4.2.2.1. Jelden izole edilen özgül PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA analizi .....              | 149 |
| 3.4.2.2.2. Dendogramlar .....                                                                        | 153 |
| 3.5. RIBOTYPING .....                                                                                | 165 |
| 3.5.1. MİKRODİYALİZ .....                                                                            | 165 |
| 3.5.2. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE SİNDİRİM .....                                                     | 166 |
| 3.5.3. HİBRİTLEME .....                                                                              | 169 |
| 3.5.3.1. DIG işaretleli problemlerin kullanıldığı “Ribotyping” denemesi .....                        | 169 |
| 3.5.3.2. Radyoizotop ile işaretleli problemlerin kullanıldığı “Ribotyping” denemesi .....            | 172 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                           | 175 |
| 4.1. 16S rDNA Dizi Analizi .....                                                                     | 178 |
| 4.2. ARDRA .....                                                                                     | 183 |
| 4.2.1. 16S ARDRA .....                                                                               | 183 |
| 4.2.2. rrn-ARDRA .....                                                                               | 191 |
| 4.3. Ribotyping .....                                                                                | 203 |
| SONUÇLAR .....                                                                                       | 208 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                      | 212 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                       | 218 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------|
| AFLP              | Çoğaltılmış fragman uzunluğu polimorfizmi               |
| AP                | Alkalın fosfataz                                        |
| AP-PCR            | Gelişigüzel primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu   |
| ARDRA             | Çoğaltılmış ribozomal DNA fragman uzunluğu polimorfizmi |
| bç                | Baz çifti                                               |
| cDNA              | Eşlenik DNA                                             |
| cm                | Santimetre                                              |
| CTAB              | Setil trimetil amonyum bromid                           |
| dATP              | 2'-deoksiadenozin 5'-trifosfat                          |
| dCTP              | 2'-deoksisitidin 5'-trifosfat                           |
| ddATP             | 2',3'-dideoksiadenozin 5'-trifosfat                     |
| ddCTP             | 2',3'-dideoksisitidin 5'-trifosfat                      |
| ddGTP             | 2',3'-dideoksigüanozin 5'-trifosfat                     |
| ddNTP             | Dideoksiribonükleotit trifosfat                         |
| ddUTP             | 2',3'-dideoksiüridin 5'-trifosfat                       |
| DGGE              | Denatüre edici gradyan jel elektroforezi                |
| dGTP              | 2'-deoksigüanozin 5'-trifosfat                          |
| dH <sub>2</sub> O | Distile su                                              |
| DIG               | Digoksinin                                              |
| dITP              | 2'-deoksiinozin 5'-trifosfat                            |
| dk                | Dakika                                                  |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                                  |
| dNTP              | Deoksiribonükleotit trifosfat                           |
| DTT               | Ditiotreitol                                            |
| dTTP              | 2'-deoksitimidin 5'-trifosfat                           |
| dUTP              | 2'-deoksiüridin 5'-trifosfat                            |
| EDTA              | Etilendiamintetraasetikasit                             |
| ERIC              | “Enterobacterial repetitive intergenic consensus”       |
| EtBr              | Etidyum bromür                                          |
| EtOH              | Etil alkol                                              |
| FISH              | Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon                   |
| HCl               | Hidrojen Klorür                                         |
| ITS               | Transkribe olan genler arası aralayıcı                  |
| kbç               | Kilobaz çifti                                           |
| LB                | Luria Broth                                             |
| LPA               | Lineer poliakrilamit                                    |
| M                 | Molar                                                   |
| Mg                | Magnezyum                                               |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnezyum klorür                                        |
| ml                | Mililitre                                               |
| mm                | Milimetre                                               |
| NaAc              | Sodyum asetat                                           |
| NaCl              | Sodyum klorür                                           |
| NCBI              | “National Center for Biotechnology Information”         |
| ng                | Nanogram                                                |
| °C                | Derece santigrat                                        |
| OD                | Optik yoğunluk                                          |

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| P             | Fosfor                                              |
| PCR           | Polimeraz zincir reaksiyonu                         |
| PFGE          | “Pulsed-field” jel elektroforezi                    |
| pmol          | Pikomol                                             |
| PNK           | Polinükleotit kinaz                                 |
| RAPD          | Rastgele çoğaltmış polimorfik DNA                   |
| rDNA          | Ribozomal DNA                                       |
| REP           | “Repetitive extragenic palindromic”                 |
| RFLP          | Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi          |
| RISA          | Ribozomal intergenik aralayıcı analizi              |
| rpm           | Dakika başına rotasyon                              |
| rRNA          | Ribozomal ribonükleik asit                          |
| S             | Sedimentasyon katsayısı                             |
| SDS           | Sodyum dodesil sülfat                               |
| SLS           | Örnek yükleme solüsyonu                             |
| sn            | Saniye                                              |
| SSU           | Küçük alt birim                                     |
| Td            | Denatürasyon sıcaklığı                              |
| TE            | Tris-EDTA                                           |
| TGGE          | Sıcaklık gradyanı jel elektroforezi                 |
| T-RFLP        | Terminal restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi |
| U             | Ünite                                               |
| V             | Volt                                                |
| $\lambda$     | $\lambda$ faj DNA’sı                                |
| $\mu\text{g}$ | Mikrogram                                           |
| $\mu\text{l}$ | Mikrolitre                                          |
| $\mu\text{M}$ | Mikromolar                                          |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Sekil</u></b>                                                                                                                              | <b><u>Savfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 3.1. 16S rDNA PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                                 | 71                  |
| 3.2. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 72                  |
| 3.3. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 73                  |
| 3.4. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 73                  |
| 3.5. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 74                  |
| 3.6. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 75                  |
| 3.7. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 76                  |
| 3.8. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 76                  |
| 3.9. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                              | 77                  |
| 3.10. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 28                                                                                 | 78                  |
| 3.11. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 26                                                                                 | 78                  |
| 3.12. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 79                  |
| 3.13. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 79                  |
| 3.14. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 80                  |
| 3.15. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 81                  |
| 3.16. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 28                                                                                 | 82                  |
| 3.17. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 26                                                                                 | 82                  |
| 3.18. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 83                  |
| 3.19. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 7                                                                                  | 84                  |
| 3.20. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili, proram 6                                                                                   | 84                  |
| 3.21. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 85                  |
| 3.22. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 85                  |
| 3.23. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 86                  |
| 3.24. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 87                  |
| 3.25. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 88                  |
| 3.26. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 89                  |
| 3.27. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 89                  |
| 3.28. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 90                  |
| 3.29. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                                             | 90                  |
| 3.30. Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz Sisteminin yazılımından yararlanılarak, elde edilen ham verinin 16S rDNA dizilimine dönüştürülmesi | 93                  |

|                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.31. <i>Bacillus</i> sp. L6 izolatının FG45 ve MT2 ileri primerleri ile elde edilen 16S rDNA dizilimi                                                           | 94  |
| 3.32. <i>Bacillus</i> sp. L6 izolatının FG55 ve MT1 geri primerleri ile elde edilen 16S rDNA dizilimi                                                            | 94  |
| 3.33. 16S rDNA dizi analizinde kullanılan ileri ve geri primerlerin <i>B. subtilis</i> rRNA geni (GenBank, DQ301917) üzerindeki yerleşimleri                     | 96  |
| 3.34. <i>Bacillus</i> sp. L6 izolatının 16S rDNA dizilimi (1450 baz)                                                                                             | 97  |
| 3.35. <i>Bacillus</i> sp. L6 izolatı 16S rDNA dizisinin <i>B. pumilus</i> (GenBank, AB11595.1) 16S rDNA dizisi ile alignmentı                                    | 98  |
| 3.36. 16S rDNA'ların <i>CfoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                                        | 106 |
| 3.37. 16S rDNA'ların <i>MboII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                                       | 118 |
| 3.38. 16S rDNA'ların <i>Sau3AI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                                      | 130 |
| 3.39. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>CfoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                           | 141 |
| 3.40. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>MboII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                          | 142 |
| 3.41. <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>Sau3AI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                                                         | 143 |
| 3.42. <i>Bacillus</i> sp. yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>CfoI</i> bant profilinden elde edilen dendogram   | 144 |
| 3.43. <i>Bacillus</i> sp. yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>MboII</i> bant profilinden elde edilen dendogram  | 146 |
| 3.44. <i>Bacillus</i> sp. yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>Sau3AI</i> bant profilinden elde edilen dendogram | 148 |
| 3.45. Jelden izole edilen 4,5 kbç'lik <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin agaroz jel profili                                                                             | 150 |
| 3.46. Jelden izole edilen 4,5 kbç <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>CfoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                               | 151 |
| 3.47. Jelden izole edilen 4,5 kbç <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>MboII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                              | 152 |
| 3.48. Jelden izole edilen 4,5 kbç <i>rrn</i> -PCR ürünlerinin <i>Sau3AI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili                             | 153 |

|                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.49. <i>Bacillus</i> sp. yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>CfoI</i> bant profilinden elde edilen dendogram                                               | 154 |
| 3.50. <i>Bacillus</i> sp. yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>MboII</i> bant profilinden elde edilen dendogram                                              | 155 |
| 3.51. <i>Bacillus</i> sp. Yerel izolatları ile <i>Bacillus</i> referans soylarının <i>rrn</i> operonlarının <i>Sau3AI</i> bant profilinden elde edilen dendogram                                             | 156 |
| 3.52. A: Mikrodializ sonrası genomik DNA'lar                                                                                                                                                                 | 165 |
| 3.53. <i>HindIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili                                                                                                                   | 166 |
| 3.54. <i>ClaI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili                                                                                                                      | 167 |
| 3.55. <i>EcoRV</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili                                                                                                                     | 168 |
| 3.56. <i>HindIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre                                                 | 169 |
| 3.57. <i>EcoRV</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre                                                   | 170 |
| 3.58. <i>ClaI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre                                                    | 171 |
| 3.59. <i>HindIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - <sup>33</sup> P)-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi | 172 |
| 3.60. <i>ClaI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - <sup>33</sup> P)-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi    | 173 |
| 3.61. <i>EcoRV</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - <sup>33</sup> P)-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi   | 174 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <b><u>Cizelge</u></b>                                                                                                                                                                        | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. <i>Bacillus</i> Genetic Stock Center’den gelen referans <i>Bacillus</i> soyları                                                                                                         | 37                  |
| 2.2. Bir PCR tüpünde bulunması gereken bileşenler.                                                                                                                                           | 37                  |
| 2.3. Bir PCR tüpünde bulunması gereken bileşenler.                                                                                                                                           | 39                  |
| 2.4. Ön karışım hazırlanışı                                                                                                                                                                  | 44                  |
| 2.5. Oligomiks-5’i oluşturan oligonükleotit problemler                                                                                                                                       | 54                  |
| 2.6. Proje kapsamında kullanılan primerlerin dizileri ve yerleşimleri                                                                                                                        | 64                  |
| 3.1. Seçilen genomik DNA’ların izolasyon yöntemleri ve derişimleri                                                                                                                           | 69                  |
| 3.2. Yerel <i>Bacillus</i> izolatlarından elde edilen 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri                                                                     | 70                  |
| 3.3. 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri                                                                                                                      | 71                  |
| 3.4. Yerel izolatların <i>rrn</i> -PCR ürün derişimleri                                                                                                                                      | 90                  |
| 3.5. Referans soyların <i>rrn</i> -PCR ürün derişimleri                                                                                                                                      | 91                  |
| 3.6. L6 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1450 baz) BLAST sonucu                                                                                                                                | 100                 |
| 3.7. L10 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1452 baz) BLAST sonucu                                                                                                                               | 101                 |
| 3.8. L15 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1382 baz) BLAST sonucu                                                                                                                               | 102                 |
| 3.9. P20 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1465 baz) BLAST sonucu                                                                                                                               | 102                 |
| 3.10. P22 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1402 baz) BLAST sonucu                                                                                                                              | 103                 |
| 3.11. A28 yerel izolatı 16S rDNA dizisi (1427 baz) BLAST sonucu                                                                                                                              | 104                 |
| 3.12. Yerel <i>Bacillus</i> izolatlarının 16S rDNA dizi analizine göre benzerlik gösterdikleri soylar ve okunan 16S rDNA dizilimlerinin baz sayıları                                         | 104                 |
| 3.13. Yerel <i>Bacillus</i> İzolatları için klasik tiplendirme çalışmaları ve 16S rDNA Dizilimlerine Göre Önerilen Tür Adları                                                                | 105                 |
| 3.14. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 8A3 <i>B. pumilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                                                 | 107                 |
| 3.15. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 1A1 <i>B. subtilis</i> ve 27E3 <i>B. subtilis</i> “ <i>natto</i> ” referans soyları için elde edilenlerle karşılaştırılması | 109                 |
| 3.16. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 5A1 <i>B. licheniformis</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                                           | 110                 |
| 3.17. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 6A5 <i>B. cereus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                                                  | 111                 |

|                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.18. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 7A36 <i>B. megaterium</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması          | 112 |
| 3.19. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 9A20 <i>B. stearothermophilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması  | 113 |
| 3.20. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 10A5 <i>B. amyloliquefaciens</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması   | 114 |
| 3.21. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 13A10 <i>B. sphaericus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması         | 115 |
| 3.22. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 29A1 <i>B. firmus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması              | 116 |
| 3.23. 25 yerel izolat için <i>CfoI</i> ile elde edilen bantların 61A1 <i>B. coagulans</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması           | 117 |
| 3.24. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 1A1 <i>B. subtilis</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması            | 119 |
| 3.25. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 27E3 <i>B. subtilis</i> “natto” referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması   | 120 |
| 3.26. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 5A1 <i>B. licheniformis</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması       | 121 |
| 3.27. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 6A5 <i>B. cereus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması              | 122 |
| 3.28. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 7A36 <i>B. megaterium</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması         | 123 |
| 3.29. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 8A3 <i>B. pumilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması             | 124 |
| 3.30. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 9A20 <i>B. stearothermophilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması | 125 |
| 3.31. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 10A5 <i>B. amyloliquefaciens</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması  | 126 |
| 3.32. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 13A10 <i>B. sphaericus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması        | 127 |
| 3.33. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 29A1 <i>B. firmus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması             | 128 |
| 3.34. 25 yerel izolat için <i>MboII</i> ile elde edilen bantların 61A1 <i>B. coagulans</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması          | 129 |

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.35. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 1A1 <i>B. subtilis</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                   | 131 |
| 3.36. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 5A1 <i>B. licheniformis</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması              | 132 |
| 3.37. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 6A5 <i>B. cereus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                     | 133 |
| 3.38. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 7A36 <i>B. megaterium</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                | 134 |
| 3.39. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 8A3 <i>B. pumilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                    | 135 |
| 3.40. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 9A20 <i>B. stearothermophilus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması        | 136 |
| 3.41. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 10A5 <i>B. amyloliquefaciens</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması         | 136 |
| 3.42. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 13A10 <i>B. sphaericus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması               | 137 |
| 3.43. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 27E3 <i>B. subtilis</i> “ <i>natto</i> ” referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması | 138 |
| 3.44. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 29A1 <i>B. firmus</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                    | 139 |
| 3.45. 25 yerel izolat için <i>Sau3AI</i> ile elde edilen bantların 61A1 <i>B. coagulans</i> referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması                 | 140 |
| 3.46. Moleküler tiplendirme çalışmalarının ön tiplendirme sonuçları ile karşılaştırması                                                                           | 158 |

# 1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik, farklı organizma tiplerinin dağılımı ve bunların bir topluluktaki göreceli çokluğu olarak tanımlanmıştır. Çeşitlilik ayrıca bir toplulukta bilginin miktarı ve dağılımı olarak da tanımlanmıştır (Torsvik ve ark., 1998).

Moleküler mikrobiyal ekolojideki son gelişmeler doğadaki mikrobiyal çeşitliliğin düşünüleninden çok daha büyük olduğunu göstermektedir. Ancak mikrobiyal çeşitliliğin karakteri ve boyutu ile ilgili bilgilerimiz büyük ölçüde, kültüre alınmış mikroorganizmalarla yapılmış çalışmalarla sınırlıdır. Doğada gözlenebilen mikroorganizmaların % 99'undan fazlasının standart yöntemler kullanılarak kültüre alınamadığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle kültüre dayalı teknikler bir mikrobiyal topluluğun tamamını yansıtmamakta, bu da yeni arama stratejilerinin geliştirilmesini veya eski yöntemlerin uyarlanmasını tetiklemektedir (Hugenholtz ve ark., 1998; Rondon ve ark., 1999).

Doğal ürünler ve çeşitli özellikler için arayış her geçen gün katlanarak artmaktadır. Örneğin *Bacillus* spp.'nin de içinde bulunduğu toprak kökenli pek çok mikroorganizma endüstriyel açıdan önemli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* deterjan, tekstil, vb. alanlarda kullanılan enzimlerin, antibiyotiklerin, çözücülerin vb diğer moleküllerin endüstriyel olarak üretiminde kullanılır. *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* gibi diğerlerinin ürettikleri toksinler böcek öldürücü aktiviteleri nedeniyle ekinlerin korunmasında kullanılırken, *B. mycoides*, bitki büyümesini arttırmaktadır. İtalya ve Vietnam gibi ülkelerde *B. subtilis*, *B. clausii* veya *B. alcalophilus*, gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde oral bakteriyoterapötik olarak kullanılır. Öte yandan *B. anthracis* ve *B. cereus*'un bazı suşları insanlar ve/veya hayvanlar için patojendir (Rondon ve ark., 1999; Wu ve ark., 2006).

Biyoteknolojik bir hedef bir kez tanımlandığında iki soru ortaya çıkar: Birincisi; bu biyolojik hedefi en iyi üreten mikroorganizma veya mikroorganizma grubu hangisi olabilir? İkincisi; istenilen aktivite veya özelliği ortaya çıkarmak için

ne tip bir tarama yöntemi uygulanmalıdır? Günümüzde tiplendirme için kullanılmakta olan moleküler yöntemlerin çoğu farklı uzunluktaki DNA (deoksiribonükleik asit) fragmanlarının elektroforetik ayırımına dayanmaktadır. Elektroforetik sonuç bir jel üzerindeki bantların profili ile temsil edilmektedir. Bu profiller aşırı derecede karmaşık olabildiği için yorumlanması ve ilişkilendirilmesindeki kolaylık, belirli bir yöntemin kullanılabilirliğini değerlendirmede önemli bir faktördür. Yöntemin kullanımı ile varılan sonuçların kolayca yorumlanabilmesi kadar, kullanım kolaylığı da önemlidir. Bir sonuç elde etmedeki teknik zorluk, maliyet ve zaman belirli bir tiplendirme yönteminin kullanılabilirliğini ölçmek için birlikte değerlendirilmelidir (Bull ve ark., 2000; Olive ve Bean, 1999).

Alt tiplendirme veya suş sınıflandırılması birçok farklı yaklaşımla gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanımı belirli kriterleri karşılamalarına bağlıdır. Yeni geliştirilen moleküler alt tiplendirme yöntemleri birbirlerine karşı değerlendirilmeli ve kabul görmüş yöntemlerle karşılaştırılmalıdır. Kullanılan yöntemler ile bir tür içindeki bütün organizmalar tiplendirilebilmelidir. Bu nedenle iyi nitelendirilmiş özdeş ve farklı suşlar, yöntemin tiplendirme, ayırım yapabilme ve tekrarlanabilirlik yeteneğini analiz etmek amacıyla kullanılmaktadır. Tiplendirilebilirlik; bir tekniğin her bir izolata kesin bir tiplendirme sonucu atayabilmesidir. Tekrarlanabilirlik; belirli bir tekniğin seçilen bir suş ile yapılan ve yinelenen testlerinde aynı sonucu verme yeteneğidir. Tekrarlanabilirlik, özellikle, bir tür içindeki bilinen tüm suşları içeren güvenilir veritabanlarının kurulması için önemlidir. Bilinmeyen organizmalar, sınıflandırma amacıyla bu veritabanları ile karşılaştırılabilmektedir. Her alt tiplendirme yöntemi yüksek ayırım gücüne sahip olmalıdır. İlişkili olmayan suşları açık şekilde ayırabilmeli, aynı zamanda örnekten izole edilen tüm organizmaların ilişkisini gösterebilmelidir. Belirli bir tekniğin ayırım için uygulanması, tüm tekniklerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini ve genel olarak avantaj ve dezavantajların belirlenmesini gerektirmektedir. Ancak optimal ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve kararlılık beraberce gözetildiğinde mükemmel bir tekniğin henüz mevcut olmadığı da unutulmamalıdır (Olive ve Bean, 1999; Busch ve Nitschko, 1999).

Günümüzde mikroorganizmaların moleküler tiplendirimi için başarıyla uygulanmakta olan pek çok teknik bulunmakta, her geçen gün de yenileri geliştirilmektedir. Tiplendirme sistemleri genel olarak iki alt gruba ayrılabilir: Fenotipik ve genotipik teknikler. Fenotipik teknikler bakteri tarafından ifade edilen özelliklerin saptanması için tasarlanmıştır, genotipik teknikler ise DNA düzeyine inmektedir. Klasik fenotiplendirme yöntemlerinden bazıları biyotiplendirme, serotiplendirme, lizotiplendirme, antibiyotik direnci testi, elektroforetik protein ayırımı, immünoblotlama ve multilokus enzim elektroforezidir. Klasik fenotipik yöntemler, genellikle tatmin edici bir sonuç almaya elverişli değildir. Bu nedenle DNA düzeyindeki farklılıkları saptamak için genotipik tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır; örneğin ribo-standardizasyon, plazmit profil analizi, restriksiyon endonükleaz analizi, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve PFGE (“pulsed-field” jel elektroforezi). Bu yöntemler mikroorganizmaların tiplendirilmesinde daha doyurucu sonuçlar vermektedir (Busch ve Nitschko, 1999).

Geçtiğimiz yıllarda birçok DNA parmak izi çıkarma yöntemi (“fingerprinting”) geliştirilmiştir. Genotipik parmak izi tekniklerinin ilk nesli bakteriyel hücrelerin tüm genomlarının restriksiyon fragman analizine dayanmaktadır. Agaroz jel elektroforezi ile ayırım sonrasında karmaşık restriksiyon motifleri elde edilmektedir. Ek olarak DNA, Southern Blot ile bir membrana aktarılabilen ve rRNA (ribozomal ribonükleik asit) genlerine özgü işaretlenmiş problemlerle hibridize edilebilmektedir. Bu yöntem “ribotyping” olarak adlandırılır. PCR’ın geliştirilmesi, ikinci nesil DNA “fingerprinting” yöntemlerine öncülük etmiştir. Bunlar belirli DNA bölgelerinin çoğaltılmasına dayanan tekniklerdir. RAPD-PCR (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PCR), REP-PCR (“repetitive extragenic palindromic-PCR”), ERIC-PCR (“enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR”), AFLP (çoğaltılmış fragman uzunluğu polimorfizmi) ve ARDRA (çoğaltılmış ribozomal DNA fragman uzunluğu polimorfizmi) bu nitelikteki tekniklerin arasında yer alır (Pukall ve ark., 1998).

Günümüzde kullanılan moleküler filogenetik teknikler; toplam DNA’nın analizine dayalı teknikler (RFLP, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi; REP-PCR, AFLP, PFGE, RAPD, DNA-DNA hibridizasyonu, DNA amplifikasyonuna dayalı parmak izi çıkarma, mikrosatellit analizi) ve hedeflenmiş DNA dizilerinin

analizine dayalı teknikler (DNA dizi analizi, RFLP, PCR-RFLP, DGGE (denatüre edici gradyan jel elektroforezi), ARDRA, ITS (transkribe olan genler arası aralayıcı) polimorfizmleri, PCR polimorfizmleri, özgül probaların hibridizasyonu, plazmit profilleri; FISH, floresan *in situ* hibridizasyon) olarak iki ana sınıfta toplanabilir (Morris ve ark., 2002).

Kalıtımda bir organizmanın özellikleri nesilden nesile korunmaktadır. Çünkü kromozom her bir hücre bölünmesinde aslına sadık kalarak bir kopyasını oluşturmaktadır. Ancak, çok uzun evrimsel süreçler sırasında yeni nükleotit dizileri ve böylece yeni organizmalar, daha önce var olanlardan türemektedir. Bu nedenle kromozom sadece bir organizmanın taslağını içeren bir yapı olmakla kalmayıp, aynı zamanda farklı organizmalardan elde edilen diziler karşılaştırıldığında açığa çıkabilecek olan tarih ve gelişimin ayrıntılarını içermektedir. Bu nedenle organizmalar kromozomlarındaki eşsiz nükleotit dizilerine göre sınıflandırılmaktadır (Singleton, 2004).

Bir bakteriyel türün kromozomal DNA'sındaki doğal genetik çeşitlilik, moleküler tiplendirme sistemlerinin ilişkili olmayan suşları ayırt edebilmesinin temel dayanağını oluşturur. Çeşitlilik arttıkça ilişkisiz suşların herhangi bir genotipik yöntem kullanılarak ayrılmasındaki problemler azalmaktadır. Yüksek derecede hassas moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle, PCR veya PFGE kullanılarak bir tür içerisindeki küçük değişiklikleri bile güvenilir şekilde saptamak olasıdır (Busch ve Nitschko, 1999).

Yüksek derecede çeşitliliğe sahip olan örneklerde, parmak izi teknikleri kullanılırken ayırım gücü (rezolüsyon) sorunları ile karşılaşılabilir. Ancak ya işlevsel genler ya da yaygın genlerin özgül parçaları kullanılarak, popülasyonun hedeflenen belirli bir parçasındaki profiller çözülebilmektedir (Dahllöf, 2002).

Bakteriyel çeşitliliğin saptanması için kullanılan moleküler süreçlerin çoğunda örnekten DNA'nın özütlenmesi ve saflaştırılması ilk adımdır. Toplam DNA, bakteriyel topluluklardaki özgün genlerin baskınlığını araştırmak ve toprağın

bakteriyel dağılım üzerine fiziko-kimyasal etkisini çalışmak için kullanılabilir. Yaşayan tüm organizmalar, hem yakın akrabalarından hem de ilişkisiz türlerden farklılıklar gösteren DNA molekülleri taşımaktadır. Bu nedenle toprakta bulunan DNA, doğrudan özütlenbilirse, araştırmacı tüm toprak mikrobiyal popülasyonu hakkında bilgi sahibi olabilir (Dubey ve ark., 2006).

Mikrobiyal çeşitliliği araştırmaya yönelik yöntemlerin çoğu 16S rRNA geninin analizine dayanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yaklaşımda çevre kökenli örneklerden izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak 16S rRNA gen dizilimi PCR ile çoğaltılmakta ve çeşitli yöntemlerle analiz edilmektedir. Hedef dizinin PCR ile çoğaltılmasına dayanan bu yöntemler, primerlerin tasarlanmasına imkan verecek korunmuş dizileri olan herhangi bir gen için modifiye edilerek tasarlanabilir (Rondon ve ark., 1999).

16S rRNA'lar mikroorganizmalar için değerli filogenetik belirteçlerdir. Çünkü evrensel olarak dağılmışlardır ve işlevleri sabit olup, dizilimlerinin belirli pozisyonları farklı oranlarda değişkenlik gösterir. Bu durum, 16S rRNA genini, dizi analizi, "ribotyping", restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizi ve oligonükleotit probalar ile hibridizasyon gibi, tümü mikroorganizmaların tanımlanması ve tiplendirilmesi için uygun pek çok yöntem için hedef kılmaktadır (Weidner ve ark., 1996).

Günümüzde topluluk analizi için 16S rDNA (ribozomal DNA) veya rRNA'nın kullanımı en yaygın yaklaşımdır. 16S'in filogenetik özelliklerinin ve çok sayıda bilinen dizinin var olmasının kayda değer bir avantaj sunduğu açıktır, ancak dezavantajları da vardır. Örneğin, 16S'in bir tür içerisindeki çoklu kopyalarındaki heterojenlik profil analizini engellemekte ve bant profillerinden elde edilen dizilerin ve klon kütüphanelerinin farklılığının yorumlanmasında karışıklık yaratabilmektedir. 16S heterojenliğinin boyutu farklı bölgeler arasında değişkenlik göstermektedir. Ayrıca 16S'in tür düzeyinde, örneğin *Bacillus*'ta, ayırım gücünden yoksun olduğu gösterilmiştir. Aksine, 16S'in ayırım gücünden yoksun olduğu durumlarda, "ribozomal intergenic spacer analizinde (RISA)" kullanılan, farklı rRNA alt üniteleri arasındaki bölge, "internal transcribed spacer (ITS)"nin yakın ilişkili suşlar arasında

ayırım sağlayabildiği gösterilmiştir. Ancak bir türün ITS bölgeleri içinde de dizi ve büyüklük açısından heterojenlik olduğuna dair kanıt bulunmaktadır (Dahllöf, 2002).

Mikrobiyal çeşitlilik ve topluluk analizi çalışmaları DNA dizi analizinin icat edilmesiyle büyük bir sıçrama yapmış, bu da mikrobiyal filogeni anlayışını bütünüyle değiştirmiştir. DNA analizi şu an standart yaklaşımdır ve pek çok çalışma 16S rRNA genine odaklanmıştır. Bu çalışmaların çoğunda PCR ile çoğaltım sonrasında elde edilen rRNA genlerinin dizilerinin analizi yapılmaktadır. Diğer bir yaklaşım ise, doğrudan çevre kökenli örneklerden elde edilen DNA'dan klonlanan rRNA gen dizilimlerinin analizidir (Dahllöf, 2002; Ranjard ve ark., 2000).

Moleküler tekniklerin geliştirilmesi, rRNA geni (rDNA) veya rRNA'nın kendisini kullanan topluluk çeşitliliği araştırmalarını yaygınlaştırmıştır. İnternet aracılığı ile erişilebilen hızla büyüyen rDNA dizisi veri bankası günümüzde dünyanın her yerinden dizileri karşılaştırmayı olası kılmaktadır. Kısaca; bir topluluktan elde edilen izolatlar *in situ* yöntemler kullanılarak doğrudan analiz edilebilmekte veya "microarray" ya da dot-blot hibridizasyonu için nükleik asit izole edilebilmektedir. Ayrıca ilgilenilen bir gen, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılabilmekte ve motif analizi, klonlama ve dizi analizi, prob hibridizasyonu ve "microarray"ler gibi çeşitli teknikler kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Elde edilen bilgilerin artmasına karşın, gerek yorumlama gerekse verilerden yola çıkarak sonuca ulaşma aşamalarında karmaşa olabilmektedir (Dahllöf, 2002).

Toprak bakteriyel topluluk analizinde DNA topraktan izole edildikten sonraki basamak, rRNA kodlayan genlerin (rDNA) toplam nükleik asitten izole edilmesidir. DNA'nın PCR aracılığı ile çoğaltımı, özgün mikroorganizmaların, özütlenen nükleik asitlerden hareketle saptanmasında en kullanışlı araç olarak ortaya çıkmaktadır. DNA'nın özgün parçasını çoğaltmak amacıyla, istenen mikroorganizmalar için özgül bir primer seti tasarlanmaktadır. Yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle PCR güçlü bir tekniktir (Dubey ve ark., 2006).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 1988'de Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. PCR, bir DNA kaynağı içinde bulunan tanımlanmış hedef DNA dizilerinin çoğaltılması için hızlı bir *in vitro* yöntemdir. Bu yöntem tüm genomik DNA veya karmaşık bir cDNA (eşlenik DNA) popülasyonu gibi heterojen bir DNA dizi kolleksiyonu içindeki özgün DNA dizi/dizilerinin seçici olarak çoğaltılmasını sağlamak üzere tasarlanmıştır. PCR'da başlangıç materyali çift iplikli bir DNA'dır. Böylesi bir seçici çoğaltımı sağlamak için, hedef DNA dizileri hakkında önceden az da olsa bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Bu dizi bilgisi kullanılarak hedef diziyeye özgül, genellikle 15-25 nükleotitlik iki oligonükleotit primeri tasarlanmaktadır. Primerler denatüre edilmiş kalıp DNA'nın üzerine gönderildiğinde hedef bölgedeki komplementer DNA dizilerine özgül olarak bağlanmaktadır. Sıcaklık-kararlılığı olan uygun bir DNA polimeraz ve DNA öncüllerinin (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) varlığında, primerler hedef DNA parçasının tek ipliklerine komplementer olan yeni DNA ipliklerinin sentezini başlatmaktadır. Bu reaksiyonlarda kullanılan sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimleri, 75 °C civarındaki kaplıcalarda yaşayan *Thermus aquaticus* gibi bakterilerden elde edilmektedir. Bu polimeraz enzimleri, çift iplikli DNA'yı ayırmak için kullanılan yüksek sıcaklıklarda bile kararludur (Strachan ve Read, 1999; Lodish ve ark., 1999; Cooper, 2000).

Reaksiyon DNA kalıbının yüksek bir sıcaklığa ısıtılması ile başlamakta, denatürasyon sıcaklığına ulaşıldığında çift iplikli DNA açılmakta ve daha sonra bağlanma sıcaklığına değin soğutma aşamasında primerler hedef DNA üzerinde komplementer oldukları bölgelere bağlanmaktadır. Sentez aşamasında DNA polimeraz her bir kalıba komplementer yeni bir iplik sentezlemek için bu primerleri kullanmaktadır. DNA polimeraz enzimi her bir primeri dNTP'lerin polimerizasyonu ile 3' ucundan uzatmaktadır. Böylece bir çoğalma döngüsünde, bir kalıp molekülden iki yeni DNA molekülü sentezlenmektedir. PCR zincirleme bir reaksiyondur, çünkü yeni sentezlenen DNA iplikleri sonraki döngülerde daha fazla DNA sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılmaktadır. Yaklaşık 25 döngülük bir DNA sentezi sonrasında özgül hedef dizinin yaklaşık  $10^5$  kopyası çoğalacaktır ve bu da agaroz jel elektroforezinde özgül bir büyüklükte belirgin tek bir bant olarak görülecektir (Strachan ve Read, 1999; Lodish ve ark., 1999; Cooper, 2000).

Moleküler tekniklerin bakteriyel topluluk yapısının analizine uygulanması, mikrobiyal çeşitliliği daha sağlıklı ve kesin bir düzeyde anlama yeteneğimizi arttırmıştır. Bu teknikler topraktaki özgün bakteri tiplerinin bolluğunu tarif etmede yardımcı olmaktadır. Günümüzde PCR yöntemleri kullanılarak özgün işlevlere sahip bakterilerin varlığını ve baskınlığını saptamak olasıdır. Bu tür toprak örnekleri daha ileri kullanım için önemli bakteriyel suşların veya genlerin izolasyonu amacıyla kullanılabilir (Dubey ve ark., 2006). PCR temelli moleküler teknikler kültür-temelli metotların sınırlamalarının üstesinden gelmek için kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2004). PCR temelli tiplendirme yöntemleri evrensel olarak uygulanabilirlikleri, basit ve hızlı olmaları nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler (Vandamme ve ark., 1996).

16S rDNA'yı hedefleyen PCR prokaryot çeşitliliğini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmakta olup, hem prokaryotların tanımlanmasına hem de filogenetik ilişkilerin öngörülmesine izin vermektedir. Başlangıçta ekolojik çalışmalar için kullanılan moleküler temelli metotlar, çevresel örneklerden izole edilen hedef genlerin klonlanmasını temel almaktadır. Dizi analizinin rutin hale gelmesine karşın binlerce klonun dizi analizi güç ve pahalı bir uğraştır. Bu nedenle mikrobiyal topluluk çeşitliliğini değerlendirmek için pek çok başka teknik geliştirilmiştir. Bu metotlarda, DNA çevresel örnekten özütlenmekte ve saflaştırılmaktadır. Hedef DNA evrensel veya özgün primerler kullanılarak çoğaltılmakta ve oluşan ürünler farklı yollarla ayrılmaktadır (Kirk ve ark., 2004).

Probların PCR ürünlerine hibridizasyonu yoluyla veya prob bağlı PCR ürünlerinin mikroarraylere hibridizasyonu yoluyla çeşitlilik analizi; grup veya tür düzeyinde tanımlamanın, daha ileri dizi analizi olmaksızın doğrudan yapılabildiği tekniklerdir. "Microarray"ler için rapor edilen duyarlılık düzeyi jeller için var olandan daha yüksektir. "Mikroarray"lerin bir alternatifi prob bağlı bilyelerin "flow sitometri" ile birleştirildiği bir yöntemdir, bu yöntemde proba özgü bir floresan ile işaretlenen bilyeler kullanılmaktadır. Hibridizasyon ve "microarray"lerde dezavantajı yalnızca aranılanın bulunabilmesidir (Dahllöf, 2002).

Prokaryotların çeşitliliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan primerlerin seçimi önemlidir. İdeal olan, kullanılan primerlerin tüm öbakteriler ve arkeaların SSU (küçük alt birim)-rRNA genlerine eşlenik olmasıdır. Evrensel olarak adlandırılan bu primerlerin yaygın kullanımına karşın, bunlar evrensel olmaktan çok uzaktır. Primerlerin evrenselliğini arttırmak amacıyla dejenere primerler (dizi içerisinde belirli bir konumda birden fazla nükleotide sahip olan primerler) veya belirli bir pozisyonda inozin (DNA'da bulunan dört nükleotitin tamamıyla baz çifti yapabilmektedir) içeren primerler kullanılabilir. Ek olarak, tutunma sıcaklığı ve PCR için kullanılan reaksiyon karışımlarının bileşimi aynı sonuca ulaşmak için uyarlanabilir. Bu değişkenler evrenselliği artırma çabasıyla ayarlanırken özgüllükte azalma söz konusu olabilmekte, böylece hedef olmayan diziler de çoğaltılabilmektedir (Forney ve ark., 2004).

Peki, neden pek çok evrensel primer gerçekte çok evrensel değildir? SSU (küçük alt birim) genlerinin dizilerinde korunmuş bölgeler bulunmasına karşın, korunmuş bölgelerin dizileri bile ıraksaktır. Sonuç olarak; evrensel primerlerin tam olarak tanımlanamamasının nedeni, rRNA gen dizilerindeki heterojenliktir. Ek olarak, bilinen dizilerin sayısı arttıkça araştırmacılar, çok daha küçük bir veri seti kullanılarak geliştirilmiş olan primerlerin özgüllüğünü ve işe yararlığını yeniden değerlendirmelidir (Forney ve ark., 2004).

Teknik kısıtlamaları ve sorunlarına rağmen doğal topluluklardan elde edilen SSU rRNA genlerini hedefleyen çeşitli yaklaşımların, mikrobiyal toplulukların yapısını tarif etmek için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu tip bir yaklaşım olan klon kütüphanelerinin kurulması ve analizi, toplulukların bireyleri hakkında detaylı filogenetik bilgi sağlamaktadır. Ancak bu yaklaşım, çok sayıda klon kütüphanesinin analizi için gerekli olan zaman ve maliyet nedeniyle, genellikle çok sayıda örneğin analizi için pek uygun değildir. Topluluk yapısındaki uzaysal ve zamansal değişiklikleri, prokaryotların biyocoğrafyasını veya topluluk yapısının çeşitli düzensizliklere karşı cevap olarak nasıl değiştiğini anlamayı hedefleyen çalışmalar için çok sayıda örneğin analiz edilebilme olanağı ise kritiktir (Forney ve ark., 2004).

T-RFLP (“terminal restriction fragment polymorphism analysis”), ARDRA (“amplified rDNA restriction analysis”), RAPD (“randomly amplified polymorphic DNA”), DGGE (“denaturing gradient gel electrophoresis”), TGGE (“temperature gradient gel electrophoresis”), SSCP (“single strand conformation polymorphism”) ve RISA/IGS (“ribozomal intergenic spacer analysis”) gibi PCR temelli parmak izi tekniklerinin ayırım gücü yüksek olup, topraktaki tüm mikrobiyal topluluk yapısındaki değişiklikler hakkında bilgi sağlamaktadır (Dubey ve ark., 2006).

ARDRA ve RFLP gibi yüksek çözünürlüklü yöntemler mikrobiyal topluluklardaki özgül popülasyonları izlemek ve bakteriyel izolatlar ile klonlanmış genlerin çeşitliliğini belirlemek için uygundur. Ancak karmaşık mikrobiyal topluluklardan elde edilen toplam DNA’nın bilgi içeriği, yüksek çözünürlüklü metotlar aracılığıyla doğrudan analiz edilebilmek için çok fazladır (Torsvik ve ark., 1998).

Moleküler tekniklerin geliştirilmesine daha uygun bir zemin sağlamak için olduğu kadar, yapı ve işlevin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için de mikroorganizmaların kültüre alınabilmesi gerekmektedir (Dahllöf, 2002).

## **1.1. MOLEKÜLER TİPLENDİRME TEKNİKLERİ**

### **1.1.1. ARDRA (Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi)**

Tekniğin ilk tanımlaması Vaneechoutte ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Rodas ve ark., 2003). PCR temelli DNA tiplendirme yöntemi restriksiyon enzimi analizi ile birleştirilerek ARDRA yöntemi geliştirilmiştir. PCR aracılığı ile üretilen rDNA fragmanları sonraki basamakta restriksiyon enzimlerinin seçilmiş bir kombinasyonu ile sindirilmektedir (Vandamme ve ark., 1996). Elde edilen fragmanlar agaroz veya poliakrilamit jelde ayrılmakta ve bant profilleri yorumlanarak gruplanmaktadır (Torsvik ve ark., 1998; Moffet ve ark., 2000).

Restriksiyon endonükleazları bakterilerde yabancı DNA girişine karşı bir savunma sağlamaktadır. Bakteriler, DNA'yı her birisi 4-8 baz çiftlik özgül bir diziden oluşan yüzden fazla farklı tanıma bölgelerinden kesebilen çeşitli restriksiyon endonükleazlarına sahiptir. Restriksiyon endonükleazlarının özgül bölgeleri tanıma ve kesim yapabilme yetenekleri pek çok moleküler tiplendirme yöntemine temel sağlamıştır (Cooper, 2000).

ARDRA, toprak bakterilerinin topluluk düzeyinde güvenilir genotipik karakterizasyonunu yüksek bir ayırım gücüyle sağlayan hassas bir tekniktir. Bu teknik, çeşitli örneklerin topluluk yapısını belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Dubey ve ark., 2006).

Günümüzde moleküler yöntemlerin mikroorganizmaların tanımlanması için kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. 16S rRNA geni analizi filogeni çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmakta olup, geniş çeşitlilikteki ortamlarda bakteriyel topluluk analizi için başarılı şekilde kullanılan ARDRA, 16S rRNA geni analiz yöntemleri arasında yer almaktadır. 16S rDNA nükleotit dizilerini temel alan filogenetik yaklaşım, izolatların tür veya daha yüksek düzeylerde sınıflandırılması için uygulanabilmektedir. ARDRA tekniği farklı habitatlardan elde edilen, kültüre alınabilen veya alınamayan organizmaların geniş setlerinin filogenetik ve taksonomik çalışmaları için değerli ve güvenilir bir tekniktir (Pukall ve ark.; Lagacé ve ark., 2004).

ARDRA'nın avantajları; hızlı ve basit olması, amplifiye edilen rDNA fragmanlarına ait dizi bilgisi gerektirmemesi, tekrarlanabilirliği, mikrobiyal çeşitlilikle ilişkilendirilebilmesi ve kültüre bağlı metotlarla karşılaştırıldığında mikrobiyal topluluklar üzerine daha fazla bilgi sağlamasıdır (Ziemer ve ark., 2004; Weidner ve ark., 1996). ARDRA daha çok türe-özgü profiller üretir, bu da rRNA genlerinin tür düzeyinde korunmuş karakteri düşünüldüğünde şaşırtıcı değildir (Vandamme ve ark., 1996).

ARDRA kullanılarak çok sayıda örnek hızla incelenebilmektedir. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin sayısı veya 16S rDNA amplikonunun uzunluğu arttırılarak daha iyi bir ayırım elde edilebilmektedir. Restriksiyon kesimlerinin sayısındaki artışın getireceği yük, iş ilerledikçe benzersiz profillere sahip klonların, daha ileri inceleme gerektirmemesi nedeniyle azalmaktadır (Moffet ve ark., 2000).

Chèneby ve arkadaşlarının (2000) çalışmalarında da belirtildiği üzere geçtiğimiz on yıl boyunca, 16S rDNA'yı kodlayan genlerin moleküler belirteçler olarak kullanımı mikrobiyal ekolojistler için rutin bir teknik haline gelmiştir. Ribozomal DNA dizi bilgisi sadece mikrobiyal filogeninin daha iyi bir şekilde kavranmasını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda çevresel örneklerdeki bakterilerin tanımlanmasını da kolaylaştırmaktadır. Bu çalışmada, bakteriyel örneklerin tanımlanması ve sınıflandırılması için 16S rDNA'nın dizi analizi ve restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi başarılı şekilde uygulanmıştır.

Pukall ve arkadaşları 1998'de yaptıkları çalışmada floresan işaretli bir 16S rDNA'nın otomatize edilmiş ARDRA analizini tarif etmişlerdir. 16S rDNA'nın eşit miktarları amplifikasyon sırasında üç farklı dUTP ile işaretlenmiş ve her bir 16S rDNA tek bir restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. Üç restriksiyon enzimi ile analizlerin tümünden elde edilen fragmanların bileşimi, otomatize edilmiş bir DNA dizi analizi jelinin tek bir kolonuna yüklenmiştir. Yakın geçmişte, restriksiyon enzimlerinin floresan işaretli DNA'yı kesme yeteneği ile ilgili çok az şey bilinmekteydi. Floresan işaretli oligonükleotitlerin restriksiyon enzimleri ile hafifçe azalmış oranda kesilebildiği rapor edilmiştir. Diğer metotlarla karşılaştırıldığında floresan işaretli PCR ürünleri kullanarak otomatize edilmiş DNA parmak izi analizinin en büyük avantajı daha yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır. dUTP'lerin amplifiye olan DNA'ya doğrudan katılması, floresan moleküllerin DNA'ya daha yüksek oranda katılması avantajını beraberinde getirmektedir. Bu yöntem ile elde edilen ayırım normal ARDRA metotlarından çok daha iyidir.

Kesim reaksiyonunda aynı anda iki enzim yerine her bir enzimin tek tek kullanılması daha doğru sonuçlar vermektedir. Çift kesimde ortaya çıkan küçük bantların jelde saptanması zordur; ve çift kesimde hangi bandın hangi enzimden

geldiğini ayırmak mümkün değildir. ARDRA ile elde edilen motiflerin görsel analizi çok zaman almakta ve artan motif sayıları ile de imkansızlaşmaktadır. Uygun bir yazılım yardımıyla benzer ARDRA motiflerinin gruplandırılması otomatize edilebilmekte ve motiflerin benzerliği hesaplanabilmektedir. Kullanılan programlar ayrıca ARDRA motiflerinin büyüyen bir veri tabanının üretimine de izin vermektedir. Bu daha sonraki karşılaştırmalı çalışmalar için gereklidir (Weidner ve ark., 1996).

Bu metodun bir sınırlaması, çok yüksek bir 16S rDNA homolojisi taşıyan soylar arasında ayırım yapamamasıdır. Yüksek 16S homolojilerine karşın bazı soylar DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları temel alındığında farklı soylardır. ARDRA tekniği kullanılarak alttür düzeyinde ayırım sağlamak zordur (Rodas ve ark., 2003).

### **1.1.2. Ribotyping**

DNA parmak izi çıkarma restriksiyon enzimi analizi olarak da adlandırılmaktadır. Orijinal yöntemde ilgilenilen suştan elde edilen kromozomal DNA belirli restriksiyon endonükleazları ile sindirilmekte ve elde edilen fragmanlar agaroz jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılmaktadır. Fragmanlar jel içerisinde denatüre edilmekte ve daha sonra blotlanmakta ve boyanmaktadır. Parmak izi olarak adlandırılan bant profilleri belirli bir enzim için kesim bölgelerinin sayı ve konumlanışlarını yansıtmaktadır ve belirli bir organizma için karakteristiktir. Böylece farklı organizmalar parmak izlerine göre sınıflandırılabilir. Bu orijinal yöntemin bir dezavantajı çok fazla fragman elde edilmesi ve bu nedenle karmaşık ve yorumlanması zor bir parmak izi vermesidir (Singleton, 2004).

Yorumlamada zorluk yaratan karmaşık parmak izlerinin elde edilmesi probleminin bir çözümü işaretli problemlerin kullanımıdır. Ribotyping yönteminde genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile sindirimi sonrası agaroz jel elektroforezinde elde edilen karmaşık bant profilleri bir membran üzerine aktarılmaktadır. Daha sonra membran üzerine ilgilenilen gen bölgelerini hedefleyen

işaretli problemler gönderilerek sadece problemlerin hibridize olduğu bantlar görünür hale getirilmektedir (Vandamme ve ark., 1996; Singleton, 2004).

Ribozomal RNA'yı (16S ve 23S) kodlayan gen dizileri yüksek derecede korunmuştur. rRNA genleri bakteriyel kromozom içerisinde pek çok kopya halinde bulunmaktadır. Bu nedenle rRNA'ya özgü problemlerle hibridizasyon sadece rRNA gen dizisini içeren kromozomal fragmanları açığa çıkarmaktadır. Hibridizasyon bantlarının sayısı (genellikle 7-12 arası) bant motifinin basit analizine izin verecek kadar küçüktür. Ancak bu, bu tekniğin yakın ilişkili suşlar arasındaki farkı saptayabilme yeteneğini sınırlandırmaktadır (Olive ve Bean, 1999; Busch ve Nitschko, 1999; Singleton, 2004 ).

Ayırım yapabilme yeteneği, bir yöntemin akraba olmayan iki suş arasındaki farkı saptayabilme yeteneğidir. "Ribotyping" in ayırım yapabilme yeteneği PFGE'ye göre düşük olmakla birlikte, birden fazla enzim kullanılarak ayırım gücü artırılabilir. Ribozomal RNA kodlayan genlerin sadece bir veya iki kopyasını taşıyan bakteri türleri için ribotyping elverişli bir yöntem değildir (Olive ve Bean, 1999, Busch ve Nitschko, 1999).

Grif ve arkadaşları 2003'te yaptıkları araştırmada, tehlikeli bakteriyel patojenleri saptamak için otomatize edilmiş rRNA operon ribotyping tekniğini kullanmışlardır. Bu çalışma tek bir restriksiyon enzimi ile oluşturulan riboprint profillerinin test edilen her bir tür için her zaman eşsiz olmadığına altını çizmektedir. Ribotyping için kullanılacak restriksiyon enzimlerinin seçimi kritiktir ve tek enzim kullanımı yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle birden fazla enzim kullanımı ile daha iyi bir ayırım gücü sağlanabilmektedir (Meays ve ark., 2004).

"Ribotyping" dizi analizi içermez. Bunun yerine belirli bir organizmadan elde edilen DNA'nın restriksiyon enzimi kesimine tabi tutulması ve fragmanların ayrılmasının ardından belirli bir bölgeye yönelik (örneğin ribozomal RNA genleri) prob ile hibridize edilmesi sonrasında elde edilen benzersiz deseni belirler.

“Ribotyping” bakteriyel tanımlama için hem hızlı hem de özgül bir yöntemdir (Meays ve ark., 2004).

Nükleik asit hibridizasyonu, tek iplikli nükleik asit moleküllerinin çift iplikli moleküller oluşturabilme yeteneğinden yararlanmaktadır. Bunun olabilmesi için birbirleri ile etkileşen DNA molekülleri yeterli derecede baz tamamlayıcılığına sahip olmalıdır. Standart nükleik asit hibridizasyon denemeleri, işaretlenmemiş nükleik asit moleküllerinin karmaşık bir karışımının içinde ilgili DNA veya RNA moleküllerini tanımlamak için işaretli bir nükleik asit probunun kullanımını kapsamaktadır (Strachan ve Read, 1999).

Kalsik radyo-işaretleme yönteminde tek iplikli oligonükleotitler genellikle polinükleotit kinaz enzimi kullanılarak uçlarından işaretlenmektedir. Tipik olarak işaret bir ATP'nin  $\gamma$ -fosfat pozisyonundaki  $^{32}\text{P}$  şeklinde sağlanmaktadır ve polinükleotit kinaz 5'-terminal fosfatlar ile bir takas reaksiyonu katalizlemektedir. Radyo işaretli proplar genellikle  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  veya  $^3\text{H}$  radyoizotoplarından birisini içermektedir (Strachan ve Read, 1999).

### 1.1.3. DNA Dizi Analizi

Organizma alt tiplerini ayırt etmek için kullanılan tüm genetik yöntemler, sonuçta DNA dizisindeki farklılıklara dayanmaktadır. Buradan hareketle DNA dizi analizi alt tiplerin ayırt edilmesinde en iyi yaklaşım olarak görünse de, gerçekte durum böyle değildir (Olive ve Bean, 1999).

DNA dizi analizi için hızlı ve etkili yöntemler ilk olarak 1970'lerin ortalarında tasarlanmıştır. Hemen hemen aynı zamanda iki farklı süreç yayınlanmıştır. Sanger ve arkadaşlarının 1977'de yayımladığı zincir sonlandırılması yönteminde tek iplikli DNA moleküllerinin dizisi komplementer polinükleotit zincirlerinin enzimatik sentezi ile saptanmaktadır. Bu zincirler özgül nükleotit pozisyonlarında sonlanmaktadır. İkinci yöntem Maxam ve Gilbert'in 1977'de yayımladığı kimyasal

degradasyon yöntemidir. Bu yöntemde çift iplikli bir DNA molekülünün dizisi, molekülü özgül nükleotit pozisyonlarında kesen kimyasallarla muamele ile saptanmaktadır. Her iki yöntem de ilk yıllarda popüler olmakla birlikte, kimyasal degradasyon yönteminde kullanılan kimyasalların toksik olması ve insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle zincir sonlandırılması yöntemi üstünlük kazanmıştır. Bir başka neden de zincir sonlandırılması dizi analizinin, otomatizasyon için daha uygun olmasıdır (Brown, 2002).

Başlangıçta DNA dizi analizi, reaksiyon ürünlerinin saptanması için radyoaktif işaretlerin kullanımıyla gerçekleştirilmekteydi. Bu yöntemde dNTP karışımı belirli bir oranda radyoişaretli nükleotitler içermektedir ve bunlar büyüyen DNA zincirine katılmaktadır. Elektroforezi takiben jel kurutulmakta ve otoradyografik bir film kurumuş jel ile temas halinde olacak şekilde yerleştirilmektedir. Uygun bir maruziyet zamanı sonrasında film banyo edilmekte ve siyah renkli karakteristik bir bant profili elde edilmektedir.  $^{32}\text{P}$ -işaretli nükleotitler bu iş için pek uygun değildir; çünkü  $\beta$ -radyasyonun neden olduğu kayda değer sinyal saçılması diffüz bantlara yol açmaktadır. Bunun yerine  $^{35}\text{S}$ - veya  $^{33}\text{P}$ -işaretli nükleotitler tercih edilmektedir (Strachan ve Read, 1999; Olive ve Bean, 1999).

DNA dizi analizinin ilk basamağında, DNA örneğinin ilgilenilen bölgesine yönlendirilmiş bir polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilir. Daha sonra PCR ürünlerinin dizi analizi reaksiyonları yapılır. Süreç isteğe göre uyarlanabilmektedir. Örneğin, başlangıç materyali olarak RNA kullanılabilir. Yakın zamanda geliştirilmiş olan floresan işaretlemenin kullanıldığı otomatize edilmiş DNA dizi analizinde genellikle floresans yayma özelliğindeki kimyasal gruplara (floroforlar) tutturulmuş primerler veya dideoksinükleotitler kullanılmaktadır. Elektroforez sırasında DNA jel içerisinde sabit bir noktadan geçerken bir monitör floresan sinyali saptamakta ve kaydetmektedir. DNA dizi analizi cihazları genellikle dideoksinükleotit zincir sonlandırma yöntemini kullanmaktadır (Strachan ve Read, 1999; Olive ve Bean, 1999).

Zincir sonlandırılmasına dayanan DNA dizi analizi, uzunlukları sadece tek bir nükleotit kadar farklılık gösteren tek iplikli DNA moleküllerinin poliakrilamit jel

elektroforezinde ayrılabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Zicir sonlandırılması reaksiyonunda PCR ortamına dNTP'ler ile birlikte az miktarda dideoksinükleotit eklenmektedir. Polimeraz enzimi dNTP'ler ve ddNTP'ler arasında ayırım sağlayamamakta, böylece dideoksinükleotitler uzamakta olan zincire sokulabilmektedir. Ancak ddNTP'ler, sonraki nükleotit ile bağlantı kurulması için ihtiyaç duyulan 3'-hidroksil grubundan yoksundur ve bu da uzamanın durmasına neden olmaktadır (Brown, 2002)

Tüm kromozomu inceleyen PFGE, rep-PCR veya RAPD metotlarının aksine DNA dizi analizi metodu ile, mikroorganizma suşları arasında potansiyel olarak değişebilen bölgelerin oldukça küçük bir kısmı incelenebilmektedir. DNA dizi analizinin en büyük dezavantajı bir organizmanın kromozomunun sadece çok küçük bir bölgesine yönlendirilebilmesidir. Dahası, kullanılan kısa DNA bölgesinin, suşları ayırt ettirmek üzere kullanılabilmesi için birçok kritere uyması gerekmektedir. Seçilen DNA bölgesinin yapısı, yüksek derecede korunmuş bölgelerle bunları iki yanda kuşatan değişken bölgeler içermelidir. Bu, PCR ile çoğaltmayı ve bir türün tüm üyelerinin tiplendirilmesini mümkün kılmaktadır. Seçilen dizideki değişkenlik belirli bir türün farklı suşlarını ayırt etmek için yeterli olmalıdır. Son olarak, seçilen dizi türün diğer suşlarına horizontal olarak aktarılamamalıdır. 16S rRNA genleri yeni organizma türlerini tanımlamak için kullanılırken, bir bakteriyel türün suşları arasında sınırlı değişkenlik göstermektedir. Tersine, DNA dizi analizi viral tiplendirme için altın standart olarak kabul edilmektedir. ARDRA ile karşılaştırıldığında, doğrudan dizi analizi daha çok zaman gerektiren ve gerek kültüre alınabilen gerekse alınamayan bakterilerin rutin olarak tanımlanması için uygun olmayan bir yaklaşımdır (Olive ve Bean, 1999, Pukall ve ark., 1998).

16S rDNA dizi analizi bir çevre içindeki mikrobiyal türlerin çeşitliliğini belirlemek üzere ayırt ettirici gücü yüksek bir yöntemdir, ancak örneklerin rutin taramasında kullanılmak için oldukça zaman harcanan ve çok masraflı bir metottur. Örneklerin ilk analizi için kullanılacak yöntemler hızlı olmalı ve mikrobiyal ekoloji hakkında geniş bir görüş verebilmelidir. İlk analizlerden elde edilen verilerin değerlendirilmesi daha detaylı araştırmaların nereye odaklanması gerektiğini

belirleyecek ve kullanım için en uygun yöntemin saptanmasına yardımcı olacaktır (Ziemer ve ark., 2004).

#### **1.1.4. DNA-DNA Hibridizasyonu, Denatüre DNA Moleküllerinin Yeniden Bir Araya Gelmesi (“reassosiation”) ve G+C İçeriğinin Belirlenmesi**

Bakteriyel topluluklardaki toplam genetik yapı ve çeşitlilik, baz kompozisyonu ve toplam topluluk DNA’sının karmaşıklığı ölçülerek tayin edilebilmektedir. Guanin+Sitozinin mol yüzdesi (% G+C) olarak ifade edilen baz kompozisyon profilleri, DNA’nın erime eğrileri analiz edilerek saptanabilmektedir. Erime profilleri, erime eğrisinin birinci dereceden türevi hesaplanarak % G+C profillerine dönüştürülmektedir (Torsvik ve ark., 1998; Singleton, 2004).

DNA’nın G+C içeriğindeki farklılıklar toprak topluluklarının bakteriyel çeşitliliğini çalışmak için kullanılabilmektedir. Bu teknik, mikroorganizmaların G+C içeriği açısından farklılık gösterdiği ve taksonomik olarak ilişkili grupların sadece % 3-5 arası farklılık göstermekte olduğu bilgisine dayanmaktadır. Farklı taksonomik gruplar aynı G+C aralığını paylaşabileceği için, benzer değerler mutlaka yakın bir taksonomik ilişki anlamına gelmez. Ancak büyük ölçüde farklılık gösteren değerler bu tip bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. G+C analizinin avantajları, PCR ile ilgili sorunlardan etkilenmemesi, özütlenen tüm DNA’yı içermesi, kantitatif oluşu ve mikrobiyal popülasyonlardaki az rastlanan bireyleri açığa çıkarmasıdır. Ancak bu metot çok büyük miktarda DNA (50 µg’a kadar çıkabilir) gerektirmektedir (Kirk ve ark., 2004; Singleton, 2004).

G+C içeriğindeki değişiklik bakteriyel topluluktaki değişiklikleri saptamak için kullanılabilmektedir. Ancak tür sayısı (“richness”), göreceli bolluk (“evenness”) ve mikrobiyal topluluğun kompozisyonu hakkında herhangi bir bilgi sağlamamaktadır (Dubey ve ark., 2006).

Topluluk DNA'sının yeniden bir araya gelme kinetikleri ("reassociation") gibi teknikler kullanılarak toprak mikrobiyal topluluğundaki toplam genetik çeşitlilik hakkında bilgi sağlanmaktadır. Bu yaklaşım daha karmaşık denatüre DNA'nın, daha az karmaşık denatüre DNA'ya göreceli olarak daha yavaş şekilde bir araya geldiği ve yeniden bir araya gelme kinetiklerinin genomik karmaşıklık ile orantılı olduğu varsayımına dayanmaktadır. Bu tekniğin temel kısıtlaması yüksek miktarda DNA'ya olan gereksinimdir; çünkü toprak örneğinden yüksek miktarda DNA elde etmek teknik olarak zordur. DNA-DNA hibridizasyonu iki mikrobiyal topluluğu karşılaştırmada oldukça iyi bir araçtır (Dubey ve ark., 2006).

Denatüre edilen DNA'nın moleküllerini yeniden bir araya gelmesi ("reassociation") mikrobiyal topluluğun genetik karmaşıklığının bir ölçütüdür ve çeşitliliği öngörmek için kullanılmaktadır. Çevre kökenli örneklerden toplam DNA özütlenir, saflaştırılır, denatüre edilir ve yeniden birleşmelerine izin verilir. Hibridizasyon veya yeniden bir araya gelmenin oranı var olan dizilerin benzerliklerine bağlı olacaktır. DNA dizilerinin karmaşıklığı veya çeşitliliği arttıkça DNA'nın yeniden bir araya gelme oranı azalacaktır. Belirli koşullar altında DNA'nın yarısının yeniden bir araya gelmesi için gerekli olan zaman bir çeşitlilik indeksi olarak kullanılabilir, çünkü DNA'nın yeniden bir araya gelme miktarını ve dağılımını hesaba katmaktadır. Alternatif olarak, iki farklı örneğin toplulukları arasındaki benzerlik, DNA'nın benzerlik derecesinin hibridizasyon kinetikleri yoluyla ölçülmesi ile belirlenebilmektedir (Kirk ve ark., 2004).

DNA-DNA hibridizasyonu yöntemi tür düzeyindeki ilişkileri araştırmak için kullanışlıdır. DNA'ları % 70'ten fazla kararlı hibridizasyon gösteren organizmalar aynı tür olarak sınıflandırılmaktadır (Singleton, 2004). Her bir % 1'lik baz uyumsuzluğu için termal kararlılığın % 1-2,2 arasında düştüğü tespit edilmiştir (Vandamme ve ark., 1996).

DNA-DNA hibridizasyonu ve diğer dizi temelli yöntemler ile elde edilen sonuçlar geleneksel sınıflandırmadan belirgin derecede farklı olabilmektedir. Bunun nedeni, geleneksel sınıflandırmada organizmaların çoğunlukla sınırlı bir sayıdaki fenotipik özelliklere, örneğin enzimler, hücre düzeyindeki yapı, hareketlilik ve

metabolik ürünler gibi, dayanarak karşılaştırılmasıdır. Buna karşın, DNA-DNA hibridizasyonu tüm kromozomu incelemekte, fenotipik özellikleri kodlayan dizileri ve kromozom üzerinde olup da fenotipik olarak ifade edilmeyen çeşitli dizileri karşılaştırmaktadır. Bu nedenle, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında DNA-DNA hibridizasyonu organizmaları daha geniş bir temelde karşılaştırmaktadır (Singleton, 2004).

Hibridizasyon teknikleri özütlenmiş DNA veya RNA ile ya da *in situ* olarak uygulanabilmektedir. Bilinen dizilerden tasarlanan oligonükleotit veya polinükleotit problemler 5' uçta belirteçlerle etiketlenebilir. Floresan belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kantitatif dot-blot hibridizasyonu belirli bir grup mikroorganizmanın göreceli bolluğunu ölçmek için kullanılmaktadır. Örnek tüm nükleik asitleri serbestlemek için lizise uğratılmaktadır. İlgilenilen rRNA dizilerinin miktarı, toplam rRNA ya göreceli olarak özgül ve evrensel oligonükleotit primerleri ile dot-blot hibridizasyonu ile belirlenmektedir. Göreceli bolluk, popülasyondaki bolluktaki değişiklikleri veya aktivitedeki ve dolayısıyla rRNA içeriğinin miktarındaki değişiklikleri gösterebilmektedir. Hibridizasyon ayrıca hücresel düzeyde de yürütülebilmekte ve *in situ* yapılabilmektedir. Geleneksel olarak radyoaktif izotoplar kullanılırken, günümüzde floresan işaretli problemler tercih edilmektedir. Bu yöntem FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) olarak bilinmektedir (Kirk ve ark., 2004).

### 1.1.5. PFGE

DNA parmak izi tekniği yaklaşımında sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırmak amacıyla DNA fragmanlarının sayısı; 6-8 bazlık özgül bir baz dizilimini tanıyan ve bu nedenle DNA'yı ender olarak kesen restriksiyon enzimleri kullanılarak azaltılabilmektedir. Bu teknik düşük frekanslı restriksiyon fragman analizi olarak adlandırılmaktadır. Ancak, bu yöntemle elde edilen fragmanlar geleneksel jel elektroforezi ile ayıramayacak kadar büyüktür. Agaroz jelin uygulanabilirliği 50 kilobaz çiftinden küçük moleküllerle sınırlıdır, çünkü elektroforetik mobilite (hareket yeteneği) moleküler büyüklükten gittikçe bağımsız

hale gelmektedir. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için PFGE tekniği geliştirilmiştir (Rodas ve ark., 2003; Busch ve Nitschko, 1999).

PFGE moleküler tiplendirme metotlarının “altın standardı” olarak kabul edilmektedir. Bu metotta bakteriyel izolatlar eriyik agaroz ile karıştırılarak kalıplara dökülmektedir. Gömülmüş olan bakteriler daha sonra *in situ* deterjan-enzim lizisine ve seyrek olarak kesim yapan bir restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulmaktadır. Elde edilen parçalar agaroz jele sokularak akımın polaritesinin önceden belirlenen aralıklarla değiştirildiği bir cihazda elektroforeze tabi tutulmaktadır. Bu değişiklik küçük fragmanlara büyük fragmanların aksine daha hızlı bir yönelim sağlamaktadır; bu nedenle küçük fragmanlar büyük olanlardan daha hızlı göç etmektedir ve DNA fragmanları verimli bir şekilde ayrılmaktadır. Elektroforetik profiller jellerin etidyum bromür gibi floresan bir boya ile boyanması sonrası görünür hale gelmektedir (Olive ve Bean, 1999; Busch ve Nitschko, 1999).

PFGE 10-800 kb arasında değişen çok büyük moleküler uzunluğa sahip DNA fragmanlarının net ayrımını mümkün kılmaktadır. PFGE’nin rutin olarak kullanımını sınırlandıran faktörlerden birisi protokolü tamamlamak için gerekli olan sürenin 2-3 gün olabilmesidir. Bu da laboratuvarın çok sayıda örneği analiz etme yeteneğini azaltmaktadır (Olive ve Bean, 1999; Singleton, 2004).

#### **1.1.6. Southern Blot (SB)**

Gen saptanması için, tüm kromozomal DNA bir restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulmaktadır ve oluşan fragmanlar bir agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Ayrılan DNA fragmanları agaroz jelden bir nitroselüloz veya naylon membrana transfer edilir. Membrana bağlı nükleik asitler daha sonra, incelenen gene homolog bir veya daha fazla işaretli prob ile hibritlenir. Problar enzim-kolorimetrik substratlar veya enzim-kemilüminesans substratlar ile işaretlenebilir (Olive ve Bean, 1999).

### 1.1.7. RFLP

Bakteri suşlarının, ilgilenilen belirli bir genetik lokus içindeki çeşitli restriksiyon enzimi tanıma bölgelerinin suştan suşa polimorfik olabilecekleri varsayımına dayanarak ayırt edilmesi için “Southern Blot” tekniğinin adapte edilmesi ile restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) tekniği geliştirilmiştir. Yaygın olarak tercih edilen bu yaklaşımda, kromozomal DNA restriksiyon endonükleazlar ile kesime uğratılmakta ve oluşan fragmanlar agaroz jel elektroforezi ile ayrılmaktadır (Olive ve Bean, 1999).

Restriksiyon endonükleazlar DNA’yı özgün bir tanıma bölgesinin içindeki veya yakınındaki tanımlanmış bir pozisyonlardan kesen enzimlerdir. Restriksiyon endonükleazlar yüksek derecede özgül oldukları için belirli bir DNA’nın tamamen kesimi DNA fragmanlarının tekrarlanabilir bir profilini sağlamaktadır. Fragmanların sayısı ve büyüklükleri DNA dizilimine bağlıdır. Fragmanların profillerindeki değişkenlik restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism-RFLP) olarak adlandırılmakta ve DNA’daki çok küçük bir değişiklikten (örneğin restriksiyon enzimi tanıma ve/veya kesim bölgesinde tek baz eklenmesi, çıkarılması veya yer değiştirmesi) ya da dizi yeniden düzenlenmeleri gibi büyük değişikliklerden kaynaklanabilmektedir. Tüm genomun restriksiyon enzimi kesiminin dezavantajı çok sayıda farklı fragmanların elde edilmesidir. Geleneksel jel elektroforezi ile ayırım jel üzerinde DNA’nın “smear” benzeri bir görüntü oluşturmaya ve elde edilen bant profilinin karşılaştırılamayacak kadar karmaşık bir görüntü vermesine neden olmaktadır. Bu problemle başa çıkmak için yöntem, nükleik asit problemleri ile birleştirilmiştir. Fragmanlar “Southern Blot” analizi kullanılarak ayırt edilir. Bu yöntemde genomik DNA kesime tabi tutulmakta, bir agaroz jel boyunca elektroforeze bırakılmakta, bir membrana transfer edilmekte ve özgün problemlerle hibridizasyon sonucu görünür hale getirilmektedir (Liu ve Cordes, 2004; Busch ve Nitschko, 1999).

Yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirilen PCR-RFLP metodunda, incelenecek belirli bir lokus yine özgün primerler ile çoğaltılmakta ve RFLP analizine tabi tutulmaktadır. Eğer bir lokus için iki yanda yer alan bölgeler

biliniyorsa RFLP bölgesini içeren parça PCR yoluyla çoğaltılmaktadır. Eğer uzunluk poliformizmine, göreceli olarak büyük (kesilmemiş PCR ürününün büyüklüğüne bağlı olarak yaklaşık olarak 100 bp'den büyük) bir delesyon veya insersiyon sebep oluyorsa PCR ürünlerinin jel elektroforezi, büyüklük farkını açığa çıkarmalıdır. Ancak, eğer uzunluk polimorfizmi bir restriksiyon bölgesindeki baz substitüsyonundan kaynaklanmaktaysa, PCR ürünleri RFLP yi açığa çıkarmak için bir restriksiyon enzimi ile kesilmelidir. Literatürde mevcut olan ve sayısı artan evrensel primerler ile, gözlenen çeşitliliğin miktarına ve incelenmekte olan taksonomik düzeye bağlı olarak, göreceli korunmuş veya hızlı bir şekilde değişen DNA bölgeleri hedeflenebilir. Ek olarak, PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutulabilmekte ve PCR ile çoğaltılan DNA'nın miktarı daha çok olduğundan etidyum bromür ile boyama, bantların görülmesi için yeterli olmaktadır (Olive ve Bean, 1999; Liu ve Cordes, 2004).

#### **1.1.8. AFLP**

Amplifiye edilmiş fragman uzunluğu polimorfizmi (AFLP) metodu, restriksiyon enzimi kesimi ile elde edilen DNA fragmanlarının bir alt kümesinin seçici olarak çoğaltılmasını hedefleyen bir genomik parmak izi çıkarma tekniğidir. Tekniğin benzersiz özelliği, tüm genomik DNA'nın kesimi ile üretilen DNA fragmanlarına bilinen diziye sahip adaptörlerin eklenmesidir. Bu, toplam fragmanların bir alt kümesinin, daha sonra PCR ile çoğaltımına olanak sağlamakta, bu da fragmanların jel elektroforezi ile birbirinden ayrıştırılmasını kolaylaştırmaktadır. AFLP'nin bakteriyel uygulamalarında iki farklı restriksiyon enzimi ve iki primer kullanılarak amplifikasyon veya tek bir primer ve tek bir restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon yapılabilir (Olive ve Bean, 1999; Liu ve Cordes, 2004; Vandamme ve ark., 1996; Singleton, 2004).

En yaygın uygulamada, bakteriyel DNA özütlenmekte, saflaştırılmakta ve iki farklı enzim ile kesim uygulanmaktadır. Daha sonra, primerler için hedef olarak tasarlanmış bir dizi ve her iki restriksiyon bölgesini içeren linkerlar bu restriksiyon fragmanlarına ligasyonla eklenmektedir. Amplifikasyon için kullanılan PCR

primerleri linkera homolog DNA dizileri ve 3' uçlarında bir iki tane seçici baz içermektedir. Örneğin; *EcoRI* siti için seçici primerin dizisi 5'-GAATTCAA-3'. Burada ilk altı baz *EcoRI* sitine komplementerdir, 3' ucundaki iki A rezidüsü ise seçicilik sağlamak ve sadece 3'-CTTAAGTT-5' dizisine sahip *EcoRI* sitlerinin amplifikasyonuna izin vermektedir. Böylece, seçici nükleotitler genomik restriksiyon fragmanlarının sadece bir alt kümesinin amplifikasyonuna izin vermektedir. Motifleri görüntüleyebilmek amacıyla PCR primerlerinden biri ya radyoaktif ya da floresan bir işaret içermektedir. Alternatif olarak, jeller etidyum bromür ile boyanabilmekte ve profiller UV ışığı altında incelenebilmektedir (Olive ve Bean, 1999).

Çalışmalar AFLP'nin tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. AFLP'nin ayırt ettirici özelliği PCR-tabanlı "ribotyping"den daha büyüktür. AFLP, REP-PCR'dan daha çok iş gücü gerektirmekte, ancak sonuçlar PFGE ile olandan daha hızlı elde edilmektedir (Olive ve Bean, 1999).

### 1.1.9. RAPD ve AP-PCR (arbitrarily primed PCR)

AP-PCR yönteminde, standart PCR'da kullanılanlar (18-24 bp) ile karşılaştırılabilir uzunlukta primerler kullanılmaktadır. Oysa rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) metodu, kromozomal DNA dizilerine yeterli afinite ile hibridize olan 9-10 bazlık kısa, rastgele diziye sahip primerlerin kullanımına dayanmaktadır. Her iki yöntem de küçük genomların (örneğin virüs) tanımlanması için elverişsizdir. Çünkü ürünlerin sayısı genellikle azdır. Keyfi olarak seçilen kısa primerler, kromozomlar üzerindeki rastgele ve çoklu bölgelere düşük tutunma sıcaklıklarında hibridize olabilir ve bakteriyel genom bölgelerinin çoğaltılmasını başlatmak üzere kullanılabilir. Eğer iki RAPD primeri birkaç kilobaz içerisinde birbirleriyle uygun yönelimde bağlanırsa, iki primer arasındaki uzaklığa karşı gelen moleküler uzunlukta bir PCR ürünü oluşmaktadır. Bu rastgele primer sitlerinin sayısı ve yerleşimi bir bakteriyel türün farklı suşları için değişkenlik göstermektedir. Sonuçta elde edilen DNA parmak izleri araştırılan suşların akrabalık derecesine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ancak tekrarlanabilirlik konusunda problemler tanımlanmıştır ve farklı motiflerin karşılaştırılmasında zorluklar ortaya

çıkmaktadır. Pek çok durumda ayırım için en iyi DNA motifini üreten RAPD primerlerinin dizisi deneysel olarak belirlenmektedir (Olive ve Bean, 1999; Busch ve Nitschko, 1999; Singleton, 2004).

Primerler kısa olduğu için ve reaksiyonda göreceli olarak düşük tutunma sıcaklıkları (sıklıkla 36-40°C) kullanıldığı için, çok sayıda ürünün çoğalma olasılığı yüksektir. Her bir ürün olasılıkla farklı bir lokusu temsil edecektir. İlgilenilen taksonomik üniteler arasındaki veya içindeki genetik çeşitlilik ve ıraksaklık her bir ürünün varlığı veya yokluğu (ki bu her bir lokustaki DNA dizisindeki değişiklikler tarafından belirlenmektedir) ile belirlenmektedir. RAPD polimorfizmleri primer bağlanma bölgelerindeki baz yerdeğiştirmeleri veya bağlanma bölgeleri arasındaki kısımlarda oluşan indellerden (eklenme-çıkarılma) dolayı ortaya çıkmaktadır. RAPD analizi hızlı ve elverişli olmasına karşın tekrarlanabilir değildir; *Taq* polimeraz veya tampondaki küçük değişimler bile parmak izini değiştirebilmektedir (Liu ve Cordes, 2004; Dubey ve ark., 2006).

#### 1.1.10. RISA (ITS-PCR)

16S rRNA dizileri öbakteriler arasındaki yüksek derecede korunmuş olduğu için bu bölgedeki genetik çeşitliliğin analizi türler arasında ayırımı göstermek için yeterli değildir. 16S ve 23S rDNA arasındaki intergenik ara dizilerinde daha büyük bir çeşitlilik bulunmakta olup, bu dizilerin genetik çeşitliliklerin “inter-specific” düzeyde analizi için daha kullanışlı olduğu gösterilmiştir. RISA (ribozomal intergenik dizi analizi) toprak sisteminde tür kompozisyonunun analizi için de kullanılmaktadır. Bu teknik *rrs* (16S rRNA) ve *rrl* (23S rRNA) genleri arasındaki intergenik dizinin uzunluğunun polimorfizm analizini içermektedir. Bu bölgenin büyüklüğü türe bağlı olarak 50 bp → 1,5 kb arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca ampikonların sonraki dizi analizleri bir topluluk içindeki spesifik popülasyonların taksonomik tanımlanmasına izin vermektedir (Dubey ve ark., 2006).

### 1.1.11. REP-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR

Tüm bakteri genomlarında rastgele dağılmış şekilde bulunan tekrarlayan kromozomal elemanlar (REPs) bu özgül PCR-temelli yöntemin hedefidir. Primerler tekrarlayan kromozomal eleman dizilerine bağlanmakta ve eğer bu dizi elemanları komşu primer bağlanma bölgelerine, verimli bir amplifikasyonu destekleyecek kadar yakın konumlanmışlarsa bir DNA fragmanı çoğalmaktadır. Tekrarlayan dizilerin sayı ve yerleşimleri suştan suşa değişken olduğu için farklı bir desen oluşacaktır (Busch ve Nitschko, 1999; Singleton, 2004).

Versalovic ve çalışma arkadaşları (1991), bakteriyel genomlarda mevcut olan tekrarlayan DNA elemanlarının PCR aracılığı ile çoğaltılması sonucunda elde edilen suşa özgü motiflerin incelenmesi ile, parmak izi çıkarmak üzere yeni bir yöntem tarif etmişlerdir. Bu çalışmada, tekrarlayan elemanların iki ana seti tiplendirme amacıyla kullanılmıştır. Tekrarlayan “extragenic” palindromik (REP) elemanlar, 6 dejenere pozisyon ve korunmuş bir palindromik sapın her iki tarafı arasında 5 bç’lik değişken bir ilmekten oluşan 38 bç’lik dizilerdir. REP dizileri çok sayıdaki enterik bakteri için tarif edilmiştir. Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik uyum (ERIC) dizileri DNA tiplendirme için başarılı şekilde kullanılan ikinci set DNA dizileridir. ERIC dizileri 126 bç’lik elemanlardır, yüksek derecede korunmuş merkezi bir ters tekrar içerirler ve bakteriyel genomun “extragenic” bölgeleri içerisinde konumlanmışlardır.

REP-PCR, bakteriyel kolonilerden özütlenen DNA ile veya modifiye bir metot kullanılarak işlenmemiş bütün haldeki hücrelerle gerçekleştirilebilmektedir. REP veya ERIC amplifikasyonu tek bir primer, tek bir primer seti veya çoklu primer setleri ile gerçekleştirilebilmektedir. ERIC motifleri genellikle REP motiflerinden daha az karmaşıktır, ama her ikisi de suş düzeyindeki farkı yansıtmaktadır. REP ve ERIC-PCR’nın örneklerle beraber uygulanması ile her iki tekniğin tek başına kullanımından çok daha iyi bir ayırt edebilme yeteneği sağlanmaktadır (Olive ve Bean, 1999).

REP-PCR hızla yaygın kullanılan bir tiplendirme metodu haline gelmektedir. Tekniğin uygulanması kolaydır ve çok veya az sayıdaki izolata uygulanabilmektedir. REP-PCR, hem genomik parmak izi çıkarma hem de plazmit profillerinden daha iyi bir ayırım yapabilme yeteneği göstermekte olup, daha geniş bir aralıktaki türlere uygulanabilmektedir. REP-PCR, 16S rRNA geni veya 16S-23S ara bölge restriksiyon analizinden çok daha iyi bir ayırım yapabilme yeteneğine sahiptir. Bunun yanı sıra, yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki REP-PCR, multilokus enzim elektroforezi, biyokimyasal karakterizasyon veya ribotypingden daha üstündür. Son olarak, pek çok çalışma REP-PCR verilerinin PFGE sonuçları ile iyi bir korelasyon gösterdiğine işaret etmektedir. Ancak genelde PFGE yöntemine göreceli daha düşük bir ayırım yapabilme yeteneğine sahiptir (Olive ve Bean, 1999).

REP-PCR uyarlanarak otomatik format geliştirilmiştir. Bu yöntemde floresan işaretli primerler kullanılarak REP veya ERIC profilleri oluşturulmakta ve çoğaltılan diziler bir floresans-tabanlı DNA dizi analizi cihazı ile ayrılmaktadır. Bu yöntem tutarlı profil oluşumuna ve verilerin bir veri tabanında sayısallaştırılmış bir resim olarak saklanmasına izin vermektedir. Bilinmeyen suşlar tanımlama amacıyla veritabanlarındaki veriler ile karşılaştırılabilmektedir. Böylece REP-PCR, PFGE gibi standardizasyona izin vermekte, bu da farklı laboratuvarlarda izole edilen suşların karşılaştırılmasını sağlamaktadır (Olive ve Bean, 1999).

Diğer yandan tekrarlayan “intergenic” DNA dizilerini kullanan DNA parmak izi çıkarma yönteminde tekrarlayan bitişik “extragenic” elemanlar arasındaki DNA, çeşitli büyüklüklerdeki fragmanları vermek üzere PCR eliyle çoğaltılmaktadır. PCR ürünleri daha sonra özgül DNA parmak izleri oluşturmak üzere agaroz jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılmaktadır. Bu parmak izleri daha sonra motif tanıyıcı bilgisayar yazılımları tarafından analiz edilebilmektedir (Meays ve ark., 2004).

BOX-PCR, ARDRA’nın aksine, multilokus analizidir ve izolatlar arasında daha yüksek derecede rezolüsyon vermektedir. BOX elementleri şeklindeki tekrarlayan diziler tüm genom içerisinde rastgele konumlanmışlardır ve BOX primerleri ile iki BOX elementi arasındaki genomik bölge amplifiye edilir. Bu

tekrarlayan dizilerin (BOX ve ERIC) dağılımı genomik yapının neredeyse tam bir yansımasıdır ve inter-REP elemanlarının amplifikasyonu genellikle belirli bir bakteri grubu içindeki benzerlikleri saptamaktadır. REP- ve ERIC-benzeri dizilerin bakteriyel genomun hemen her yerinde olmasının, PCR temelli parmak izi çıkarma yöntemleri ile hızlı moleküler karakterizasyonu kolaylaştırması beklenmektedir (Dubey ve ark., 2006).

### 1.1.12. DGGE ve TGGE

Mikrobiyal çeşitliliği çalışmak için kullanılan ve birbirine benzeyen iki metottur. Bu metotlar orijinal olarak DNA dizilerindeki nokta mutasyonlarını saptamak için geliştirilmiştir. Daha sonra kullanım alanı genişletilerek mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarına dahil edilmiştir. DNA, toprak örneklerinden özütlenmekte ve 16S veya 18S rRNA dizilerinin bir parçasını hedefleyen evrensel primerlerle ilgili gen bölgeleri çoğaltılmaktadır. İleri primerin 5' ucu 35-40 baz çiftlik bir “GC clamp” içermekte, böylece DNA’nın en azından bir kısmının çift iplikli kalması garanti edilmektedir. Bu nitelikteki örneklerin denatüre edici ajanların (formamit ve üre) artan konsantrasyonlarının bir gradyanını içeren bir poliakrilamit jeldeki hareketi çift iplikli DNA’nın erime davranışına bağlı olarak gerçekleşecektir. Teorik olarak, DGGE tek bir baz çifti farkı olan DNA’yı ayırabilmektedir. TGGE, DGGE ile aynı prensipleri kullanmakta, ancak bu yöntemde kimyasal denatüre edici ajanlar yerine sıcaklık gradyanı uygulanmaktadır (Kirk ve ark., 2004).

Sıcaklık gradyanı jel elektroforezi (TGGE) ve ilişkili olan DGGE (denatüre edici gradient jel elektroforezi) gibi denatürleyici jel kullanılan elektroforetik yöntemler, tek bir baz çifti bölgesinde farklılık gösteren DNA fragmanlarını ayırabilmektedir (Wartell ve ark., 1998).

TGGE DNA’nın iki fiziksel özelliğinden yararlanır; baz çifti dizisinin sıcaklıkla uyarılan erime üzerine etkisi, ve kısmi denatürasyonun elektroforetik hareketlilik üzerine etkisi. Tipik bir deneyde bir DNA fragmanı arttırılan bir sıcaklık gradyanı ile gerçekleştirilen elektroforez sırasında kısmi iplik açılmasına uğrayacak

ve bu da tümüyle çift iplikli haldeki DNA formu ile karşılaştırıldığında jelde daha yavaş ilerleyecektir. Erime sıcaklığı baz dizilimine bağlı olduğu için bu yöntemle aynı uzunlukta, ancak dizi açısından farklılık gösteren DNA fragmanları birbirinden ayrılabilir (Wartell ve ark., 1998).

DGGE, aynı boyda fakat farklı diziye sahip genleri ayıran elektroforetik bir tekniktir. Jel boyunca ilerlemekte olan çift iplikli bir DNA fragmanını eritmek için DNA'yı denatürleyen bir ajanın gradyanı kullanılmakta, bu da göçü durdurmaktadır. Erime özellikleri arasındaki farklılıklar genellikle baz dizileri arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle jel üzerinde gözlenen her bir bant, dizisinde belki de tek bir baz kadar küçük bir farklılık taşıyan bir genin özgün dizisini temsil etmektedir. Bu yöntem örnek içerisinde bulunan farklı 16S rRNA genlerinin sayısına dair detaylı bir resim sunmaktadır. Daha sonra bu bantların dizi analizi yapılabilir ve uygun veri tabanlarında bulunan bilinen türlerin dizileri ile karşılaştırılabilir. Böylelikle, bir topluluk içerisinde gerçekte var olan türler açığa çıkarılabilir. rDNA genlerinin PCR ile çoğaltılması ile birlikte kullanılan DGGE temel olarak, mikrobiyal toplulukların genetik parmak izlerini saptamak için kullanılmaktadır (Meays ve ark., 2004).

Topluluk yapısının SSU rRNA genlerinin DGGE ile analizi, sonuçları değerlendirmek için kullanılacak tatmin edici yöntemlerin bulunmaması nedeniyle gerçekleştirilememektedir. Bu ve diğer nedenlerden ötürü farklı laboratuarlarda elde edilen verilerin karşılaştırılması zordur. Ancak bu metodun başlıca avantajı göreceli basitliği ve düşük maliyetidir (Forney ve ark., 2004).

DGGE ve TGGE nin t-RFLP ile karşılaştırıldığında avantajı bir bakteriyel topluluk profilindeki her bir ampikonun izole edilebilmesi ve DNA dizi analizi ile karakterize edilebilmesidir. Böylece örnekler sadece patern profilleri ile karşılaştırılmakla kalmayıp, seçilen bileşenler açık bir biçimde tanımlanabilir (Dubey ve ark., 2006).

DGGE ve TGGE, güvenilir, tekrarlanabilir, hızlı ve oldukça ucuz yöntemlerdir. Çoklu örnekler eşzamanlı olarak analiz edilebilmekte, bu da mikrobiyal populasyonlardaki değişiklikleri takip edebilmeyi olanaklı kılmaktadır. Bu tekniklerin bir dezavantajı farklı dizilere sahip DNA fragmanlarının poliakrilamit jelde benzer hareket karakteristiklerine sahip olabilmesidir. Bu nedenle gözlenen bir bant tek bir türü temsil etmeyebilmekte ve bir bakteriyel tür hafifçe farklı dizilere sahip çoklu 16S rRNA genleri nedeniyle çoklu bantlar verebilmektedir (Kirk ve çalışma ark., 2004).

DNA dizisindeki farklılıklara dayanan elektroforetik ayırım temelli başka bir teknik de SSCP'dir (tek iplik konformasyon polimorfizmi). DGGE/TGGE gibi bu teknik de orijinal olarak DNA'daki bilinen veya yeni polimorfizimleri ya da nokta mutasyonlarını saptamak için geliştirilmiştir. Tek iplikli DNA bir poliakrilamit jelde, mobilitesinde, katlanmış ikincil yapılarından kaynaklanan farklılıklara dayanarak ayrılmaktadır. DNA fragmanları eşit büyüklükte olduğunda ve herhangi bir denatürleyici ajan bulunmadığında, katlanma ve bundan dolayı mobilite, DNA dizilerine bağlı olacaktır. SSCP de DGGE'nin sahip olduğu tüm dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bazı tek iplikli DNA'lar birden fazla kararlı konformasyon oluşturabilmektedir. Bu nedenle bir dizi, jelde birden fazla bant ile temsil edilebilmektedir. SSCP nin "GC clamp"a ihtiyacı yoktur (Kirk ve çalışma ark., 2004).

### 1.1.13. T-RFLP

Terminal restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizm analizi (T-RFLP), PCR ile çoğaltılmış ürünlerin terminal restriksiyon fragmanlarının uzunluk polimorfizmlerini ölçmektedir. Öncelikle ilgilenilen bölgenin çoğaltılabilmesi için primerler tasarlanmakta ve bu primerler ile çoğaltılan ürünler, yüksek rezolüsyona sahip dizi analizi jellerinde büyüklük değerlendirmesine tabi tutulmak için uygun olan terminal fragmanlar üretecek endonükleazlar ile sindirilmektedir. Jelde büyüklük tayini, kılcal elektroforez gibi dijital veriler sunan otomatize edilmiş sistemler ile gerçekleştirilmektedir. Floresan işaretli bir primer kullanılması analizi

sadece sindirim sırasında oluşan terminal fragmanlarla sınırlamaktadır. Örneklerden farklı bir florofor taşıyan büyüklük belirteçleri her kuyuda kullanılabileceği için belirlenen büyüklükler son derece kesindir (Marsh, 1999).

SSU-rRNA genlerinin T-RFLP analizi günümüzde, çevre kökenli örneklerden PCR aracılığı ile çoğaltılmış olan bakteriyel DNA dizilerinin çeşitliliğini hızlı bir şekilde karşılaştırmak için kullanılan en güçlü yöntemlerden biridir. Yöntem, farklı örneklerin restriksiyon sitlerinin pozisyonlarındaki değişkenliğe ve otomatize edilmiş DNA dizi analizi cihazlarında yüksek çözünürlüklü jel elektroforezi ile floresan işaretli terminal restriksiyon fragmanlarının uzunluklarının saptanmasına dayanmaktadır. Otomatize edilmiş analiz sistemi ile gerçekleştirilen kılcal elektroforez yüksek örnek işlem hacmine ve fragman uzunluklarının neredeyse tam bir kesinlikle saptanmasına imkan tanımaktadır. Elde edilen veriler, çeşitli istatistiksel metotlar (benzerlik indisleri, hiyerarşik kümelendirme algoritmaları, vb.) kullanılarak yapılacak analizler için uygundur (Dahllöf, 2002).

Belirli bir konumda birden fazla nükleotit içeren dejenere primerler veya belirli bir pozisyonda inozin taşıyan primerler, primerlerin evrenselliğini arttırmak için kullanılabilir. Aynı sonuca ulaşmak için ek olarak primer tutunma sıcaklığı ve PCR için kullanılan reaksiyon karışımı değiştirilebilir. Bu parametreler evrenselliği arttırmak amacıyla değiştirilirken aynı zamanda özgüllükte bir düşüşe, bu da hedef dışı dizilerin çoğalmasına neden olabilir (Dahllöf, 2002).

## 1.2. TEZİN AMACI

Bu tez çalışmasının amacı; daha önce GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından alfa amilaz, alkalen proteaz ve lipaz üreticisi olarak seçilmiş ve ön tiplendirmeleri klasik yöntemlerle yapılmış olan yerel bakteriyel izolatların moleküler tiplendirmelerinin 16S rDNA dizi analizi, ARDRA ve ribotyping kullanılarak gerçekleştirilmesi ve bu yöntemlerin G.Y.T.E. Biyoloji Bölümü'nün ilgili laboratuvarlarında rutin olarak kullanımının sağlanmasıdır.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 2.1. Genomik DNA Özütlemeleri

#### 2.1.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Her örnek için 2 ml LB besiyeri, 25 yerel izolat ve 11 referans *Bacillus* soyunun -20 °C hücre stoğu ile %1 oranında aşılandı. Referans soylar 30 °C'ta, yerel izolatlar ise 37 °C'ta 200 rpm'de çalkalanarak gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah alınan OD<sub>600</sub> değerleri gözetilerek, ikinci ön kültürler aşılandı. Bu amaçla, 100 ml erlende bulunan 10 ml LB besiyeri OD<sub>600</sub> değeri 2 ve üzerinde olan soyların birinci ön kültürünün %1'i ile, OD<sub>600</sub> değeri 2'nin altında olan soylar için ise birinci ön kültürün tamamı ile aşılandı. Ve yukarıda belirtilen koşullarda gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi sabah ikinci ön kültürlerin OD<sub>600</sub> değerleri ölçüldü ve bu değerlerin tüm soylar için 2 ve üzerinde olduğu gözlemlendi. Ana kültür için öngörülen besiyeri miktarı, sonraki basamakta kullanılacak genomik DNA izolasyon yöntemine göre belirlendi ve besiyerleri ikinci ön kültürün %1'i ile aşılandıktan sonra belirtilen koşullarda gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi sabah OD<sub>600</sub> değerleri belirlendi. Tüm soyların -20 °C ve -80 °C stokları hazırlandı. -20 °C stokları son derişiminde % 50 ve -80 °C stokları % 30 gliserol içerecek şekilde hazırlandı.

Ribotyping çalışmalarında kullanılan referans soy *Xenorhabdus sp.* CIP 105189 için de benzer şekilde hazırlanan birinci ve ikinci ön kültürlerden sonra ana kültür, ikinci ön kültürün %1'i ile aşılanarak elde edildi. Bu soy için Pasteur Enstitüsü tarafından önerilen Colombia sıvı besiyeri kullanıldı ve inkübasyon 26 °C'ta gerçekleştirildi. Ancak hücre büyümesi gözlenmedi. Bu soyun üretilmesi için yapılan pek çok çalışmada çeşitli sıvı ve katı besiyerleri ile kültürasyon koşulları denenmesine karşın üreme sağlanamadı. Bunun üzerine, 100 ml erlende bulunan 10 ml Colombia besiyeri soyun ilk açılışında yapılmış -20 °C ve -80 °C hücre stoklarından birer tanesinin tamamı ile aşılanarak 26 °C'ta 250 rpm'de inkübasyona

bırakıldı. İki gün sonra üreyen hücrelerden yeniden -20 °C ve -80 °C hücre stokları yapıldı.

### **2.1.2. Genomik DNA Özütleme Yöntemleri**

Genomik DNA izolasyonu için öncelikli olarak kullanılan CTAB yöntemi sonucunda elde edilen genomik DNA'larda hem gözle, hem de spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde kirlilik saptandı. Bazı soylar için bu yöntem ile elde edilen genomik DNA veriminin çok düşük olması ve gözlenen kirliliğin sonraki aşamalarda uygulanacak yöntemler üzerindeki olası olumsuz etkileri nedeniyle farklı bir genomik DNA izolasyon yönteminin denenmesine karar verildi. Her bir soy için bu iki yöntem ile elde edilen genomik DNA'ların verimleri ve temizlik dereceleri karşılaştırıldı. Hızlı yöntem ile elde edilen DNA'ların verimlerinin bazı soylar için CTAB yöntemine göreceli daha yüksek olduğu gözlenmekle birlikte bu yöntemle elde edilen genomik DNA'larda da kirlilik görüldü. Bu yöntem ile elde edilen DNA veriminin arttırabilmesi amacıyla kültürün inkübasyon süresi uzatıldı.

Her iki yöntemle yapılan çoklu denemeler sonucunda verim açısından tüm soylar için uygun bir yöntem belirlenemedi. Bunun üzerine Promega Genomik DNA Özütleme Kitinin kullanılmasına karar verildi. Tez çalışmaları kapsamında denenen tüm genomik DNA özütleme yöntemleri aşağıda açıklanmıştır:

#### **2.1.2.1. CTAB Yöntemi**

Belirtilen koşullarda (s. 32) gece boyu büyütülen 50 ml kültür +4 °C'ta 7000 rpm'de 10-20 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökeleğin üzerine 19 ml TE, pH 8.0 eklenerek mikropipet yardımıyla homojen hale getirildikten sonra üzerine 1 ml %10 SDS ve 99 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 50 rpm'de çalkalanarak bir saat inkübe edildi. Üzerine 3,35 ml 5M NaCl ve 2,68 ml %10 CTAB + 0,2 M NaCl eklenerek hafifçe karıştırıldı. Su banyosunda 65 °C'ta 50 rpm'de çalkalanarak 10 dakika inkübe edildi. Üzerine 25 ml kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenip hafifçe alt üst edilerek

homojenize edildi. +4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek fazların ayrılması sağlandı. Üst faz temiz bir santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 22,5 ml fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenip hafifçe alt üst edilerek homojenize edildi. +4 °C'ta 10.000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz temiz bir santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 13,5 ml izopropanol eklenerek karıştırıldı. +4 °C'ta 10.000 rpm'de 15-25 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen DNA çökeleği 2 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülerek, 400 µl'lik bölümler halinde eppendorf tüplerine dağıtıldı. Her bir eppendorfa 40 µl 3M NaAc, pH 5.2 ve 1 ml % 100 soğuk EtOH eklenip alt üst edilerek karıştırıldı. +4 °C'ta 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler 10-15 dakika liyofilizatörde kurutuldu. Çökelekler her bir eppendorfa eklenen 50 µl ampul su ile çözüldü ve her bir soya ait DNA'lar tek bir tüpte toplandı. Eppendorf tüpleri tüpten tüpe aktarılan 50 µl ampul su ile yıkandı ve soya ait toplam DNA tüpüne aktarıldı. Elde edilen 400 µl DNA çözeltilisine 4 µl DNaz içermeyen RNaz eklenerek, su banyosunda 37 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra eppendorf tüpüne 40 µl 3M NaAc, pH 5.2 ve 1 ml % 100 soğuk EtOH eklenerek +4 °C'ta 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra eppendorf tüpüne 100 µl % 75 soğuk EtOH eklenerek çökelek yıkandı. +4 °C'ta 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler 10-15 dakika liyofilizatörde kurutuldu. Çökelekler 400 µl ampul su içinde çözüldü. Elde edilen genomik DNA'lardan 1 µl alınarak %1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı. Genomik DNA'lar -20 °C'a kaldırıldı.

#### **2.1.2.2. TEST Yöntemi**

Belirtilen koşullarda (s. 32) hazırlanan 20 ml kültür +4 °C'ta 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı bir miktarı kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Kuvvetlice vortekslenerek hücre çökeleği homojenize edildi. Üzerine 2 ml TEST tamponu eklendi ve vortekslendi. Her tüpe 100 µl 200 mg/ml taze hazırlanmış lizozim eklendikten sonra hafifçe vortekslendi. Her tüpe 10 µl 5 U/µl Mutanolizin (Sigma) eklendi ve kısa bir süre vortekslendikten sonra tüpler 37 °C'ta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Tüplere 50 µl 20 mg/ml Proteinaz K eklenerek nazikçe karıştırıldı. Üzerine 100 µl % 10'luk N-lorilsarkozin eklendi ve nazikçe

karıştırıldıktan sonra 37 °C'ta 2,5 saat inkübasyona bırakıldı. Bu aşama, gerektiğinde gece boyu yapılabilir. İnkübasyon sonrasında çözeltinin berrak olmaması halinde her tüpe % 25 SDS eklenerek 60 °C'ta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Mevcut hacim kadar (~2,5 ml) fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. +4 °C'ta 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj sonrasında üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol (24:1) eklendi. Karıştırılarak +4 °C'ta 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe alındı. Üst fazın berrak olmadığı durumlarda kloroform/izoamil alkol (24:1) basamağı tekrarlanabilmektedir. Alınan üst faz hacminin iki katı kadar % 100 soğuk etanol eklendikten sonra DNA'nın görüldüğü durumlarda +4 °C'ta 13 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Alkol eklendiğinde DNA'nın görülmediği durumlarda tüp gece boyu -20 °C'ta bekletildikten sonra +4 °C'ta 8000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. 37 °C'taki etüvde birkaç saat kurutulduktan sonra çökelek üzerine 100 µl TE-RNaz eklenerek oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. DNA çökeleği liyofilizatörde kurutuldu. Daha sonra her tüpe 200 µl TE-RNaz eklenerek tüp gece boyu oda sıcaklığında yavaşça çalkalandı. Elde edilen DNA'lar -20 °C'ta saklandı.

### 2.1.2.3. Hızlı Yöntem

Belirtilen koşullarda (s. 32) inkübe edilen kültürün altıncı saatinde 15 ml kültür santrifüj tüpüne alındı. +4 °C'ta 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökeleğin üzerine 8 ml 1X TEK tampon eklendi ve pipetlenerek homojenize edildi. Üzerine 1 ml % 10 SDS ve 200 µl %1 pronaz eklenerek su banyosunda 37 °C'ta 30 dakika ve ardından 60 °C'ta 30 dakika inkübe edildi (İnkübasyon sonrasında viskoz ancak ışık geçiren bir süspansiyon oluşması beklenmektedir). Üzerine 8 ml TEK-fenol-kloroform-izoamil alkol eklenerek sütsü-kararlı bir süspansiyon oluşuncaya kadar karıştırıldı. +4 °C'ta 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazın ~7 ml'si temiz bir santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 7 ml TEK-fenol-kloroform eklenerek sütsü-kararlı bir süspansiyon oluşuncaya kadar karıştırıldı. +4 °C'ta 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazın ~5 ml'si temiz bir santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 10 ml %100 soğuk EtOH eklenip alt üst edilerek karıştırıldı. +4 °C'ta 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj

sonrasında üst sıvı vakumla uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler 15 dakika liyofilizatörde ya da gece boyu 37 °C'taki etüvde kurutuldu. Çökelekler 500-1000 µl TE-RNase tamponunda pipetlenerek çözüldü. Su banyosunda 65 °C'ta 7 dakika çözünmeye bırakıldı. Elde edilen genomik DNA'lardan 1 µl'si %1'lik agaroz jelde incelenerek miktar tayini yapıldı. Genomik DNA'lar -20 °C'a kaldırıldı.

#### **2.1.2.4. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) Protokolü**

Belirtilen koşullarda (s. 32) gece boyu büyütülen 1 ml kültür eppendorf tüpüne alınarak +4 °C'ta 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelek üzerine 480 µl 50 mM EDTA eklenip pipetlenerek çözüldü. Üzerine 120 µl lizozim (10 mg/ml) eklenerek su banyosunda 37 °C'ta 30-60 dakika inkübe edildi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. 600 µl "nuclei lysis solution" eklenip nazikçe pipetlenerek karıştırıldı. Su banyosunda 80 °C'ta 5 dakika inkübasyon sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu. Üzerine 3 µl RNase çözeltisi (kit ile sağlanan) eklenerek karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 15-60 dakika inkübasyon sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu. 200 µl "protein çözüme çözeltisi" eklenerek vortekslendi ve 5 dakika buzda bekletildi. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek üst sıvı, içinde 600 µl oda sıcaklığında izopropanol bulunan bir eppendorfa alındı. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökeleğin üzerine 600 µl oda sıcaklığındaki %75 EtOH eklenerek karıştırıldı. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler 10-15 dakika liyofilizatörde kurutuldu. DNA çökeleği 100 µl "rehidrasyon çözeltisi" eklenerek 65 °C'ta bir saat ya da +4 °C'ta gece boyu çözünmeye bırakıldı. Çözünen genomik DNA'ların 1 µl'si %1 agaroz jelde incelenerek miktar tayini yapıldı. Genomik DNA'lar -20 °C'a kaldırıldı.

Çizelge 2.1.'de bu çalışma kapsamında kullanılan referans *Bacillus* soylarının listesi verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** *Bacillus* Genetic Stock Center’den gelen referans *Bacillus* soyları.

| BGCS No           | Soy                                                               |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1A1               | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168               |
| 4Q1               | <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> ONR 60A   |
| 5A1               | <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 8480                           |
| 6A5 <sup>T</sup>  | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <sup>T</sup>                    |
| 7A36 <sup>T</sup> | <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 <sup>T</sup>                |
| 8A3 <sup>T</sup>  | <i>Bacillus pumilus</i> Meyer and Gottheil ATCC 7061 <sup>T</sup> |
| 9A20 <sup>T</sup> | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980                  |
| 10A5 <sup>T</sup> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B-14393 <sup>T</sup>            |
| 13A10             | <i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 12123                             |
| 15A4 <sup>T</sup> | <i>Bacillus clausii</i> NRRL B-23342 <sup>T</sup>                 |
| 16A1              | <i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513                               |
| 23A1 <sup>T</sup> | <i>Bacillus badius</i> ATCC 14574                                 |
| 25A1 <sup>T</sup> | <i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842 <sup>T</sup>               |
| 26A1 <sup>T</sup> | <i>Brevibacillus brevis</i> ATCC 8246 <sup>T</sup>                |
| 27E3              | <i>Bacillus subtilis</i> “natto” NRRL B-14197 (=UFO 3335)         |
| 29A1 <sup>T</sup> | <i>Bacillus firmus</i> NRS 613 <sup>T</sup>                       |
| 40A7              | <i>Brevibacillus laterosporus</i> ATCC 64 <sup>T</sup>            |
| 61A1 <sup>T</sup> | <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050 <sup>T</sup>                  |

## 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

### 2.2.1. 16S rDNA’ların PCR ile Çoğaltılması

Her bir soy için genomik DNA derişimlerine göre ayrı ayrı tasarlanan 25 µl’lik reaksiyon karışımında; 200 ng kalıp DNA, son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde dNTP, düz ve ters primerlerin her ikisinden de 6,25 pmol, 0,9 U DNA polimeraz ve 1X polimeraza özgü PCR tamponu bulunmakta olup hacim dH<sub>2</sub>O ile 25 µl’ye tamamlanmıştır (Çizelge 2.1.).

**Çizelge 2.2.** Bir PCR tüpünde bulunması gereken bileşenler.

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| Genomik DNA              | 200 ng                   |
| dNTP                     | 100 µM                   |
| Taq DNA Polimeraz        | 0,9 U                    |
| İleri primer (FG15)      | 6,25 pmol                |
| Geri primer (FG35)       | 6,25 pmol                |
| Taq DNA Polimeraz Tampon | 1X                       |
| dH <sub>2</sub> O        | 25 µl’ye tamamlamak için |

Reaksiyon tüpüne bileşenlerin eklenme sırası ampul su, 10X polimeraz tamponu, primer FG15, primer FG35, dNTP ve genomik DNA şeklindedir. Bu aşamada kullanım kolaylığı için yüksek derişime sahip stoklardan düşük derişimli seyreltmeler hazırlandı. Kullanılan seyreltmeler aşağıda belirtilmektedir:

25 mM dNTP → 2 mM dNTP

FG15 (380 pmol/μl) → 3,125 pmol/μl

FG35 (490 pmol/μl) → 3,125 pmol/μl

Taq DNA Polimeraz (5 U/μl) → 0,45 U/μl

Yüksek derişime sahip genomik DNA'lar için 200 ng/μl'lik çözeltiler hazırlandı. Bir soy için birden fazla PCR tüpü ile reaksiyon gerçekleştirilmek istendiği durumlarda, enzim dışındaki bileşenler için gerekli miktarlar, bir tüp için gereken miktarların katları olarak hesaplandı ve karışım tüpü hazırlandı. Karışım tüpü enzim dışındaki tüm bileşenleri içermektedir. Hazırlanan karışım nazıkçe karıştırılarak homojenize edildi. Hızlı spin sonrasında karışım 23 μl'lik bölümler halinde o soy için ayrılmış olan PCR tüplerine dağıtıldı.

Enzim dışında tüm bileşenleri içeren PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi. Program 94 °C'ta 4 dakikalık bir ön denatürasyon basamağı içermektedir. Ön denatürasyon sonrasında tüpler alınarak spin yapıldı. Her bir tüpe daha önce hazırlanmış olan 0,45 U/μl'lik Taq DNA Polimeraz (Roche) çözeltisinden 2 μl eklenerek nazıkçe karıştırıldı. Tüpler tekrar termal döngü cihazına yerleştirilerek programa kaldığı yerden devam edildi. 16S PCR için kullanılan program aşağıda belirtilmektedir. PCR ürünlerinden 1 μl alınarak %1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı. PCR ürünleri -20 °C'a kaldırıldı.

### **Kullanılan Program:**

94 °C 4 dk  
 94 °C 1 dk  
 53 °C 1 dk  
 72 °C 1,6 dk  
 72 °C 10 dk

} 35 döngü

### **2.2.2. *rrn* Operonunun PCR ile Çoğaltılması**

Her bir soy için genomik DNA derişimlerine göre ayrı ayrı tasarlanan 25 µl'lik reaksiyon karışımında; 150 ng kalıp DNA, 200 µM son derişimde dNTP, ileri ve geri primerlerin her ikisinden de 15 pmol, 1,5 mM son derişimde MgCl<sub>2</sub>, 0,9 U DNA polimeraz ve 1X polimeraza özgü tampon bulunmaktadır (Çizelge 2.2.).

**Çizelge 2.3.** Bir PCR tüpünde bulunması gereken bileşenler.

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| <b>Genomik DNA</b>              | 150 ng  |
| <b>İleri primer (MT3)</b>       | 15 pmol |
| <b>Geri primer (MT4)</b>        | 15 pmol |
| <b>dNTP</b>                     | 200 µM  |
| <b>Taq DNA Polimeraz Tampon</b> | 1X      |
| <b>Taq DNA Polimeraz</b>        | 0,9 U   |

Reaksiyon tüpüne bileşenlerin eklenme sırası ampul su, renksiz Go Taq DNA polimeraz (Promega) tamponu, ileri ve geri primerler, dNTP ve genomik DNA şeklindedir. Bu aşamada yüksek derişime sahip stoklardan düşük derişimli seyreltmeler hazırlandı. Kullanılan seyreltmeler aşağıda belirtilmektedir:

25 mM dNTP → 2 mM dNTP

MT3 (361,9 pmol/µl) → 10 pmol/µl

MT4 (290 pmol/µl) → 10 pmol/µl

Go Taq DNA Polimeraz (5 U/µl) → 0,9 U/µl

Yüksek derişime sahip genomik DNA'lar için 150 ng/ $\mu$ l'lik seyreltik çözeltiler hazırlandı. Bir soy için birden fazla PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmek istendiği durumlarda, enzim dışındaki bileşenler için gerekli miktarlar, bir tüp için gereken miktarların katları olarak hesaplandı ve karışım tüpü enzim dışındaki tüm bileşenleri içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım nazıkçe karıştırılarak homojenize edildikten sonra 24  $\mu$ l'lik bölümler halinde PCR tüplerine dağıtıldı.

Enzim dışında tüm bileşenleri içeren PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi. 94 °C'ta 4 dakikalık bir ön denatürasyon basamağından sonra tüpler cihazdan çıkarılarak hızlı spin yapıldı ve her bir tüpe daha önce hazırlanmış olan 0,9 U/ $\mu$ l'lik Go Taq DNA Polimeraz (Promega)'dan 1  $\mu$ l eklenerek nazıkçe karıştırıldı. Hızlı spin sonrasında tüpler tekrar termal döngü cihazına yerleştirilerek programa kaldığı yerden devam edildi. *rrn*-pcr için kullanılan PCR döngüleri aşağıda belirtilmektedir. PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak %1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı. PCR ürünleri -20 °C'a kaldırıldı.

#### **Kullanılan Program (7):**

|       |       |            |
|-------|-------|------------|
| 94 °C | 4 dk  |            |
| 94 °C | 45 sn | } 25 döngü |
| 63 °C | 45 sn |            |
| 72 °C | 3 dk  |            |
| 72 °C | 7 dk  |            |

*rrn*-PCR çalışmaları için kullanılan bu programdan önce, elde edilen 4,5 kb büyüklüğündeki *rrn*-PCR ürününün veriminin arttırılması ve özellikle toplu üretimde bazı soylarda ek olarak gözlenen ~1,5 kb büyüklüğünde ikinci bir ürünün PCR reaksiyonunda çoğaltılmasının engellenmesi amacıyla, kullanılan primerler, DNA polimeraz, PCR döngüleri, genomik DNA özütleme yöntemi ve reaksiyon hacminin değiştirildiği çeşitli çalışmalar yapıldı. Bu amaçla kullanılan bazılarında sıcaklık veya süre gradyanı da uygulanan programlar aşağıda belirtilmektedir:

1. 94 °C 4 dk

94 °C 45 sn  
64 °C 45 sn } 10 döngü  
72 °C 3 dk

94 °C 45 sn  
64 °C 45 sn } 20 döngü  
72 °C 3 dk + 20 sn/2 döngü  
72 °C 7 dk

2. 94 °C 4 dk

94 °C 45 sn  
63 °C 45 sn } 10 döngü  
72 °C 3 dk

94 °C 45 sn  
63 °C + 0,5 °C/2 döngü 45 sn } 20 döngü  
72 °C 3 dk  
72 °C 7 dk

3. 94 °C 4 dk

94 °C 45 sn  
64 °C 45 sn } 25 döngü  
72 °C 3 dk  
72 °C 7 dk

4. 94 °C 4 dk

94 °C 45 sn  
67 °C 45 sn } 25 döngü  
72 °C 3 dk  
72 °C 7 dk

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{5.} \quad 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 4 \text{ dk} \\
 \left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 70\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ dk} \end{array} \right\} 25 \text{ döngü} \\
 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 7 \text{ dk}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{6.} \quad 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 4 \text{ dk} \\
 \left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 68\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ dk} \end{array} \right\} 10 \text{ döngü} \\
 \left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 68\text{ }^{\circ}\text{C} - 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/2 \text{ döngü } 45 \text{ sn} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ dk} \end{array} \right\} 20 \text{ döngü} \\
 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 7 \text{ dk}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{7.} \quad 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 4 \text{ dk} \\
 \left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 63\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ dk} \end{array} \right\} 25 \text{ döngü} \\
 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 7 \text{ dk}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{8.} \quad 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 4 \text{ dk} \\
 \left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 60\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 45 \text{ sn} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ dk} \end{array} \right\} 25 \text{ döngü} \\
 72\text{ }^{\circ}\text{C} \quad 7 \text{ dk}
 \end{array}$$

### 2.2.3. 16S rDNA Dizi Analizi

#### 2.2.3.1. CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter®)

CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter®) kılcal elektroforez teknolojisine dayanan tam otomatik bir genetik analiz sistemidir. Bu sistem kapillerleri patentli bir lineer poliakrilamit (LPA) jel ile otomatik olarak doldurur, örnekleri denatüre eder ve yükler, voltaj programını uygular ve verileri analiz eder. Yazılım araçları veri kalitesini hızlı bir şekilde izlemeye ve otomatik veri değerlendirilmesinin bireye özgü olarak yapılmasına olanak tanımaktadır.

#### 2.2.3.2 16S rDNA PCR Ürünlerinin Wizard® SV Gel and PCR Arındırma Sistemi (Promega) ile Saflaştırılması

16S rDNA PCR ürünleri dizi analizine alınmadan önce PCR temizleme kiti (Promega) ile saflaştırılarak olası dNTP vb kirlilikler uzaklaştırıldı. Öncelikle kit ile birlikte gelen membran bağlama çözeltisi üzerine 75 ml % 95 EtOH eklendi. 16S rDNA PCR ürünleri üzerine eşit hacimde membran bağlama çözeltisi eklenerek kit ile birlikte gelen spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. +4 °C'ta 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonrasında spin kolonun alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Spin kolona 700 µl membran yıkama çözeltisi eklenerek +4 °C'ta 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonrasında spin kolonun alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Spin kolona 500 µl membran yıkama çözeltisi eklenerek +4 °C'ta 14 000 rpm'de 6 dakika santrifüj sonrasında spin kolonun alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Membran 1,5 ml'lik yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Su banyosunda 50 °C'ta kısa süre inkübe edilmiş olan 50 µl “nükleaz içermeyen su” eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. +4 °C'ta 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında DNA eppendorf tüpüne geçti. Eppendorfta toplanan örnekten 1 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı.

### 2.2.3.3. GenomeLab™ Boyalı Sonlandırıcı Kullanılan Döngü-Dizi Analiz Kiti (Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing)

Bu kit ile iki tip ön karışım hazırlanabilmektedir. dITP karışımı rutin dizi analizi çalışmaları için önerilmektedir. dGTP karışımı ise GC oranı yüksek, ikincil yapılar veya polimeraz dur noktaları içeren zor kalıplar için önerilmektedir. Aşağıda kit (P/N 608000) bileşenleri görülmektedir:

DNA polimeraz (%50 gliserol içinde)

Boya içeren sonlandırıcılar (ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP)

dNTP(I) karışımı

dNTP(G) karışımı

Dizi reaksiyon tamponu

pUC18 kontrol kalıbı (0,25 µg/µl)

M13 -47 dizi primeri (1,6 pmol/µl or 1,6 µM)

Glikojen (20 mg/ml)

Mineral yağ

Örnek yükleme çözeltisi (SLS)

Kitin -20 °C'ta saklanması gerekmektedir. dITP ve dGTP ön karışımlarının hazırlanışları Çizelge 2.3.'te belirtilmektedir.

**Çizelge 2.4.** Ön karışım hazırlanışı.

| Bileşen                    | dITP    | dGTP    |
|----------------------------|---------|---------|
| 10X Dizi reaksiyon tamponu | 200 µl  | 200 µl  |
| dNTP karışımı              | 100 µl  | 100 µl  |
| Boya taşıyan ddUTP         | 200 µl  | 200 µl  |
| Boya taşıyan ddGTP         | 100µl   | 300 µl  |
| Boya taşıyan ddCTP         | 200 µl  | 200 µl  |
| Boya taşıyan ddATP         | 200 µl  | 200 µl  |
| Polimeraz                  | 100 µl  | 100 µl  |
| Toplam hacim               | 1100 µl | 1300 µl |

dITP ön karışımı hazırlandıktan sonra 8 kullanımlık miktarlarda eppendorflara ayrılarak -20 °C'ta saklandı. Burada amaç çözme-dondurma olayını en az düzeyde tutmaktır. dITP ön karışımı için örnek başına kullanım 11 µl iken, kit protokolünde dGTP ön karışımı için 13 µl önerilmiştir.

#### 2.2.3.4 16S rDNA Dizi Analizi için PCR

Her bir soy için 16S PCR ürünü derişimlerine göre ayrı ayrı tasarlanan 25 µl'lik reaksiyon karışımında 500 ng kalıp DNA, 6,4 pmol primer ve 11 µl ön karışım bulunmaktadır. 16S rDNA dizisini bütünüyle okuyabilmek amacıyla her bir soy için FG45 ve MT2 ileri ile FG55 ve MT1 geri primerleri kullanılarak dört ayrı dizi reaksiyonu gerçekleştirildi.

Otomatik dizi analizi cihazında okumanın doğru olarak gerçekleştirildiğinden emin olabilmek amacıyla her çalışmada kontrol olarak pUC18 plazmidi de ayrıca dizilenmiştir. Kit ile birlikte gelen pUC18 plazmidi ile gerçekleştirilen reaksiyonda kit protokolünde önerildiği üzere 1 µl pUC18 kalıp DNA'sı (GenomeLab™ pUC18 Kontrol Kalıbı, Beckman Coulter®), 3 µl M13 primer (GenomeLab™ -47 Dizi Primeri, Beckman Coulter® ), 5 µl dH<sub>2</sub>O ve 11 µl n karışım bulunmaktadır.

Her bir soy için PCR tüpüne 0,5 µg kalıp DNA, 6,4 pmol dizi primeri ve toplam hacmi 20 µl'ye tamamlayacak miktarda dH<sub>2</sub>O eklendikten sonra PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi. 94 °C'ta 4 dakikalık bir ön denatürasyon basamağından sonra tüpler alınarak her birisine 11 µl ön karışım eklendi ve nazikçe karıştırıldı. Tüpler tekrar termal döngü cihazına yerleştirilerek programa kaldığı yerden devam edildi. Kullanılan program aşağıda belirtilmiştir:

|       |       |            |
|-------|-------|------------|
| 94 °C | 4 dk  | } 30 döngü |
| 96 °C | 20 sn |            |
| 50 °C | 20 sn |            |
| 60 °C | 4 dk  |            |

Döngüler tamamlandığında, reaksiyonun durdurulabilmesi için her tüpe, içeriği aşağıda belirtilen reaksiyon durdurma çözeltisinden 5 µl eklendi.

**Reaksiyon Durdurma Çözeltisi:**

2 µl 3M NaAc, pH 5.2

2 µl 100 mM EDTA, pH 8.0

1 µl 20 mg/ml glikojen

Reaksiyon durdurulduktan sonra PCR ürünleri çöktürüldü. Çöktürme için her bir PCR tüpüne 60 µl % 95 soğuk EtOH eklendi. +4 °C'ta 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Üzerine 200 µl % 75 soğuk EtOH eklenerek +4 °C'ta 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Bu basamak iki kez yinelandıktan sonra elde edilen çökelekler liyofilizatörde 10 dakika kurutuldu ve otomatik dizi analizi cihazında dizileninceye dek -20 °C'ta saklandı.

-20 °C'ta saklanan örnekler 40 µl SLS (örnek yükleme çözeltisi) içinde çözülerek mikrolaka kuyularına aktarıldı. Tüm kuyuların üzeri kit ile birlikte sağlanan bir damla mineral yağı ile kapatıldı. İkinci bir mikrolakada örneklerin yüklendiği sıraya karşılık gelen sıra, tamponla (GenomeLab™ Ayırma Tamponu, Beckman Coulter®) dolduruldu ve elektroforez Beckman CEQ 8000 Dizi Analiz Cihazında gerçekleştirildi. Bu sistemde öncelikle her bir soy için dört primerle ayrı ayrı elde edilen ham dizi verileri, cihazın yazılımı ile baz dizisine çevrildi. Bu çevirme işleminin kıstasları belirlenirken okunan dizinin bir PCR ürünü olduğu gözildi ve dizinin baş ve son kısmında iyi okunmayan bölgelerin çıkarılması sağlandı. Daha sonra FG45 ve MT2 primerleri ile FG55 ve MT1 primerleri için elde edilen dizi verileri, yine cihazın yazılımından yararlanılarak birbirleri ile karşılaştırıldı ve ortak olan kısımları dışlandıktan sonra diziler birleştirildi. Böylece elde edilen FG45-MT2 ve FG55-MT1 birleştirilmiş dizileri NCBI'da bulunan GenBank veritabanındaki dizilerle ayrı ayrı karşılaştırıldı. Daha sonra FG45-MT2 ve FG55-MT1 dizileri de uygun şekilde birleştirilerek her bir soy için tam 16S rDNA dizileri elde edildi. Her bir soy için okunabilen en yüksek baz sayısı değişkenlik

göstermektedir. Bazı soylar için ilgili primerler ile elde edilen diziler arasında çakışma sağlanamadı. Bu diziler için her bir primer ile elde edilen diziler uygun şekilde konumlandırılarak arka arkaya eklendi.

## 2.3. PCR ile Çoğaltılmış Ribozomal DNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA)

### 2.3.1. 16S rDNA ARDRA

Kesim hacmi 20 µl olarak belirlendi. 1 µg DNA için 5U enzim kullanılarak 2 µg DNA kesildi. Her bir soy için *CfoI* (Roche, 10 U/µl), *MboII* (Takara, 10 U/µl) ve *Sau3AI* (Takara, 40 U/µl) enzimleri ile ayrı ayrı kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Bir kesim için 10 U enzim kullanıldığı için 10 U/µl derişime sahip *CfoI* ve *MboII* enzimleri kesim reaksiyonuna doğrudan eklenirken; 40 U/µl derişime sahip *Sau3AI* enzimi için 10 U/µl'lik seyreltik çözelti hazırlandı. Her bir kesim tüpüne ilgili soya ait 2 µg kit ile saflaştırılmış 16S rDNA PCR ürünü, son derişimi 1X olacak şekilde ilgili enzime ait 10X tampon, 10 U restriksiyon enzimi ve hacmi tamamlamak için ampul su eklenerek hafifçe karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından kısa bir spin sonrasında kesim tüplerine 3 µl 6X jel yükleme boyası eklenerek, 0,5X TAE ile hazırlanan % 1,8'lik metafor agaroz içeren jele yüklendi. Jel 80 V'ta bromofenol mavisinin çıkmasına 1,5 cm kalana kadar (küçük boy kaset, ~7,5 cm; orta boy kaset, ~12 cm) yürütüldü. Jelde kullanılan belirteçlerin hazırlanışı aşağıda belirtilmektedir:

100 bç DNA belirteci (0,5 µg/µl) → 2 µl 100 bç DNA belirteci + 4 µl 6X yükleme boyası + 16 µl dH<sub>2</sub>O

500 bç belirteci (0,05 µg/µl, kullanıma hazır) → 20 µl

Kullanılan jeller ile ilgili bilgiler aşağıdadır:

Küçük kaset: 40 ml, tarak kalınlığı 1 mm (12 kuyu)

Orta boy kaset: 110 ml, tarak kalınlığı 1 mm (16 kuyu)

Elektroforez durdurulduktan sonra derişimi 10 mg/ml olan stok EtBr çözeltisi son derişimi 1 µg/µl olacak şekilde 0,5X TAE tamponuna eklendi. Jel bu tampon içinde oda sıcaklığında 20-30 dakika karıştırılarak boyandı. Boyama sonrasında jel 15 dakika EtBr içermeyen 0,5X TAE ile yıkandı. Daha sonra jel Vilber Lourmat, Infinity-3026 WL/26M sistemi kullanılarak görüntülendi.

### 2.3.2. *rrn*-ARDRA

Kesim hacmi 22 µl olarak belirlendi. 1 µg DNA için 5U enzim kullanıldı. Her bir soy için *CfoI* (10 U/µl), *MboII* (10 U/µl) ve *Sau3AI* (40 U/µl) enzimleri ile ayrı ayrı kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Bir kesim için 10 U enzim kullanıldığından 10 U/µl derişime sahip olan *CfoI* ve *MboII* enzimleri kesim reaksiyonuna doğrudan eklenirken; 40 U/µl derişime sahip olan *Sau3AI* enzimi için 10 U/µl'lik seyreltik çözelti hazırlandı. Her bir kesim tüpüne ilgili soya ait 2 µg *rrn*-PCR ürünü, son derişimi 1X olacak şekilde ilgili enzime ait 10X tampon ve 10 U restriksiyon enzimi ve hacmi tamamlamak için ampul su konularak hafifçe karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından kesim tüplerine kısa bir spin sonrasında 2 µl 6X agaroz yükleme boyası eklenerek 0,5X TAE ile hazırlanan % 1'lik metaforlu agaroz jele yüklendi. Jel 80 V'ta, mavi boyalar kuyulardan 20 cm uzaklığa erişene kadar yürütüldü. Jelde kullanılan belirteçlerin hazırlanışı aşağıda belirtilmektedir:

100 bç DNA belirteci (0,5 µg/µl) → 2 µl 100 bç DNA belirteci + 4 µl 6X yükleme boyası + 16 µl dH<sub>2</sub>O

Sindirilmemiş *rrn*-PCR ürünü → 1 µl örnek + 1 µl 6X boya + 4 µl dH<sub>2</sub>O

Kullanılan jel: Büyük kaset, 465 ml, tarak kalınlığı 0,75 mm (51 kuyu)

Elektroforez durdurulduktan sonra derişimi 10 mg/ml olan stok EtBr çözeltisi son derişimi 1 µg/µl olacak şekilde 0,5X TAE tamponuna eklendi. Jel bu tampon içinde oda sıcaklığında 20-30 dakika karıştırılarak boyandı. Jel, boyama sonrasında EtBr içermeyen 0,5X TAE ile 15 dakika yıkandı. Daha sonra jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat, Infinity-3026 WL/26M) fotoğrafı çekildi.

### **2.3.2.1. Wizard® SV Jel ve PCR Saflaştırma Sistemi Protokolü**

İlgilenilen DNA parçasına ait bant steril bistüri yardımıyla jelden kesilerek daha önce boş olarak tartılmış steril eppendorf tüplerine alındı. İçinde jelden kesilmiş parçaların bulunduğu eppendorflar tartılarak üzerlerine 10 mg jel parçası için 10 µl olacak şekilde “Membran Bağlanma Çözeltisi” eklendi. Vortekslendikten sonra tüpler 60 °C’ta su banyosunda inkübe edildi ve her beş dakikada bir çıkarılıp vortekslenerek jel parçalarının erimesi sağlandı. Daha sonra üzerlerine eşit hacimde “Membran Bağlanma Çözeltisi” eklendi. Steril SV minikolonları toplama tüplerinin üzerine yerleştirildi ve çözölmüş jel karışımları mikrokolonların üzerine transfer edilerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 14 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek toplama tüplerinde toplanan sıvılar dökölerek mikrokolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 700 µl “Membran Yıkama Çözeltisi” eklenerek 14 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip toplama tüplerinde biriken sıvılar atıldı. Aynı işlem 600 µl “Membran Yıkama Çözeltisi” ile tekrar edildi. Daha sonra mikrokolonlar temiz eppendorf tüplerine alınarak üzerlerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler 14 000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek DNA’ların eppendorflara geçmesi sağlandı

### **2.3.3. Metaforlu Jel (%1)**

40 ml 0,5X TAE 100 ml’lik erlende +4 °C’ta 10-15 dakika soğutuldu. % 1’lik jel için 0,2 gram metafor agaroz (Cambrex) ve 0,2 gram Agaroz (Sigma) tartılarak önceden soğutulmuş 0,5X TAE’nin üzerine eklendi. Önce manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldı. Ardından 150 °C’a ayarlanmış manyetik

karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra 250 °C'a ayarlanmış manyetik karıştırıcıda kaynayana kadar karıştırıldı ve 60 °C'a ayarlanmış su banyosunda soğutulduktan sonra kasete döküldü. Metaforlu jel donduktan sonra üzerini kapatacak şekilde 0,5X TAE eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta bir gece bekletildi. Ertesi gün kullanımdan biraz önce taraklar çıkarıldı. Kullanılan kasetlere göre gerekli jel miktarı ve tarakların özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

Küçük kaset: 40 ml, tarak kalınlığı 1 mm (12 kuyu)

Orta boy kaset: 110 ml, tarak kalınlığı 1 mm kuyu (16 kuyu)

Büyük kaset: 465 ml, tarak kalınlığı 0,75 mm (51 kuyu)

## 2.4. “RIBOTYPING” (Ribotiplendirme)

### 2.4.1. Mikrodiyaliz

Genomik DNA'ların ribotyping için kesime alınmadan önce mikrodiyaliz yöntemi ile küçük fragmanlardan arındırılmasına karar verildi. Mikrodiyaliz uygulanacak genomik DNA'lardan 50'şer µg eppendorfa alınarak NaAc + EtOH çöktürmesi yapıldı. Bunun için, örneklerin üzerine 1/10 hacim 3M NaAc, pH 5.2 ve örnek hacminin 2,5 katı % 100 soğuk EtOH çözeltisi eklendi. -80 °C'ta 30 dakika bekletildikten sonra +4 °C'ta 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler liyofilizatörde 10 dakika kurutuldu ve 100 µl 1X TT-RNase içinde çözülerek gece boyu +4 °C'ta çözünmeye bırakıldı. Ertesi gün su banyosunda 55 °C'ta 15 dakika bekletildi. Hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildikten sonra buza alındı. DNA'lar mikrodiyalize alınmadan önce agaroz jele yüklemek üzere 1 µl örnek ayrıldı.

30 ml 1X TT içeren petrilere 0,025 µm Millipore membranlar yavaşça yerleştirildikten sonra 5-10 dakika bekletilerek tamponla ıslanarak dengelenmesi sağlandı ve örnekler (~99 µl) membranların ortasına yerleştirildi. Oda sıcaklığında 45 dakika-1 saat süreyle ağzı kapalı olarak bekletildi. Diyaliz sonrasında örnekler

mikropipetle yavaşça alınarak temiz eppendorflara aktarıldı. 1 µl örnek alınarak mikrodializ öncesi ve sonrası örnekler arasındaki farklılıkları gözlemek ve miktar tayini yapmak amacıyla %1'lik agaroz jele yüklendi.

#### 2.4.2. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

Kesim hacmi 22 µl olarak belirlendi. 1 µg DNA için 3 U enzim kullanıldı. Her bir soy için *Hind*III (Roche, 40 U/µl), *Eco*RV (Fermentas, 50 U/µl) ve *Cla*I (Takara, 50 U/µl) enzimleri ile ayrı ayrı kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Her bir kesim tüpüne ilgili soya ait 3 µg genomik DNA, son derişimi 1X olacak şekilde ilgili enzime ait 10X reaksiyon tamponu, 13,5 U enzim ve hacmi tamamlamak üzere ampul su eklenerek hafifçe karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kesim tüplerine kısa bir spin sonrasında 2 µl 6X agaroz jel yükleme boyası eklenerek 0,5X TBE ile hazırlanan % 0,7'lik SeaKem agaroz (Cambrex) jele yüklendi. Jel 55 V'ta 30 dakikanın ardından 80 V'ta yürümeye bırakıldı ve maviler kuyulardan itibaren 20,5 cm'ye gelene kadar yürütüldü. Jelde kullanılan belirteçlerin hazırlanışı aşağıda belirtilmektedir:

λ DNA → 1 µl *Hind*III ile kesilmiş λ DNA + 3 µl 6X agaroz jel yükleme boyası  
+ 24 µl dH<sub>2</sub>O

16S rDNA PCR ürünü (saf; 1 µg/µl) → 1 µl rDNA + 3 µl 6X agaroz jel yükleme boyası + 24 µl dH<sub>2</sub>O

Kullanılan jel: Jel, 465ml %0,7 SeaKem Agaroz içeren elektroforez kasetinde (tarak kalınlığı 1 mm, 51 kuyu. 25X25 cm, BioRad; Sub-Cell® Model 192) hazırlanmakla birlikte elektroforezin ardından, vakumlu transfer cihazına uygun hale getirilmek üzere 19,5X19,5 cm boyutlarında kesildi.

Yürütme sonrasında, konsantrasyonu 10 mg/ml olan EtBr çözeltisi son konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde 0,5X TBE tamponuna eklendi. Jel bu tampon

içinde oda sıcaklığında 20-30 dakika karıştırılarak boyandı. Boyama sonrasında jel 0,5X TBE ile 15 dakika yıkandı. Daha sonra görüntüleme cihazında fotoğraf çekildi.

### 2.4.3. İşaretleme Karışımının Hazırlanışı

#### 2.4.3.1. DIG ile İşaretleme

İşaretlemede DIG Oligonükleotid Kuyruklama Kiti, 2. Jenerasyon (Roche) kullanıldı. Kit bileşenleri karışım tüpüne aşağıda belirtilen miktarlarda konuldu. Tüp içeriği hafifçe karıştırılarak hızlı spin yapıldı ve su banyosunda 37 °C'ta 15 dakika bekletildi. Daha sonra hızlı spin yapılarak çöktürme basamaklarına geçildi. Bunun için tüpe 11 µl 3 M NaAc, pH 5.2, 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8.0, 1 µl glikojen (kit, 20 mg/ml) ve 200 µl % 100 EtOH (soğuk) eklenerek -80 °C'ta 30 dakika bekletildi. +4 °C'ta 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Üzerine 50 µl % 75 soğuk EtOH eklendi. +4 °C'ta 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen çökelekler 10 dakika liyofilizatörde kurutuldu. Kurutma sonrasında peletler 50 µl dH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

20 µl 5X reaksiyon tamponu (DIG kit no: 1)

20 µl CoCl<sub>2</sub> (No: 2)

5 µl dATP (No: 4)

1 µl oligo (her birisi için) (100 pmol/µl MT4-MT5-MT6-MT7-MT8)

5 µl DIG dUTP (No: 5)

5 µl Terminal transferaz

40 µl dH<sub>2</sub>O

#### 2.4.3.2. Radyoizotop ile İşaretleme

İşaretlemede <sup>33</sup>P-γ-ATP kullanıldı. İşaretleme karışımının bileşenleri aşağıda belirtilmiştir. İşaretleme karışımı 37 °C'ta 1 saat boyunca bekletildikten sonra reaksiyon 1 ml 6X SSC eklenerek durduruldu.

1 µl oligo (her birisinden) (10 pmol/µl MT4-MT5-MT6-MT7-MT8)  
 7,5 µl PNK Tampon  
 8,5 <sup>33</sup>P-γ-ATP (4 pmol/µl)  
 2,5 µl DTT 100 mM  
 2,5 µl PNK (10 U/µl)  
 53 µl dH<sub>2</sub>O

#### **2.4.4. Agaroz Jeldeki Bantların Vakumlu Transfer Cihazı ile Membrana Aktarımı**

Fotoğraf alındıktan sonra jel 19,5X19,5 cm boyutlarında kesildi. Jel, üzerine örtecek miktarda denatüran çözeltisi içinde 30 dakika çalkalandı. 20X20 cm boyutlarında kesilmiş olan Hybond membran (Amersham) 2X SSC ile ıslatıldıktan sonra, vakumlu transfer cihazında bulunan porlu yüzey üzerine penset yardımıyla altta hava boşluğu kalmayacak şekilde yerleştirildi. Cihaz ile birlikte sağlanmış olan maskenin ortasından 19X19 cm boyutlarında kare şeklinde bir parça kesilerek çıkarıldı. Maske membran üzerine yerleştirildiğinde membran kenarlardan 1 cm örtecek şekilde hazırlandı. Denatüre edilen jel dH<sub>2</sub>O ile kısa bir yıkama sonrasında maskenin üzerindeki boşluğa, maskenin üzerine, kenarlardan 0,5 cm taşacak şekilde yerleştirildi. Tankın kapağı kapatılarak vidalar ile sıkıştırıldı. 40-50 ml transfer çözeltisi tam ortadan jelin üzerine yavaşça dökülerek tüm yüzeyi kaplaması sağlandı. Vakum pompası açılarak gösterge 55'e ayarlandı. İlk eklenen 50 ml azaldıkça transfer çözeltisi eklenerek sistemden 100 ml çözeltinin geçmesi sağlandı. Jel kuruyana kadar vakum sürdürüldü.

Vakum tamamlandıktan sonra jel maske üzerinden kaldırılarak tekrar EtBr ile boyandı ve UV ışığı altında incelendi. Bu basamak transferin verimliliği hakkında bilgi sağlamaktadır. Membran 2X SSC içinde 1-2 dakika yüzdürülerek agaroz parçaları uzaklaştırıldı. Membran iki kat kaba filtre arasına alınarak 37°C'ta bırakıldı. Membran hibridizasyona alınacak ise 37°C'ta bekleme yerine kaba filtre arasında oda sıcaklığında biraz kurutmak yeterlidir. Daha sonra membranlar UV çapraz bağlayıcıda 12 000 jul/cm<sup>2</sup> uygulanarak 5 dakika tutuldu.

### 2.4.5. Membranın Hibridizasyonu

Çizelge 2.4.'te ribotyping çalışmalarında prob olarak kullanılan Oligomiks-5'i oluşturan oligonükleotitlerin dizi, hedef DNA bölgesi, Td, uzunluk ve konumları belirtilmiştir:

**Çizelge 2.5.** Oligomiks-5'i oluşturan oligonükleotit problemler.

| Hedef      | Prob dizisi                    | Td °C (*) | Uzunluk | Konum (**) |
|------------|--------------------------------|-----------|---------|------------|
| <i>rrs</i> | AGA GTT TGA TC(A,C) TGG CTC AG | 58-60     | 20      | 08-28      |
| <i>rrs</i> | TGA CGG GCG GTG TGT ACA A      | 60        | 18      | 1408-1390  |
| <i>rrl</i> | ACC GAT AGI GAA CCA GTA CCG TG | 68        | 23      | 442-466    |
| <i>rrl</i> | GTA CCI CAA ACC GAC ACA GGT IG | 66        | 23      | 1601-1623  |
| <i>rrl</i> | TTT GGC ACC TCG ATG TCG GCT    | 66        | 21      | 2490-2512  |

(\*) Td °C: Santigrat derece cinsinden ayrılma sıcaklığı.

(\*\*) Brosius ve arkadaşlarının (1978) *E. coli* baz numaralandırma sistemi.

#### 2.4.5.1. DIG İşaretli Oligomiks-5 ile Hibridizasyon

Hibridizasyon çözeltisi önce oda sıcaklığında çözünmeye alındı. Çözünen hübridizasyon çözeltisinin 60 ml'si su banyosunda 60°C'ta tutuldu. Hibridizasyon fırını 68 °C'a ayarlandı. Hibridizasyon şişesi ve 60 ml hibridizasyon sıvısı 1 saat boyunca 68 °C'ta hibridizasyon fırınında bekletildi. Daha sonra çözeltinin 20 ml'si falkona alınarak su banyosunda 54 °C'ta inkübasyona bırakıldı. Membranlar sırt sırta bakacak şekilde rulo yapılarak hibridizasyon şişesine yerleştirildi. 68 °C'ta bekletilen 40 ml hibridizasyon çözeltisi membranların üzerine eklenerek kapağı kapatıldı ve sıvının kuru yüzey kalmayacak şekilde iyice dağılması sağlandı. 1 saat boyunca hibridizasyon fırınında 68 °C'ta orta şiddette döndürülerek ön hibritlemeye alındı.

Ön hibritleme tamamlandıktan sonra hibridizasyon şişesi çıkartılarak soğutuldu ve içindeki sıvı döküldü. Bu arada fırının sıcaklığı 54 °C'a indirildi. Falkona ayrılarak 54 °C'ta bekletilmekte olan 20 ml hibridizasyon çözeltisine 5 µl "digoksijenin" işaretli "oligomix 5" eklendi. Bu karışım hibridizasyon şişesine aktararak sıvının membranın her yerine temas etmesi sağlandı. Membranlar 54 °C'ta hibridizasyon fırınında 16 saat döndürülerek hibritlenmeye bırakıldı. 16 saat sonunda membranlar kaba filtre üzerine alındı.

Hibridizasyon şişesi yıkandı ve hibridizasyon fırınının ısısı 30 °C'a ayarlandı. Membranlar sırt sırta bakacak şekilde dikdörtgen kaba alındı. Üzerine gece boyu 47 °C'ta su banyosunda bekletilmiş olan yıkama tamponu A'dan 200 ml eklendi ve kapağı kapatılarak 47 °C'a ayarlanmış su banyosunda 5 dakika hafifçe çalkalandı. Bu sürenin sonunda kaptaki tampon döküldü. Tampon A'nın kalanı kaba eklenerek su banyosunda 47 °C'ta 5 dakika çalkalandıktan sonra tampon A dökülerek, kaba gece boyu 47 °C'ta su banyosunda bekletilmiş olan yıkama tamponu B'den 200 ml eklendi ve 47 °C'a ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Kaptaki tampon dökülerek membranlar tampon B'nin kalan kısmı ile yıkandı.

Temiz bir kaba 100 ml "işaretleme tamponu 2" eklendi. Tampon B'deki membranlar bu tampona aktarıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandı. Sürenin bitimine 5 dakika kala bir falkon tüpüne 50 ml "işaretleme tamponu 1" ve üzerine 20 µl AP-conjuge Anti-DIG eklenerek karıştırıldı. Böylece antikor 4000 kez seyreltilmiş oldu. 30 dakika sonunda membranlar kaba filtreye alınarak rulo yapıldı ve hibridizasyon şişesine yerleştirildi. Daha önce hazırlanmış olan 50 ml "işaretleme tamponu 1" ve 20 µl AP-conjuge Anti-DIG karışımı hibridizasyon şişesine eklendi. Boşalan falkona tekrar 30 ml "işaretleme tamponu 1" eklenerek karıştırıldı ve hibridizasyon şişesine aktarıldı. Membranlar iyice çalkalanarak ısıtıldı ve 30 °C'a ayarlanmış fırında dönmeye bırakıldı. 30 dakika sonunda membranlar temiz bir kaba alındı. Üzerlerine 200 ml "işaretleme tamponu 1" eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika çalkalandı. Süre sonunda kaptaki sıvı dökülerek yine 200 ml "işaretleme tamponu 1" eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika çalkalandı.

Membranlar ayrı kaplara alınarak üzerlerine 50'şer ml "işaretleme tamponu 3" eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika çalkalandı. Süre sonunda kaplara 75 µl BCIP (0,05 mg/µl) çözeltisi ile 100 µl NBT (0,075 mg/µl) çözeltisi eklendi ve karanlıkta etüvde 37 °C'ta hafifçe çalkalanmaya bırakıldı. Ertesi sabah filtre üzerinde gözlenen bantlar irdelenerek görüntülendi.

#### 2.4.5.2. <sup>33</sup>P işaretli Oligomiks-5 ile Hibridizasyon

Bu yöntemde s. 53'te belirtilen şekilde hazırlanan üç ayrı membran 5X SSPE içinde yıkandı. Üç membran ikisi yüz yüze diğeri sırt sırta olacak şekilde kıvrılarak hibritleme şişesine yerleştirildi. Daha önce 68 °C'ta önceden ısıtılmış olan 50 ml Denhardt çözeltisi hibridizasyon şişesine eklenerek membranlar iyice ıslatıldıktan sonra hibridizasyon fırınında 68 °C'ta minimum dönme hızında 1 saat boyunca döndürüldü. Bu sırada 30 ml Denhardt çözeltisi 54 °C su banyosunda bekletildi. Bir saatin sonunda şişe 68 °C'tan çıkarılarak biraz soğutulduktan sonra içindeki sıvı döküldü. <sup>33</sup>P işaretli Oligonükleotid-5 karışımının tamamı 54 °C su banyosunda bekletilmiş olan 30 ml Denhardt çözeltisine eklenip karıştırılarak homojenize edildikten sonra hibridizasyon şişesine eklendi. Membranların tamamının ıslatıldığından emin olduktan sonra hibridizasyon fırınında 53 °C'ta minimum dönme hızında gece boyu hibridizasyona bırakıldı. Ertesi gün membranlar hibridizasyon fırınından çıkarılmadan önce 2X SSPE 53 °C'taki su banyosunda beklemeye alındı. 23 saatin sonunda membranlar hibridizasyon fırınından çıkarılarak oda sıcaklığına soğutuldu. Fırın 20°C'a ayarlandı. Bu sırada hibritleme çözeltisi şişeden falkona alındı ve şişeye yaklaşık 100 ml 5X SSPE eklenerek hibridizasyon fırınında maksimum dönme hızında 5 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra fırın 54 °C'a ayarlandı. Hibridizasyon şişesindeki 5X SSPE bir kaba alındı ve membranların üzerine 53 °C'ta su banyosunda bekletilmiş olan 30 ml 2X SSPE eklenerek 2 dakika süreyle 54°C'taki hibridizasyon fırınında yıkama gerçekleştirildi. Bu işlemin sonunda membranlar kurutma kağıdı üzerine alındı. Daha sonra her bir membran ayrı ayrı cam üzerine yerleştirilerek streçlendi ve Geiger cihazı ile sayımları yapıldı.

Cam üzerinde streçli halde bulunan membranlar kasetlere yerleştirilerek üzerlerine X-OMAT film konuldu. Kasetler -20 °C'ta 3 gün tutulduktan sonra filmler çıkarılarak banyo edildi. Az sayıda bant gözlenmesi nedeniyle aynı membranlar üzerine tekrar film yerleştirilerek -80 °C'ta bir hafta bekletildikten sonra filmler banyo edildi.

Kasetten çıkarılan film karanlıkta “developer” içinde 5 dakika çalkalandı. Daha sonra dH<sub>2</sub>O içinde yıkanarak “fiksatif” içine alındı ve 10 dakika boyunca çalkalandı. Daha sonra film dH<sub>2</sub>O ile durulanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

## 2.5. ÇÖZELTİLER

**TE, pH 8.0:** Son konsantrasyonda 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ve 0,1 mM EDTA içerecek şekilde istenilen hacimde hazırlanarak 121 °C’ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**% 10 SDS:** 10 g SDS tartıldı. dH<sub>2</sub>O ile çözülerek 100 ml’ye tamamlandı. 121 °C’ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Proteinaz K (20 mg/ml):** 1 ml için, 20 mg Proteinaz K tartıldı. 1 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. -20 °C’ta saklandı.

**5 M NaCl:** 29,2 g NaCl tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml’ye tamamlandı. 121 °C’ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**% 10 CTAB + 0,2 M NaCl:** 1,17 g NaCl tartılarak 80 ml dH<sub>2</sub>O’da çözüldükten sonra içine 10 g CTAB yavaşça eklenerek çözüldü. Çözünmeyi kolaylaştırmak için 60-65°C’ı geçmeyecek şekilde ısı uygulandı. dH<sub>2</sub>O ile 100 ml’ye tamamlanarak 121 °C’ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Kloroform/izoamil alkol (24:1):** 240 ml Kloroform ve 10 ml izoamil alkol alt üst edilerek karıştırıldı. +4 °C’ta saklandı.

**Doyurulmuş fenol çözeltisi:** 0,25 g 8-Hidroksikinolin (son konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde), 250 ml Fenol ve 250 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0 bir beher içine alındı. Beher alüminyum folyo ile sarılarak manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında düşük

hızda 10 dakika karıştırıldı. İki faz ayrıldıktan sonra üst faz uzaklaştırıldı. 250 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0 gerektiği kadar eklendi. Üzerine, içerisinde 250 ml % 0,2  $\beta$ -Merkaptoetanol içeren 250 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0 eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edildi. Üst faz uzaklaştırıldı. Fenol berrak bir görünüme kavuşana kadar 250 ml %0,2  $\beta$ -Merkaptoetanol içeren 0,1 M Tris-HCl ile işlem tekrarlandı. Üst sıvı uzaklaştırılırken, fenolün hava ile etkileşimini engellemek amacıyla bir miktarı bırakıldı. Alüminyum folyoya sarılı olarak koyu renkli bir cam şişe içinde +4 °C'ta saklandı.

**Fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1):** 250 ml Doyurulmuş Fenol ve 250 ml Kloroform/İzoamil alkol (24:1) alt üst edilerek karıştırıldı. +4 °C'ta koyu renkli şişe içinde saklandı.

**% 75 Etil Alkol Çözeltisi:** 75 ml % 100 EtOH alınarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. -20 °C'ta saklandı.

**3 M NaAc, pH 5.2:** 123,05 g NaAc tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlandı. pH 5.2'ye ayarlandı. Manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirilerek 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**TEST:** Son konsantrasyonda 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1 M NaCl ve Triton X-100 1/200 (V/V) içerecek şekilde istenilen hacimde hazırlandı. 121 °C'ta 30 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Lizozim (200 mg/ml):** 130 mg lizozim tartılarak 1X TE ile 650  $\mu$ l'ye tamamlandı. 0,2  $\mu$ m filtreden geçirildi.

**% 25 SDS:** 2,5 gr SDS tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

**% 10 N-lorilsarkozin:** 1 gr N-lorilsarkozin tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

**10X TEK tampon:** Son konsantrasyonda 400 mM Trizma Baze ve 20 mM Titriplex III içerecek şekilde istenilen hacimde hazırlandı. Bunun için, 24,25 g Trizma Baze ve 3,75 g Titriplex III tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 500ml'ye tamamlandı. pH, derişik HCl eklenerek 8.0'a ayarlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

**% 1 Pronaz:** 250 mg Pronaz alınarak 25 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Su banyosunda 37 °C'ta 2 saat inkübe edildi. Eşit hacimlere bölünerek -20 °C'ta saklandı.

**Mutanolizin (5U/μl):** 1mg Mutanolizin tartılarak 1ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. Eşit hacimlere bölünerek -20 °C'ta saklandı.

**RNaz A (20 mg/ml):** 100 mg RNaz A alınarak 5 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. Su banyosunda 90 °C'ta 10 dakika inkübe edilerek inaktivasyon yapıldı. Eşit hacimlere bölünerek -20 °C'ta saklandı.

**TE-Rnaz A (% 0,2):** 10 μl RNaz A (20 mg/ml) ve 10 ml TE, pH 8.0 karıştırıldı. +4 °C'ta saklandı.

**TEK Fenol:** 200 g fenol alınarak üzerine <sup>3</sup>/<sub>4</sub> oranında 1X TEK tampon eklendi. Gece boyu 55 °C'ta çözünmeye bırakıldı. Sabah sütsü çözelti oluşana dek karıştırıldı. Daha sonra dinlenmeye bırakılarak faz ayrımının gerçekleşmesi beklendi ve üst faz uzaklaştırıldı.

**TEK-Fenol-kloroform çözeltisi (1:1):** Eşit hacimde TEK Fenol çözeltisi ile Kloroform karıştırılarak koyu renkli bir cam şişe içinde +4 °C'ta saklandı.

**TEK-fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1):** Eşit hacimde TEK Fenol çözeltisi ile Kloroform-İzoamil alkol (24:1) çözeltisi karıştırılarak koyu renkli bir cam şişe içinde +4 °C'ta saklandı.

**0,5 M EDTA, pH 8.0:** 372,2 g EDTA tartılarak manyetik karıştırıcıda dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. EDTA'nın çözünebilmesi için pH'nın 8.0'a ayarlanması gerekmektedir. Bunun için içine gerekli miktarda NaOH peleti atılarak çözüldü. İstenilen pH değerine ulaşıldıktan sonra 500 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

**Lizozim (10 mg/ml):** 10 mg lizozim, 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 içinde çözülerek 0,2 µm filtreden geçirildi. -20 °C'ta saklandı.

**% 95 EtOH:** 95 ml % 100 EtOH alınarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. -20 °C'ta saklandı.

**50X TAE:** 242 g Trizma Baze, 57,1 ml Glasiyal Asetik Asit ve 100 ml 0,5 M EDTA alınarak dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

**6X Agaroz Jel Yükleme Boyası:** Son konsantrasyonda % 0,15 Bromofenol Mavisi ve % 30 Sukroz / Gliserol içerecek şekilde istenen hacimde hazırlandı.

**Etidyum Bromür (10 mg/ml):** 1 g EtBr, 100 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. pH 8.5'e ayarlandı. 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Koyu renkli bir şişe içinde oda sıcaklığında saklandı.

**10X TT (Tris-Titriplex III) Tamponu, pH 8.0:** Son konsantrasyonda 100 mM Trizma Baze ve 10 mM Titriplex III, pH 8.0 içerecek şekilde istenen hacimde hazırlandı. Bunun için, 1,211 g Trizma Baze ve 0,372 g Titriplex III tartıldı. Derişik HCl ile pH 8.0'a ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika

otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

**RNaz A Tip I-A (2mg/ml için):** 20 mg RNaz A Tip I-A (Sigma R4875/sığır pankreas) tartıldı. Son konsantrasyon 0,05 M olacak şekilde 3 M NaAc, pH 5.2 eklendi. Steril dH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda çözüldü. 15 ml'lik steril falkona alındı. 90 °C'taki su banyosunda 10 dakika bekletildi. 1 ml/tüp olacak şekilde 10 eppendorfa dağıtıldı. -20 °C'ta saklandı.

**1X TT-RNaz çözeltisi:** 500 µl 10X TT, pH 8.0, 4500 µl steril dH<sub>2</sub>O ve 100 µl 2 mg/ml RNazA karıştırıldı. +4 °C'ta saklandı.

**20X SSC:** 175,3 g NaCl ve 88,2 g Na-Sitrat tartıldı. dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. pH 7.4'e ayarlandı. . 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

**20X SSPE:** 174 g NaCl, 27,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 7,4 g EDTA tartıldı. dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. pH, NaOH ile 7.4'e ayarlandı. . 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

**Denhardt (50X):** 2,5 g Fikol 400, 2,5 g Polivinilpirolidon ve 2,5 g sığır serum albumini (BSA) tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 250 ml'ye tamamlandı. Kaba filtre ile süzildükten sonra -20 °C'ta saklandı.

**Prehibridizasyon için Denhardt Çözeltisi:** 28,8 ml dH<sub>2</sub>O (ısıtılmış), 20 ml 20X SSC, 12 ml Denhardt ve 1,2 ml %10 SDS çözeltisi karıştırıldı.

**Transfer çözeltisi:** 1 g NaOH ve 8,77 g NaCl tartıldı. dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Denatürleme çözeltisi:** Son konsantrasyonda 0,5 M NaOH ve 1,5 M NaCl içerecek şekilde hazırlandı. Bunun için, 10 g NaOH ve 43,83 g NaCl tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**%20 N-lorilsarkozin:** 2,5 ml için 0,5 g N-lorilsarkozin tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 2,5 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Hibritleme Çözeltisi:** 25 ml 20X SSC, 1 g Bloklama maddesi (Roche, 1096176), 0,5 ml % 20 N-lorilsarkozin ve 0,2 ml % 10 SDS karıştırıldı. Manyetik karıştırıcıda 70 °C'ta 20-30 dakika karıştırılarak çözüldü. Filtrelenmiş dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. Soğutulup -20 °C'ta saklandı.

**Yıkama Tamponu A (2X SSC; % 0,1 SDS):** 40 ml 20X SSC ve 1,6 ml % 25 SDS alınarak dH<sub>2</sub>O ile 400 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Yıkama Tamponu B (0,1X SSC; % 0,1 SDS):** 2 ml 20X SSC ve 1,6 ml % 25 SDS alınarak dH<sub>2</sub>O ile 400 ml'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**İşaretleme Tamponu 1 (0,1 M Tris HCl, pH 7.5; 0,15 M NaCl):** 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5 ve 50 ml 3 M NaCl alınarak pH, 7.5'e ayarlandıktan sonra dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**İşaretleme Tamponu 2:** 1 g bloklama maddesi tartılarak üzerine 100 ml işaretleme Tamponu 1 eklendi. Manyetik karıştırıcıda 70 °C'ta 30 dakika karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

**İşaretleme Tamponu 3 (AP tamponu = 0,099 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0,05 M MgCl<sub>2</sub>):** 13,32 ml 3 M NaCl, 40 ml 1 M Tris-HCl, pH 9.5 ve 20 ml 1 M

MgCl<sub>2</sub> alınarak pH, 9.5'e ayarlandıktan sonra dH<sub>2</sub>O ile 400 ml'e tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. +4 °C'ta saklandı.

**10X TBE, pH 8.2:** 121,1 g Trizma Baze, 61,83 g Borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 alındı. pH 8.2'ye ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

**BCIP ve NBT Çözeltileri:** 1 tablet BCIP (25 mg/tablet; 0,05 mg/μl) üzerine 500 μl DMF eklenerek son konsantrasyonu 0.05 mg/μl olan BCIP çözeltisi elde edildi. 2 tablet NBT (10 mg/tablet; 0,075 mg/μl) üzerine 200 μl DMF ve 67 μl dH<sub>2</sub>O eklenerek son konsantrasyonu 0.075 mg/μl olan NBT çözeltisi elde edildi.

**Developer (1X):** 1,5 g Metol, 25 g Na-Sülfat, 0,25 g Na-Karbonat ve 3 g Hidrokinon tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında koyu renkli şişede karanlıkta saklandı.

**Fiksatif (1X):** 62,5 g Na-Tiyosülfat ve 5 g K-disülfat tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında koyu renkli şişede karanlıkta saklandı.

**LB:** 10 g Nutrient Broth, 5 g Maya özütü, 8 g NaCl ve 0,52 g Trizma Baze tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlandı. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edildi. +4 °C'ta saklandı.

**Colombia sıvı besi yeri :** 4,6 g Pepton karışımı, 0,2 g nişasta ve 1 g NaCl tartılarak dH<sub>2</sub>O ile 200 ml'ye tamamlandı. pH 7.0-7.2'ye ayarlandı. 121 °C'ta 15 dakika otoklav edildi. +4 °C'ta saklandı.

## 2.6. Kullanılan Primerler

Çizelge 2.5.'te bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen moleküler tiplendirme çalışmalarında kullanılan primerlerin dizileri ve bu dizilerin yerleşimleri belirtilmektedir.

**Çizelge 2.6.** Proje kapsamında kullanılan primerlerin dizileri ve yerleşimleri.

| Primer Adı | Primer Dizisi                  | Açıklama                           |
|------------|--------------------------------|------------------------------------|
| FG 15      | 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'     | 16S PCR_ileri                      |
| FG 35      | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'      | 16S PCR_geri                       |
| FG 45      | 5'-ATTAGATACCCTGGTAGTCC-3'     | 16S Dizi_ileri                     |
| FG 55      | 5'-GGACTACCAGGTATCTAAT-3'      | 16S Dizi_geri                      |
| MT1        | 5'- ACTGCTGCCTCCCGTA-3'        | 16S Dizi_geri                      |
| MT2        | 5'- GCTACACACGTGCTACAATG-3'    | 16S Dizi_ileri                     |
| FG 65      | 5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'       | 16S Dizi_ileri                     |
| MT3        | 5'- CGACATCGAGGTGCCAAA-3'      | <i>rrn</i> PCR_geri                |
| MT4        | 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'     | <i>rrn</i> PCR_ileri ve ribotyping |
| MT5        | 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAA-3'      | ribotyping                         |
| MT6        | 5'- ACCGATAGIGAACCAGTACCGTG-3' | ribotyping                         |
| MT7        | 5'-GTACCICAAACCGACACAGGTIG-3'  | ribotyping                         |
| MT8        | 5'- TTTGGCACCTCGATGTCTGGCT-3'  | ribotyping                         |

## 2.7. Kullanılan Cihazlar

|                                  | <u>Üretici Firma</u>                  |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| +4 °C Soğutucu                   | (ARİSTON NOFROST)                     |
| -20 °C Dondurucu                 | (ARİSTON NOFROST)                     |
| -80 °C Derin Dondurucu           | (HERAEUS INSTRUMENT)                  |
| -80 °C Derin Dondurucu           | (THERMO ELCTRON<br>CORPORATIN, 995-3) |
| Agaroz Gel Elektroforezi Sistemi | (BİOMETRA-AgaGel Mini)                |
| Buz Makinesi                     | (BAR LİNE BF 85)                      |
| Dizi Analiz Cihazı               | (BECKMAN COULTER, CEQ 8000)           |
| Geiger Cihazı                    | (Thermo Electron Corp. 900 EP15)      |
| Güç Kaynağı                      | (BİOLAB-Elite 300 Plus)               |

|                               |                                         |
|-------------------------------|-----------------------------------------|
| Hassas Terazi                 | (SARTORIUS-BL 210S)                     |
| Hibridizasyon Fırını          | (UVP HL-2000 HybriLinker)               |
| İnkübatör                     | (CERTOMAT-BS-T)                         |
| İnkübatör                     | (EDMUNT BÜHLER-TH 15 ve KS 15)          |
| Jel Görüntüleme Monitörü      | (SAMSUNG, Syncmaster 940 BW)            |
| Jel Görüntüleme Monitörü      | (SONY PVM-95E)                          |
| Jel Görüntüleme Sistemi       | (VİLBER LOURMAT TFX-20M)                |
| Jel Görüntüleme Sistemi       | (VİLBER LOURMAT, Infinity-3026 WL/26M)  |
| Jel Görüntüleme Yazıcısı      | (SONY UP-890 CE)                        |
| Jel Görüntüleme Yazıcısı      | (SONY, Digital Graphic Printer UP-D897) |
| Labotron                      | (INFORS AG, Labotron HT)                |
| Liyofilizatör Soğutucu Motoru | (JOUAN RCT 90)                          |
| Liyofilizatör Vakum Motoru    | (ALCATEL- Pascal 2005 C1)               |
| Liyofilizatör                 | (JOUAN RC-10.10)                        |
| Manyetik Karıştırıcı          | (HEIDOLPH MR3001)                       |
| Masa Üstü Santrifüj           | (BECKMAN COULTER, Allegra 25R)          |
| Masa Üstü Santrifüj           | (BECKMAN COULTER, Microfuge 18)         |
| Masa Üstü Santrifüj           | (HERAEUS, Labofuge 400R)                |
| Masa Üstü Santrifüj           | (HERAEUS, Sepatech, Biofuge 15R)        |
| Mikrodalga Fırın              | (BEKO-1550)                             |
| Orbital Karıştırıcı           | (BIOMETRA WT 12)                        |
| Otoklav                       | (HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50)               |
| Otoklav                       | (VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300)       |
| Otomatik Pipet (1000 µl)      | (GILSON)                                |
| Otomatik Pipet (2 µl)         | (GILSON)                                |
| Otomatik Pipet (20 µl)        | (GILSON)                                |
| Otomatik Pipet (200 µl)       | (GILSON)                                |
| PCR Cihazı                    | (BIOMETRA T3 Thermocycler)              |
| pH Metre                      | (İNOLAB pH LEVEL 1)                     |
| Spektrofotometre              | (BİORAD-Smartspec 3000)                 |
| Steril Kabin                  | (HERAEUS-Herasafe-HS 12)                |

|                                         |                                                     |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Sterilizasyon fırını                    | (BINDER-ED115)                                      |
| Su Banyosu                              | (GFL 1083)                                          |
| Su Banyosu                              | (JULABO-SW 21)                                      |
| Tek Kullanımlık Steril Filtre (0,22 µm) | (SCHLEİCHER&SCHUELL10462200)                        |
| Terazi                                  | (PRECISA, 1200C)                                    |
| Terazi                                  | (SARTORIUS-BL 3100)                                 |
| UV Transillüminatör                     | (VİLBER LOURMAT-V026347)                            |
| Vorteks                                 | (IKA-MS 2-Minishaker)                               |
| Vorteks                                 | (SCIENTIFIC INDUSTRIES, Vortex-<br>Gene 2, G-560 E) |

## 2.8. Kullanılan Sarf Malzemeleri

|                                                   | <u>Üretici Firma</u> |
|---------------------------------------------------|----------------------|
| β-Merkaptoetanol                                  | (SIGMA M-6250)       |
| 6X Agaroza yükleme çözeltisi                      | (FERMENTAS #R0619)   |
| 8-Hidroksikinolin                                 | (MERCK 1.07098)      |
| Agaroz                                            | (SIGMA A-6013)       |
| Bacto™ Agar                                       | (BD 214010)          |
| Bloklama maddesi                                  | (ROCHE 1 096 176)    |
| Borik asit                                        | (SIGMA B-7660)       |
| Sığır serum albumini (BSA)                        | (SIGMA A7906)        |
| Bromofenol Blue                                   | (SIGMA B-6131)       |
| <i>CfoI</i>                                       | (ROCHE)              |
| <i>ClaI</i>                                       | (TAKARA)             |
| Renksiz Tampon                                    | (PROMEGA)            |
| CTAB                                              | (SIGMA H6269)        |
| DIG Oligonükleotit Kuyruklama Kiti, 2. Jenerasyon | (ROCHE)              |
| DNA polimeraz                                     | (ROCHE)              |
| <i>EcoRV</i> ( <i>Eco321</i> )                    | (FERMENTAS)          |
| EDTA                                              | (SIGMA E-5134)       |
| Etanol                                            | (MERCK 1.11727)      |
| Etidyum Bromür                                    | (SIGMA E-7637)       |

|                                                |                        |
|------------------------------------------------|------------------------|
| Fenol                                          | (MERCK 100200)         |
| Ficoll                                         | (SIGMA F-2637)         |
| Gene Ruler™ 100 bp DNA Belirteci               | (FERMENTAS<br>#SM0249) |
| GenomeLab™ Yöntem Geliştirme Kiti              | (BECKMAN COULTER)      |
| Glasiyal Asetik Asit                           | (MERCK 1.00063)        |
| Gliserol                                       | MERCK (RIEDEL15524)    |
| Go Taq Polimeraz                               | (PROMEGA)              |
| HCl                                            | (MERCK 1.00314)        |
| Hidrokinon                                     | (MERCK 1.04610)        |
| <i>Hind</i> III                                | (ROCHE)                |
| İzoamil alkol                                  | (MERCK 1.00978)        |
| İzopropanol                                    | (MERCK 1.00995)        |
| Kloroform                                      | (MERCK 1.02431)        |
| Lizozim                                        | (ROCHE 1 243 004)      |
| LPA jel                                        | (BECKMAN COULTER)      |
| Magnezyum Klorür                               | (MERCK 1.05832)        |
| Maya Özütü                                     | (MERCK 1.03753)        |
| <i>Mbo</i> II                                  | (TAKARA)               |
| Metafor Agaroz                                 | (CAMBREKS 50180)       |
| Metanol                                        | (RIEDEL 32313)         |
| Metol (4-(methylamino)-phenosulfat)            | (MERCK 1.07299)        |
| 0,025 µm Millipore membran                     | (Millipore H6BN43509)  |
| NaAc                                           | (RIEDEL 25022)         |
| NaCl                                           | (SIGMA S9888)          |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | (RIEDEL 04269)         |
| NaOH                                           | (MERCK 1.06462)        |
| NBT                                            | (SIGMA N-5514)         |
| Nişasta                                        | (SIGMA S2630)          |
| N-lorilsarkozin                                | (SIGMA L5125)          |
| Nutrient Broth                                 | (DIFCO 234000)         |
| Pepton karışımı (Bacto™ Protease Peptone No.3) | (BD 211693)            |
| Polivinilpirolidon                             | (SIGMA P-5288)         |
| Potasyum disülfid                              | (MERCK 1.05056)        |

|                                         |                   |
|-----------------------------------------|-------------------|
| Proteinaz K                             | (ROCHE 1 373 196) |
| RNaz A Tip I-A                          | (SIGMA)           |
| <i>Sau3AI</i>                           | (TAKARA)          |
| SDS                                     | (MERCK 822050)    |
| SeaKem AgaroZ                           | (CAMBREX)         |
| Sodyum Karbonat                         | (MERCK 1.06392)   |
| Sodyum Sitrat                           | (SIGMA S-4641)    |
| Sodyum Sülfat                           | (SIGMA S4672)     |
| Sodyum Tiyosülfat                       | (MERCK 1.06516)   |
| Taq DNA Polimeraz Tamponu               | (ROCHE)           |
| Titriplex III                           | (MERCK 108418)    |
| Tris-HCl                                | (MERCK 108986)    |
| Triton X-100                            | (SIGMA T8532)     |
| Trizma Baz                              | (SIGMA T-1503)    |
| Wizard® Genomik DNA Saflaştırma Kiti    | (PROMEGA)         |
| Wizard® SV Jel ve PCR Arındırma Sistemi | (PROMEGA)         |

### 3. BULGULAR

#### 3.1. GENOMİK DNA ÖZÜTLEMELERİ

Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen genomik DNA'lar arasından her soy için en iyi verimin elde edildiği örnekler seçilerek moleküler tiplendirme çalışmalarına alındı. Çalışmalarda kullanılan genomik DNA'ların izolasyon yöntemleri ve derişimleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1. Seçilen genomik DNA'ların izolasyon yöntemleri ve derişimleri.** Hızlı yöntemde hücreler kültürün altıncı saatinde çöktürülerek izolasyon basamaklarına geçildi. O/N hızlı yöntemde ise izolasyon kültürler gece boyu büyütüldükten sonra gerçekleştirildi. CTAB yöntemi ile izole edilen örneklerin bir kısmı daha önceki ribotyping çalışmalarında kullanılmak üzere mikrodializ aşamasından geçirilmişti; bu örneklerin dializ edildiği parantez içinde belirtilmiştir.

| İZOLAT ADI                        | GENOMİK DNA İZOLASYON YÖNTEMİ | KONSANTRASYON (µg/µl) |
|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| L1                                | CTAB                          | 0,4                   |
| L3                                | HIZLI YÖNTEM (O/N)            | 1,5                   |
| L5                                | CTAB                          | 3                     |
| L6                                | CTAB                          | 3                     |
| L8                                | CTAB                          | 5                     |
| L10                               | CTAB                          | 2                     |
| L13                               | CTAB                          | 2                     |
| L14                               | PROMEGA KİT                   | 0,2                   |
| L15                               | CTAB                          | 0,35                  |
| L16                               | PROMEGA KİT                   | 0,2                   |
| L21                               | CTAB                          | 0,25                  |
| L22                               | PROMEGA KİT                   | 0,2                   |
| P17                               | CTAB                          | 0,3                   |
| P19                               | PROMEGA KİT                   | 0,2                   |
| P20                               | O/N HIZLI YÖNTEM              | 0,2                   |
| P21                               | HIZLI YÖNTEM                  | 0,2                   |
| P22                               | PROMEGA KİT                   | 0,5                   |
| P24                               | O/N HIZLI YÖNTEM              | 0,3                   |
| A3                                | CTAB (DİYALİZ)                | 0,3                   |
| A4                                | PROMEGA KİT                   | 0,3                   |
| A7                                | CTAB                          | 0,3                   |
| A18                               | CTAB                          | 1                     |
| A23                               | CTAB                          | 5                     |
| A26                               | CTAB                          | 0,3                   |
| A28                               | O/N HIZLI YÖNTEM              | 0,2                   |
| 1A1                               | CTAB (DİYALİZ)                | 1                     |
| 5A1                               | CTAB (DİYALİZ)                | 0,6                   |
| 6A5                               | HIZLI YÖNTEM                  | 0,6                   |
| 7A36                              | PROMEGA KİT                   | 0,5                   |
| 8A3                               | PROMEGA KİT                   | 0,25                  |
| 9A20                              | O/N HIZLI YÖNTEM              | 1,5                   |
| 10A5                              | CTAB (DİYALİZ)                | 0,5                   |
| 13A10                             | CTAB (DİYALİZ)                | 0,6                   |
| 27E3                              | CTAB                          | 1                     |
| 29A1                              | CTAB (DİYALİZ)                | 0,5                   |
| 61A1                              | CTAB                          | 1                     |
| <i>Xenorhabdus sp.</i> CIP 105189 | CTAB                          | 2                     |

## 3.2. PCR

### 3.2.1. 16S rDNA PCR

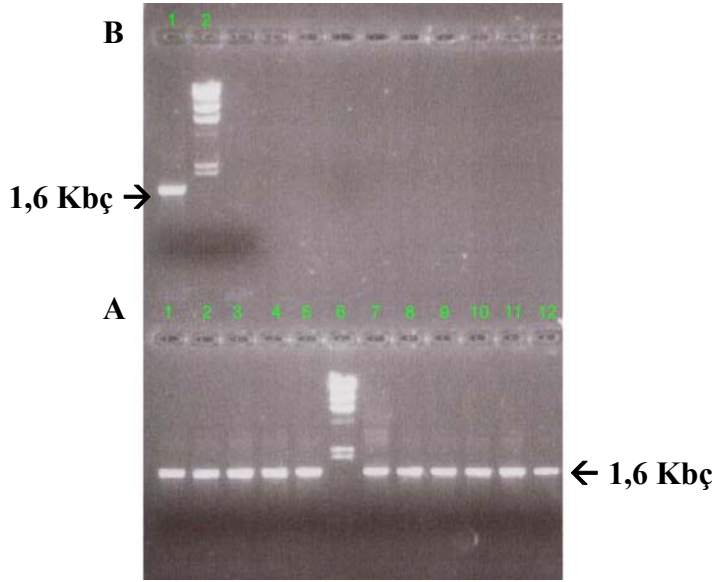
Ayrıntıları “Yöntemler 2.2.1. 16S rDNA’ların PCR ile Çoğaltılması Bölümünde” verilen PCR programı kullanılarak, 25 yerel izolatın 16S rDNA’ları 25 µl toplam reaksiyon hacminde elde edildi. Dizi analizine alınmadan önce Wizard® SV Jel and PCR Saflaştırma Sistemi (Promega) kiti kullanılarak saflaştırılan 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri Çizelge 3.2.’de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.2.** Yerel *Bacillus* izolatlarından elde edilen 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri.

| İZOLAT ADI | SAFLAŞTIRMA ÖNCESİ KONSANTRASYON (µg/µl) | SAFLAŞTIRMA SONRASI KONSANTRASYON (µg/µl) |
|------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| L1         | 0,1                                      | 0,25                                      |
| L3         | 1                                        | 1                                         |
| L5         | 0,3                                      | 3                                         |
| L6         | 0,5                                      | 3                                         |
| L8         | 1,33                                     | 1                                         |
| L10        | 1                                        | 1                                         |
| L13        | 0,5                                      | 3                                         |
| L14        | 1,2                                      | 0,5                                       |
| L15        | Miktar tayini yapılmadı.                 | 0,5                                       |
| L16        | 0,6                                      | 0,25                                      |
| L21        | 1,5                                      | 3                                         |
| L22        | 1,2                                      | 0,5                                       |
| P17        | Miktar tayini yapılmadı.                 | 0,75                                      |
| P19        | 1,2                                      | 3                                         |
| P20        | 1,2                                      | 3                                         |
| P21        | 1,5                                      | 3                                         |
| P22        | 0,15                                     | 0,15                                      |
| P24        | 0,2                                      | 2,5                                       |
| A3         | 0,4                                      | 0,5                                       |
| A4         | Miktar tayini yapılmadı.                 | 0,75                                      |
| A7         | 0,5                                      | 2,5                                       |
| A18        | 0,8                                      | 2,5                                       |
| A23        | 0,8                                      | 3                                         |
| A26        | 1                                        | 0,5                                       |
| A28        | Miktar tayini yapılmadı.                 | 0,75                                      |

11 referans soy ile miktarı yeterli bulunmayan P22 için aynı PCR programı kullanılarak 50 µl toplam reaksiyon hacminde 16S rDNA PCR gerçekleştirildi ve PCR ürünlerinden 1 µl alınarak % 1’lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı (Şekil 3.1.).

Elde edilen 16S rDNA PCR ürünleri Wizard® SV (Promega) kiti ile saflaştırıldı. Çizelge 3.3.'te P22 ve referans soylardan elde edilen 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri görölmektedir.



**Şekil 3.1. 16S rDNA PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A: 1, P22; 2, 1A1; 3, 5A1; 4, 6A5; 5, 7A36; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, 8A3; 8, 9A20; 9, 10A5; 10, 13A10; 11, 27E3; 12, 29A1. B: 1, 61A1; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç).**

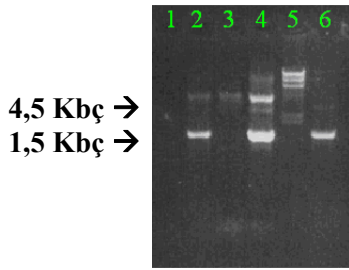
**Çizelge 3.3. 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası derişimleri.**

| İZOLAT ADI | SAFLAŞTIRMA ÖNCESİ DERİŞİM ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | SAFLAŞTIRMA SONRASI DERİŞİM ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) |
|------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| P22        | 0,5                                                      | 0,6                                                       |
| 1A1        | 0,5                                                      | 0,5                                                       |
| 5A1        | 0,5                                                      | 0,75                                                      |
| 6A5        | 0,5                                                      | 0,75                                                      |
| 7A36       | 0,5                                                      | 0,15                                                      |
| 8A3        | 0,5                                                      | 1                                                         |
| 9A20       | 0,5                                                      | 0,3                                                       |
| 10A5       | 0,5                                                      | 0,3                                                       |
| 13A10      | 0,5                                                      | 0,15                                                      |
| 27E3       | 0,5                                                      | 0,5                                                       |
| 29A1       | 0,5                                                      | 0,25                                                      |
| 61A1       | 0,5                                                      | 0,75                                                      |

### 3.2.2. *rrn*-PCR

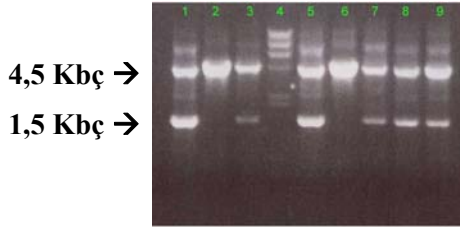
*Bacillus* sp. A28, L15, P22 ve P17 yerel izolatları ile yapılan *rrn*-PCR denemesinde, toplam 75  $\mu\text{l}$  reaksiyon hacminde FG15 ve FG25 primerlerinin her

birisinden 30 pmol ve tüp başına 4 ünite *Taq* DNA polimeraz (Roche) kullanıldı. PCR, Program 8’de tutunma sıcaklığı 60 °C seçilerek gerçekleştirildi. Elde edilen *rrn*-PCR ürünlerinden 7 µl ve P17 16S rDNA PCR ürününden 1 µl alınarak % 1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.2.). 4,5 kbç büyüklüğündeki *rrn* operonu ile birlikte, 16S rDNA PCR ürünü büyüklüğüne yakın, yaklaşık 1,5 kbç, ikinci bir PCR ürününün daha çoğaldığı gözlemlendi. A28 soyundan PCR ürünü elde edilemedi. Buna karşın P22 ile yalnızca 4,5 kbç büyüklüğündeki PCR ürünü çoğaldı. 4,5 kbç için verimin tüm soylar için düşük olduğu gözlenirken, 1,5 kbç ile uyumlu ikinci bir PCR ürününü veren L15 ve P17 soyları için 1,5 kbç’lik bandın 4,5 kbç’lik banda göreceli baskın olduğu gözlemlendi.



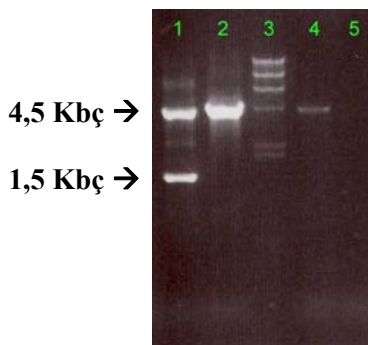
**Şekil 3.2. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, A28; 2, L15; 3, P22; 4, P17; 5, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 6, P17 kesilmemiş 16S-PCR ürünü.

*rrn*-PCR yöntemini optimize etmek amacıyla reaksiyonlarda kalıp olarak P17, L15, *E. coli* ATCC 11105 ve P22 soylarının kullanıldığı iki farklı yaklaşım denendi. Program 2’de tutunma sıcaklığı 63 °C’ta ilk on döngünün ardından, yirmi döngü boyunca, iki döngüde bir 0,5 °C arttırılarak 68 °C’a kadar çıkarıldı. Diğer programda (3) ise tutunma sıcaklığı 64 °C’ta sabit tutuldu. Toplam 25 µl reaksiyon hacminde 15’er pmol FG15 ve FG25 primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyonların tamamlanmasından sonra *rrn*-PCR ürünlerinden 5 µl alınarak % 1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.3.). Buna göre her iki program ile 4,5 kbç’lik PCR ürününe ek olarak 1,5 kbç’lik ikincil PCR ürünü ve ekstra bantlar gözlemlendi. P22 her iki programda da daha önce de olduğu gibi, sadece 4,5 kbç beklenen PCR ürününü verdi.



**Şekil 3.3. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-64 °C; 2, P22-64 °C; 3, ATCC 11105-64 °C; 4, *Hind*III ile kesilmiş λ DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 5, P17-(63-68 °C); 6, P22-(63-68 °C); 7, ATCC 11105-(63-68 °C); 8, L15-(63-68 °C); 9, ATCC 53926-(63-68 °C).

Primer tutunma sıcaklığının daha fazla artırılarak reaksiyonun özgülleştirilmesi amacıyla P22 ve P17 soyları ile iki farklı tutunma sıcaklığında *rrn*-PCR gerçekleştirildi. İlk programda (4) tutunma sıcaklığı 67 °C'ta, diğer programda 70 °C'ta sabit tutuldu. Her bir soy için 25 µl reaksiyon karışımına FG15 ve FG25 primerlerinin her birisinden 15 pmol eklendi. Tüp başına 1 U *Taq* DNA polimeraz (Roche) kullanıldı. Reaksiyon bitince *rrn*-PCR ürünlerinden 5 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.4.). 67 °C tutunma sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda P17 soyu 4,5 kbç PCR ürününe ek olarak 1,5 kbç ikinci bir güçlü bant verdi. P22 için ise aynı sıcaklıkta sadece ilgilenilen 4,5 kbç'lik ürünün yüksek verimle çoğaldığı gözlemlendi. 70 °C tutunma sıcaklığında (program 5) P17 soyunda özgün olmayan 1,5 kbç PCR ürününün çoğalmadığı, bununla birlikte ilgilenilen 4,5 kbç ürünün veriminin de düştüğü gözlemlendi. Aynı tutunma sıcaklığında P22 soyu için ürün elde edilemedi.



**Şekil 3.4. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-67 °C; 2, P22-67°C; 3, *Hind*III ile kesilmiş λ DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 4, P17-70 °C; 5, P22-70 °C.

PCR veriminin ve özgüllüğünün arttırılabilmesi amacıyla farklı DNA polimerazların denenmesine karar verildi. Bu amaçla *Taq* DNA polimeraz (Roche) ve Go *Taq* DNA polimeraz (Promega)'ın kullanıldığı PCR'lar planlandı. P17, P22,

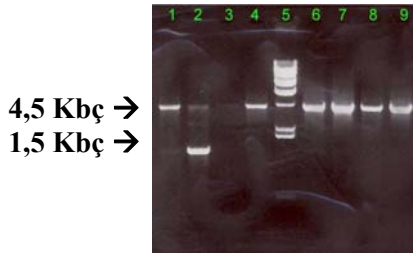
L15 ve A28 soyları ile tutunma sıcaklığı 63 °C olan 7 nolu programda her iki enzimle *rrn*-PCR'lar gerçekleştirildi. 25 µl reaksiyon hacmi için her bir PCR tüpüne FG15 ve FG25 primerlerinin her birisinden 15 pmol eklendi ve tüp başına 0,9 U enzim kullanıldı. Go *Taq* için reaksiyon tamponu olarak enzim ile birlikte sağlanan MgCl<sub>2</sub> içermeyen 5X renksiz tampon kullanıldı. Bu nedenle Go *Taq* ile gerçekleştirilecek reaksiyonlara 1,5 mM son derişimde MgCl<sub>2</sub> eklendi. Reaksiyonlar sonlanınca *rrn*-PCR ürünlerinden 5 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.5.). *Taq* DNA polimeraz (Roche) ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda dört soy için de PCR ürünü elde edilemedi. Go *Taq* DNA polimeraz (Promega) ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda verim düşük olmakla birlikte P22 için sadece ilgilenilen 4,5 kbç PCR ürünü gözlenirken, P17, L15 ve A28 için 4,5 kbç zayıf DNA bandına ek olarak 1,5 kbç büyüklüğünde ikincil ürün de gözlendi.



**Şekil 3.5. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-Roche *Taq*; 2, P22-Roche *Taq*; 3, L15-Roche *Taq*; 4, A28-Roche *Taq*; 5, *Hind*III ile kesilmiş λ DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 6, P17-“Green”; 7, P17-Go *Taq*; 8, P22-Go *Taq*; 9, L15-Go *Taq*; 10, A28-Go *Taq*.

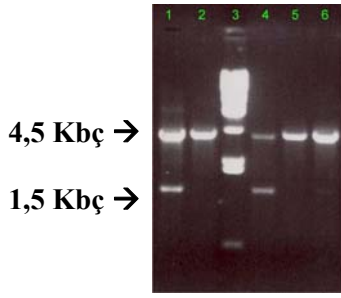
Bir önceki denemede *Taq* DNA polimeraz (Roche) ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında ürün elde edilememesi nedeniyle daha yeni bir enzim örneğinin kullanımına karar verildi. İyi çalıştığı bilinen primerlerin tekrarlayan dondurup-çözme döngüleri ile hasar görebildiği bilinmektedir. Her ne kadar primerler küçük hacimlerde saklansalar da FG15 ve FG25 primerleri yeniden sentezletildi. Bu çalışmada FG15-FG25 primer çifti ve yeni sentezletien eşlenikleri, MT3-MT4 primer çifti ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla Roche *Taq* ve Go *Taq* DNA polimeraz kullanıldı. PCR'ın her iki primer çifti ile tutunma sıcaklığının 63 °C'ta sabit tutulduğu program 7'de yapılmasına karar verildi. 25 µl reaksiyon hacmine kullanılacak ileri ve geri primerlerin her birisinden 15 pmol ve tüp başına 0,9 U enzim eklendi. *rrn*-PCR ürünlerinden 5 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi

(Şekil 3.6.). Roche *Taq* ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda (Şekil 3.6.) P17 soyu için FG15-FG25 primer çifti ile elde edilen 4,5 kbç ürün miktarı MT3-MT4 primer çifti ile elde edilene görece daha yüksek bulundu. Bu soy için MT3-MT4 primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonda 1,5 kbç ikincil ürünün de çok güçlü bir şekilde çoğaldığı gözlemlendi. P22 soyu için MT3-MT4 primer çifti ile, FG15-FG25 primer çifti ile elde edilene görece daha yüksek miktarda 4,5 kbç ürün elde edildi. FG15-FG25 primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonda 1,5 kbç ikincil ürün gözlenmezken, MT3-MT4 primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonda 1,5 kbç bant çok zayıf gözlemlendi. Go *Taq* ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda (Şekil 3.6.), her iki primer çifti ile elde edilen 4,5 kbç PCR ürünlerinin verimi birbirine yakın olup, ürün miktarı Roche *Taq* ile elde edilenlere görece çok daha yüksek bulundu. P17 soyu için her iki primer çiftiyle de çok zayıf olmakla birlikte, 1,5 kbç ikincil PCR ürünü gözlenirken, P22 soyunda bu bant gözlenmedi.



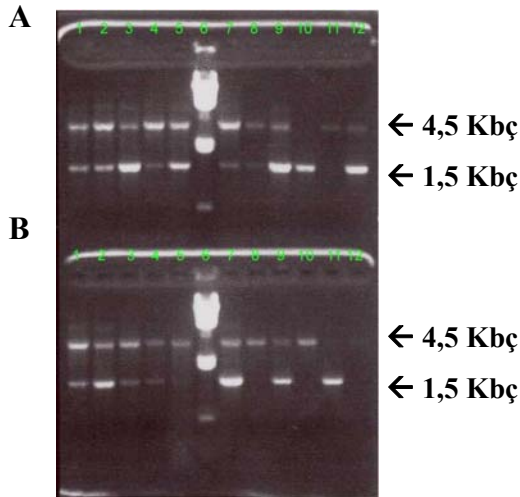
**Şekil 3.6. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-FG-Roche *Taq*; 2, P17-MT-Roche *Taq*; 3, P22-FG-Roche *Taq*; 4, P22-MT-Roche *Taq*; 5, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 6, P17-FG-Go *Taq*; 7, P17-MT-Go *Taq*; 8, P22-FG-Go *Taq*; 9, P22-MT-Go *Taq*.

Bir önceki denemede MT3-MT4 primer çifti ve Go *Taq* Polimeraz ile elde edilen verimli sonuçlar nedeniyle bundan sonraki çalışmalara bu primer çifti ve enzimle devam edilmesine karar verildi. P17, P22, 7A36, 6A5 ve 8A3 soyları ile aynı koşullarda 7 nolu programda, toplu üretim amacıyla üçer tüplük *rrn*-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra her bir soya ait tüpler birleştirildi ve *rrn*-PCR ürünlerinden 5  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.7.). Buna göre P22 ve 7A36 soyları ile 1,5 kbç ikincil PCR ürünü gözlenmezken, bu bandın 8A3 için çok zayıf, P17 ve 6A5 için çok güçlü olduğu görüldü. 6A5 dışındaki tüm soylar için 4,5 kbç PCR ürününün miktarı göreceli yüksek bulundu.

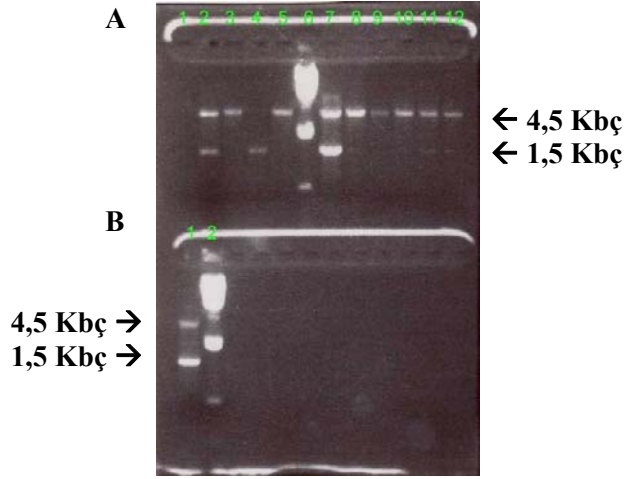


**Şekil 3.7. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17; 2, P22; 3, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 4, 6A5; 5, 7A36; 6, 8A3.

P17 ve P22 dışındaki tüm yerel soylar ve 11 referans soy ile birer tüp MT3-MT4 primer çifti ve Go *Taq* DNA polimeraz kullanılarak aynı koşullarda (program 7) *rrn*-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 5  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.8. ve 3.9.). L16, A18, A26 dışındaki tüm soylarda, bazılarında çok zayıf olmakla birlikte, 1,5 kbç ikincil PCR ürünü gözlemlendi. A28 soyunun kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonda 4,5 kbç ürünün ancak 5-10 ng olduğu, L15'in kullanıldığı reaksiyonda ise sadece 1,5 kbç ürünün çoğaldığı görüldü. Diğer soylar için 4,5 kbç ürün miktarının 50-200 ng arasında değiştiği gözlemlendi.



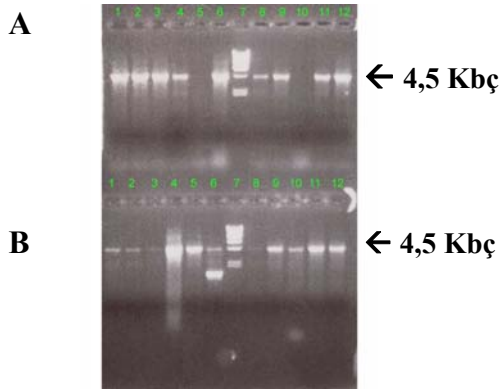
**Şekil 3.8. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** A: 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, L10; 8, L13; 9, L14; 10, L15; 11, L16; 12, L21. B: 1, L22; 2, P19; 3, P20; 4, P21; 5, P24; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, A3; 8, A4; 9, A7; 10, A18; 11, A23; 12, A26.



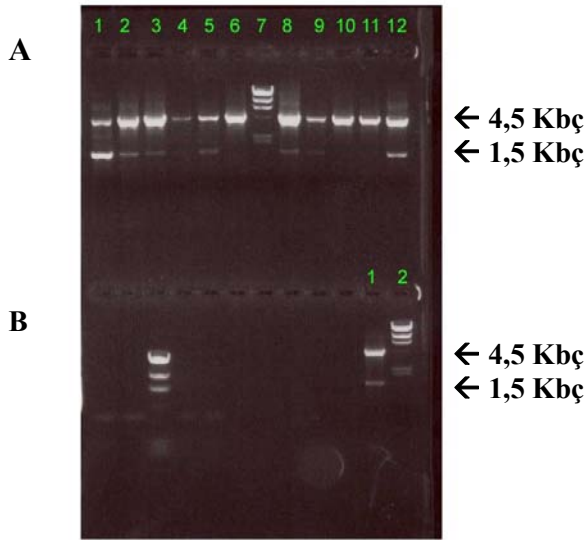
**Şekil 3.9. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A: 1, A28; 2, 1A1; 3, 5A1; 4, 6A5; 5, 7A36; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, 8A3; 8, 9A20; 9, 10A5; 10, 13A10; 11, 27E3; 12, 29A1. B: 1, 61A1; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç).**

Standart olarak belirlenen koşullarda (Program 7) yapılan çeşitli denemeler sonucunda; 4,5 kbç *rrn*-PCR ürününün verimi bazı örnekler için düşük bulunmuş, soyların hemen tümünde, ~1,5 kbç ürünün çoğalması engellenememiştir. Bu, ürünün ARDRA analizlerini olumsuz etkileyeceği düşünüldüğünden çoğalmasını engellemek üzere PCR koşullarını optimize etmeye yönelik diğer çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Program 2’de primer tutunma sıcaklığı ilk on döngüde 63 °C’ta sabit tutulup sonraki 20 döngü boyunca iki döngüde bir 0,5 °C arttırılarak 68 °C’a ulaşıldı. Program 1’de tutunma sıcaklığı reaksiyon boyunca 64 °C’ta sabit tutulurken, 72 °C’taki sentez basamağı ilk on döngüden sonraki yirmi döngü boyunca 2 döngüde bir 20 saniye uzatıldı. *rrn*-PCR ürünlerinden 5 µl alınarak % 1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.10. ve 3.11.). 2 nolu program ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda A7 soyu 1,5 kbç ikincil PCR ürününü çok güçlü üretti. Bu programda geriye kalan soyların hiçbirisinde 1,5 kbç bant gözlenmedi. L15 soyu ile elde edilen 4,5 kbç bandın 20-30 ng olduğu, diğer soylar için ise 50-400 ng arasında değiştiği görüldü. 1 nolu programda sadece P22 soyunda 1,5 kbç ürün gözlenmedi. Buna karşın geriye kalan tüm soylar için bazıları çok düşük miktarlarda olmakla birlikte 1,5 kbç ikincil PCR ürünü gözlemlendi. Bu programda hemen hemen tüm soylar için 4,5 kbç ürününün verimi çok yüksek bulundu.

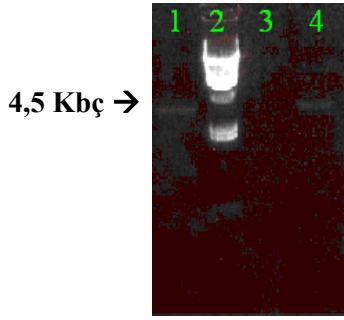


**Şekil 3.10. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 28. A: 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, L10; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, L13; 9, L14; 10, L15; 11, L21; 12, L22. B: 1, P19; 2, P20; 3, P21; 4, P24; 5, A3; 6, A7; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, A23; 9, 1A1; 10, 6A5; 11, 8A3; 12, 61A1.**



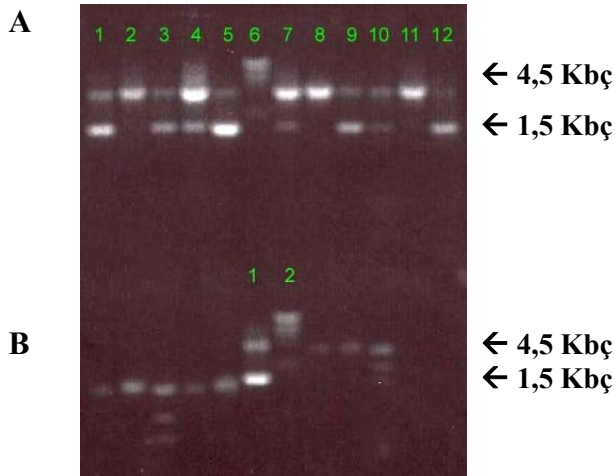
**Şekil 3.11. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 26. A: 1, L16; 2, A4; kuyu 3, A18; 4, A26; 5, 5A1; 6, 7A36; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, 9A20; 9, 10A5; 10, 13A10; 11, 27E3; 12, 29A1. B: 1, A28; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç).**

Bir önceki denemede 2 nolu program ile iyi sonuç elde edildiği için 27E3, A3 ve A23 için aynı programda toplu üretime gidildi, ancak istenilen verim alınamadı. *rrn*-PCR ürünlerinden 5  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.12.).



**Şekil 3.12. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-MT-Go *Taq*; 2, A3; 3, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 4, A23; 5, 27E3.

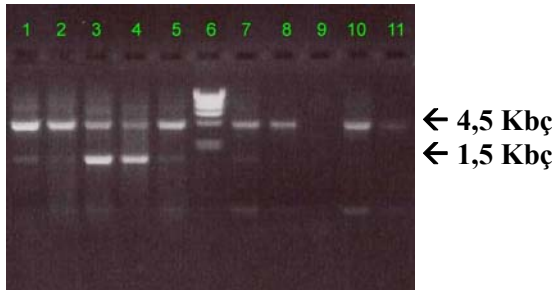
A4, A28, 7A36, 27E3 ve 5A1 soyları için program 1, A3, L1, 6A5 ve 8A3 soyları için program 2, P17 ve P22 soyları için program 7 kullanılarak *rrn*-PCR gerçekleştirildi. Her bir soy için tüpler birleştirildikten sonra, *rrn*-PCR ürünlerinden 5  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.13.). L1 (ince cidarlı tüpte) ve P22 soyları ile yalnızca 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünü elde edilirken, diğer soylar ile 4,5 kbç yanı sıra belirgin 1,5 kbç bant da gözlemlendi.



**Şekil 3.13. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** A: 1, L1; 2, L1-ince cidar; 3, A3; 4, A4; 5, A28; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, P17; 8, P22; 9, 5A1; 10, 6A5; 11, 7A36; 12, 8A3. B: 1, 27E3; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç).

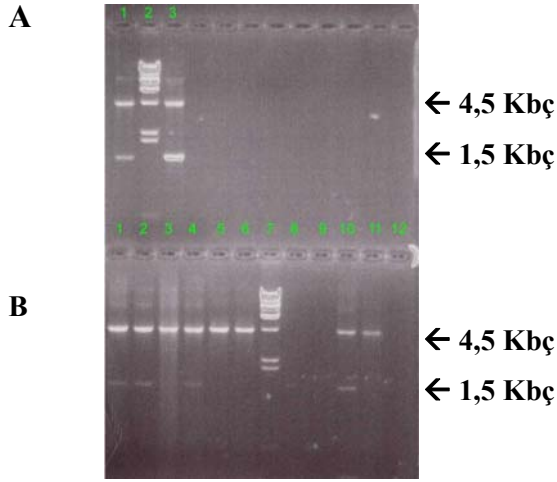
Genomik DNA'nın küçük fragmanlardan temizlenmesi için gerçekleştirilen mikrodializ sonrasında, *rrn*-PCR'da kullanılan enzim ve PCR tüpünün ürün kalitesine etkisini gözlemlemek amacıyla mikrodializ sonrası ve öncesi örnekler için farklı DNA polimerazlar kullanılarak Program 1'de 0,2 ml ince cidarlı ve 0,5 ml kalın cidarlı tüplerle *rrn*-PCR yapıldı. *rrn*-PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde

görüntülendi (Şekil 3.14.). Buna göre; 0,2 ml PCR tüpünün kullanıldığı reaksiyonlarda tüm enzimlerle özgün olmayan PCR ürünü miktarı daha düşük görülmüş, buna karşın 0,5 ml PCR tüplerinde özgün olmayan ürünün miktarı özgül olana görece yüksek bulunmuştur. Kullanılan üç farklı DNA polimerazdan Go *Taq* DNA polimerazın verimi diğerlerinden yüksek bulunmuştur. Diyaliz edilmiş kalıp DNA'nın kullanıldığı reaksiyonlarda özgül olmayan ürün miktarı daha düşük bulunmakla birlikte, çoğalması engellenememiştir.



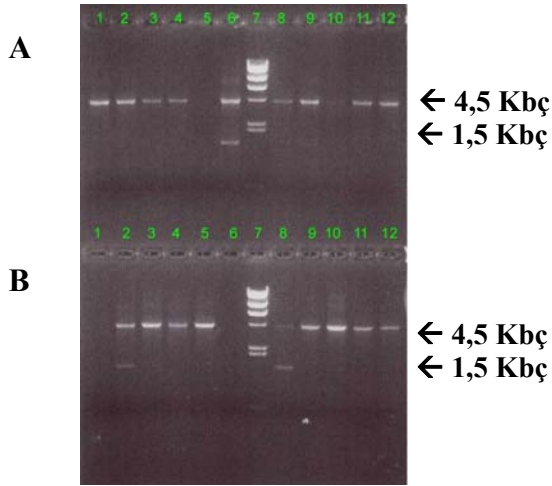
**Şekil 3.14. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, A18-0,2 ml tüp-Go *Taq*; 2, 5A1-diyaliz öncesi-0,2 ml tüp-Go *Taq*; 3, 5A1-diyaliz öncesi-0,5 ml kalın cidar-Go *Taq*; 4, 5A1-diyaliz sonrası-0,5 ml kalın cidar-Go *Taq*; 5, 5A1-diyaliz sonrası-0,2 ml tüp-Go *Taq*; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, 5A1-diyaliz öncesi-0,2 ml tüp-Takara; 8, 5A1-diyaliz sonrası-0,2 ml tüp-Takara; 9, Kontrol-Takara; 10, 5A1-diyaliz öncesi-0,2 ml tüp-Roche; 11, 5A1-diyaliz sonrası-0,2 ml tüp-Roche.

Roche, Takara ve Go *Taq* DNA polimeraz ile Program 1'de 0,5 ml ince cidarlı, 0,5 ml kalın cidarlı, 0,2 ml ince cidarlı tüpler kullanılarak *rrn*-PCR gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.15.). Go *Taq* DNA polimeraz ile özgün ürünün verimi daha yüksek bulunurken, özgün olmayan PCR ürününün çoğalması engellenemedi. Yapılan reaksiyonların hepsinde verim daha yüksek bulunduğundan bundan sonraki çalışmalarda Go *Taq* DNA polimeraz kullanılmasına ve reaksiyonların 0,5 ml ince cidarlı PCR tüplerinde gerçekleştirilmesine karar verildi.

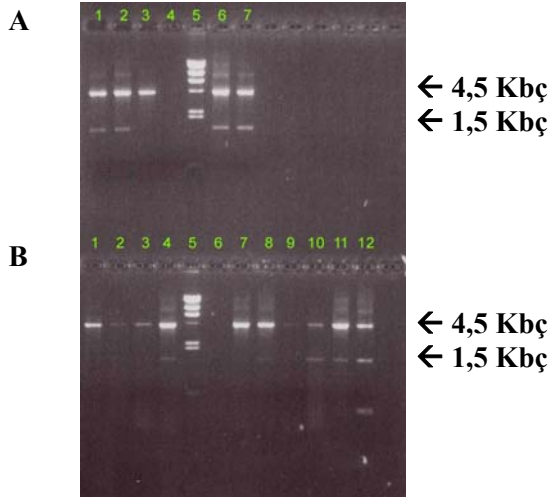


**Şekil 3.15. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A: 1, 5A1-diyaliz sonrası-0,5 ml ince cidar-Takara Taq; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 3, A18-0,5 ml ince cidar-Takara Taq; 4, Kontrol-kalıp(-)-Takara Taq. B: 1, 5A1-diyaliz öncesi-0,5 ml ince cidar-Go Taq; 2, 5A1-diyaliz öncesi-0,5 ml kalın cidar-Go Taq; 3, 5A1-diyaliz öncesi-0,2 ml ince cidar-Go Taq; 4, A18-0,5 ml ince cidar-Go Taq; 5, 7A36-0,5 ml ince cidar-Go Taq; 6, 7A36-0,5 ml kalın cidar-Go Taq; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 8, Kontrol-kalıp(-)-0,5 ml ince cidar-Go Taq; 9, Kontrol-Enzim (-)-0,5 ml ince cidar-Go Taq; 10, 5A1 diyaliz öncesi-0,5 ml ince cidar-Roche Taq; 11, A18-0,5 ml ince cidar-Roche Taq; 12, Kontrol-Kalıp(-)-0,5 ml ince cida-Roche Taq.**

Seçilen soylar ile *rrn* PCR, ince cidarlı tüpler, Go Taq DNA polimeraz ve program 1 ve 2 kullanılarak gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.16. ve 3.17.). Primer tutunma sıcaklığının kademeli olarak 63 °C'tan 68 °C'a çıkarıldığı 2 numaralı programda L8 ve A7 ile ürün elde edilemedi. Aynı programda L1, L3, L5, L6, L15, L21, L22, 7A36, 8A3 ve 61A1 soyları ile yalnızca 4,5 kbç büyüklüğündeki özgül PCR ürünü çoğalırken, diğer soylar ile, bazılarında çok zayıf olmakla birlikte, 1,5 kbç özgül olmayan PCR ürünü de gözlemlendi. Sentez süresinin kademeli olarak 3 dakikadan 6 dakika 20 saniyeye çıkarıldığı 1 numaralı programda yalnızca 13A10 soyu ile 1,5 kbç ikincil PCR ürünü gözlenmezken, diğer tüm soylar ile bazılarında çok zayıf olmakla birlikte, 1,5 kbç büyüklüğünde özgül olmayan PCR ürünü gözlemlendi.

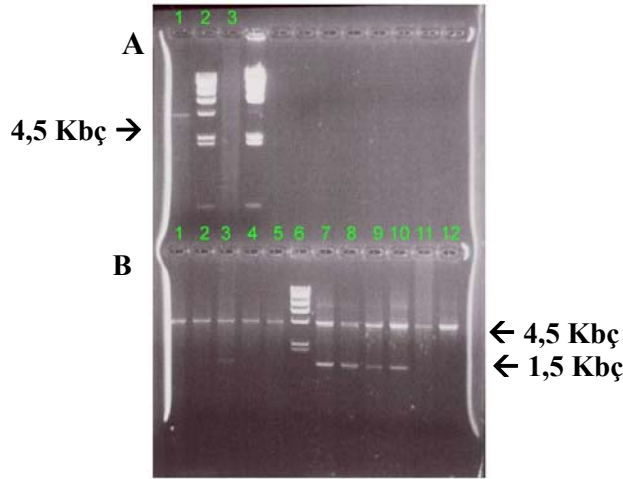


**Şekil 3.16. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 28. A: 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, L10; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, L13; 9, L14; 10, L15; 11, L21; 12, L22. B: 1, P19; 2, P20; 3, P21; 4, P24; 5, A3; 6, A7; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 8, A23; 9, 1A1; 10, 5A1; 11, 6A5; 12, 7A36.**



**Şekil 3.17. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 26. A: 1, 9A20; 2, 10A5; 3, 13A10; 4, Kontrol (26); 5, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 6, 27E3; 7, 29A1. B: 1, 8A3 (program 28); 2, 61A1 (program 28); 3, L16; 4, A4; 5, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 6, Kontrol (28); 7, A18; 8, A18-0,2 ince cidar; 9, A26; 10, A28; 11, 5A1; 12, 5A1-Roche *Taq*.**

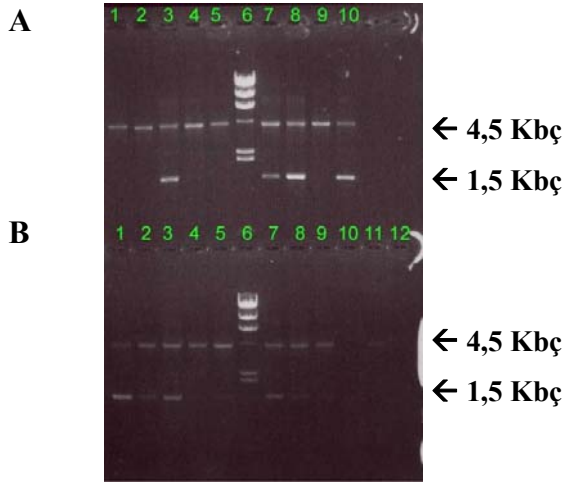
Seçilen soylar ile 2 nolu program kullanılarak fazla miktarda ürün almaya yönelik preparatif bir PCR gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntüldü (Şekil 3.18.). Yalnızca 27E3 soyu ile 4,5 kbç özgül PCR ürünü elde edilirken, diğer tüm soylar ile, bazılarında çok zayıf olmakla birlikte, özgül olmayan 1,5 kbç PCR ürünü gözlemlendi.



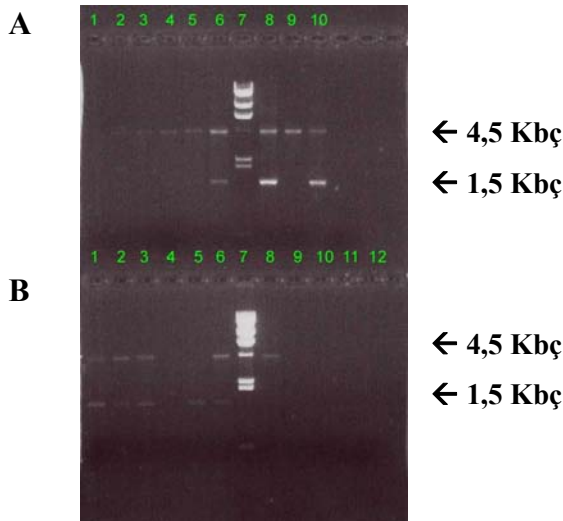
**Şekil 3.18. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A: 1, 29A1; 2, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 3, Kontrol. B: 1, L1; 2, L3; 3, L14; 4, L21; 5, L22; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 7, P21; 8, A3; 9, 1A1; 10, 5A1; 11, 8A3; 12, 27E3.**

Bunun üzerine A3, 1A1, 5A1 ve P21 soyları ile ilk on döngü boyunca 63 °C olan primer tutunma sıcaklığının on döngü sonrasında iki döngüde bir 0,5 °C arttırılarak 20 döngü sonunda 68 °C'a çıkıldığı 2 numaralı program ile 68 °C'tan kademeli olarak 63 °C'a inilen 6 numaralı program kullanılarak *rrn*-PCR gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Jel fotoğrafı burada gösterilmemiştir). Ancak tüm soylar için geçerli ve önceki sonuçlarla tutarlı tekrarlanabilir bir sonuç alınamadı. 6 nolu program ile de tüm soylar için iyi sonuç alınamadı.

İki farklı yöntemle izole edilen P17, P19, P22 ve 5A1 genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı program 6 ve 7 ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonunda da (Şekil 3.19. ve 3.20.) tüm soylar için geçerli ve önceki sonuçlarla tutarlı bir sonuç elde edilemedi. Program 6 ile özgün PCR ürünü veriminin çok düşük olduğu gözlemlendi.



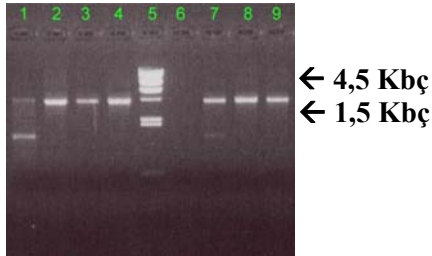
**Şekil 3.19. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, program 7. A:** 1, 5A1-6h; 2, P17-6h-HY; 3, P19-6h-HY; 4, P22-6h-HY; 5, 5A1-6h-HY; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, P17-EY; 8, P19-EY; 9, P22-EY; 10, 5A1-EY. **B:** 1, P17-ON; 2, P19-ON; 3, P22-ON; 4, 5A1-ON; 5, P17-ON-HY; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 7, P19-ON-HY; 8, P22-ON-HY; 9, 5A1-ON-HY; 10, P17-6h; 11, P19-6h; 12, P22-6h.



**Şekil 3.20. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili, proram 6. A:** 1, 5A1-6h; 2, P17-6h-HY; 3, P19-6h-HY; 4, P22-6h-HY; 5, 5A1-6h-HY; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, P17-EY; 8, P19-EY; 9, P22-EY; 10, 5A1-EY. **B:** 1, P17-ON; 2, P19-ON; 3, P22-ON; 4, 5A1-ON; 5, P17-ON-HY; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 7, P19-ON-HY; 8, P22-ON-HY; 9, 5A1-ON-HY; 10, P17-6h; 11, P19-6h; 12, P22-6h.

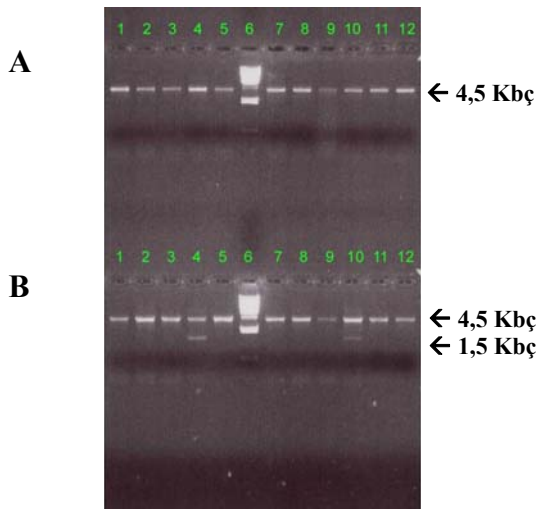
Farklı genomik DNA özütlemeye yöntemleri (6 saat büyütülmüş kültürlerden Hızlı Yöntem ve TEST yöntemi kullanılarak) ile elde edilen P17, P19, P22 ve 5A1 genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı *rrn*-PCR'lar 7 nolu programda gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.21.). Daha önceki sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde *rrn*-PCR'larda 6 saatlik kültürlerden Hızlı Yöntem ile elde edilen genomik DNA'ların

kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonların özgül ürün veriminin ve saflığının daha iyi olduğu görüldüğünden, bundan sonra belirtilen yöntemle elde edilen DNA'ların kalıp olarak kullanılmasına karar verildi.

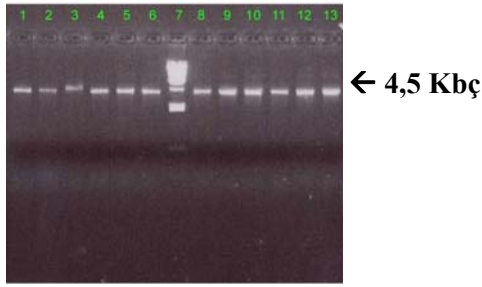


**Şekil 3.21. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, P17-6h; 2, P17-6h-HY; 3, P19-6h; 4, P19-6h-HY; 5, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 6, P22-6h; 7, P22-6h-HY; 8, 5A1-6h; 9, 5A1-6h-HY.

Bunun üzerine, tüm soyların hızlı yöntem ile özütlenen genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı *rrn*-PCR'lar 7 nolu programda gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.22. ve 3.23.). Sadece L6, L14, P17, P20, A4, A28, 5A1 ve 10A5 soylarının kullanıldığı reaksiyonlarda 1,5 kbç PCR ürünü gözlemlendi. İlgilenilen 4,5 kbç PCR ürününün veriminin hemen hemen tüm soylar için yüksek olduğu gözlemlendi.



**Şekil 3.22. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** A: 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, L10; 8, L13; 9, L14; 10, L15; 11, L16; 12, L21. B: 1, L22; 2, P17; 3, P19; 4, P20; 5, P21; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 7, P22; 8, P24; 9, A3; 10, A4; 11, A7; 12, A18.

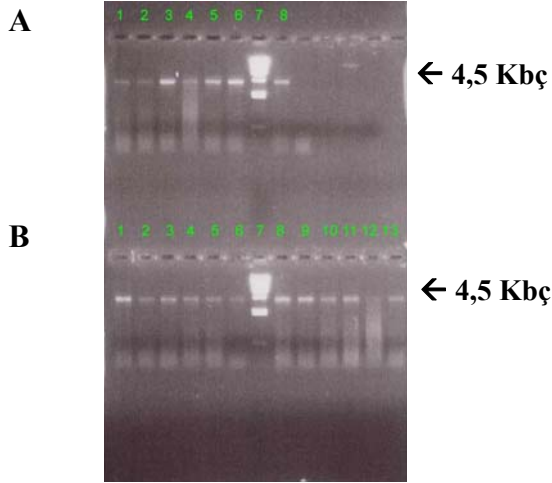


**Şekil 3.23. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili.** 1, A23; 2, A26; 3, A28; 4, 1A1; 5, 5A1; 6, 6A5; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, 9A20; 9, 10A5; 10, 13A10; 11, 27E3; 12, 29A1; 13, 61A1.

Bu çalışmadan seçilen L6, L8, L10, A28, 1A1, 5A1, 10A5 ve 27E3 soylarının hızlı yöntem ile elde edilen genomik DNA'ları kullanıldığı (özellik ürün veren ve verimi yüksek) *rrn*-PCR'lar program 7'de preparatif gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntüldü. Analitik çalışmada 1,5 kbç bandı üretmeyen 27E3 soyunun preparatif çalışmada bu bandı verdiği gözlemlendi. Diğer soylar ile yapılan PCR'larda özellik olmayan bu ürün gözlenmezken, ilgilenilen 4,5 kbç PCR ürününün miktarı düşük bulundu.

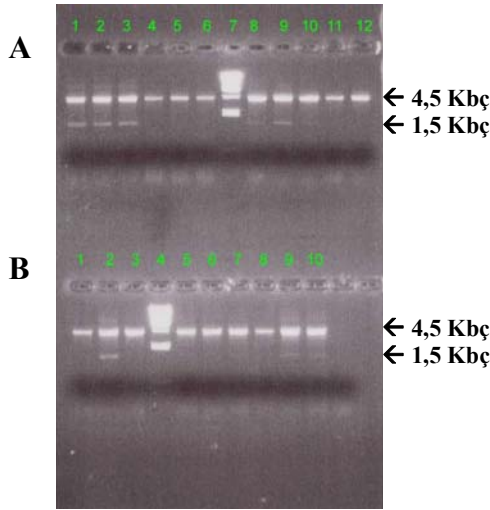
Bunun üzerine aynı çalışmadan seçilen L1, L15 ve L21 soyları ile aynı programda (7) preparatif PCR'lar yinelenildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntüldü. Bu kez her üç soy ile de daha önceki reaksiyonlarda gözlemlenmeyen 1,5 kbç ikincil PCR ürününün çoğaldığı gözlemlendi.

ARDRA çalışması için yeterli DNA'nın bulunamadığı soylar belirlenerek, tümü ile aynı programda (program 7) analitik *rrn*-PCR'lar gerçekleştirildi. *rrn*-PCR ürünlerinden 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntüldü (Şekil 3.24.). Reaksiyonların hiçbirisinde özellik olmayan 1,5 kbç'lik ürün gözlenmezken, tamamında "smear" görüldü.



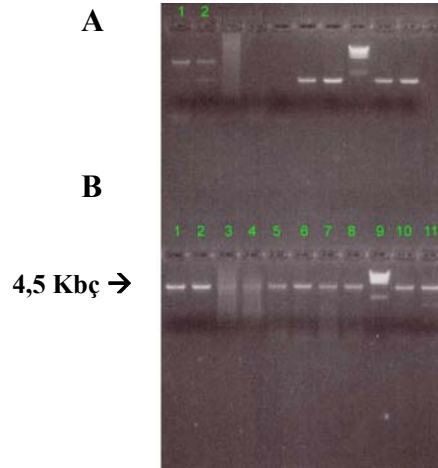
**Şekil 3.24. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A:** 1, A23; 2, A26; 3, 6A5; 4, 9A20; 5, 13A10; 6, 29A1; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, 61A1. **B:** 1, L1; 2, L5; 3, L13; 4, L14; 5, L15; 6, L16; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 8, P17; 9, P19; 10, P20; 11, P24; 12, A4; 13, A7.

Sorunun termal döngü cihazından kaynaklanabileceği ve her bir kuyu sıcaklığının farklı olabileceği düşünülerek, kuyuların denenmesi ve uygun ürün miktarının elde edilebilmesi amacıyla reaksiyon hacminin artırılması kararlaştırıldı. Seçilen soylar ile yapılan *rrn*-PCR'lar 50  $\mu$ l reaksiyon hacminde program 7'de gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sonrası seçilen birkaç soy için her iki tüpten ayrı ayrı ve birleştirildikten sonra 1  $\mu$ l alınarak % 1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.25.). L13 ve L15 soylarının kullanıldığı reaksiyonlarda yalnızca 4,5 kbç özgül PCR ürününün çoğaldığı, buna karşın A4, 6A5, 27E3, L1, P17 ve P24 ile 1,5 kbç PCR ürününün de çoğaldığı görüldü. A4 ile her iki tüpte de 4,5 kbç büyüklüğündeki fragmanın yanı sıra 1,5 kbç ürünün de çoğaldığı gözlenirken, 1A1'de tüplerin her ikisinde de yalnızca 4,5 kbç ürün gözlenmiş, buna karşın P24 ile yapılan reaksiyonlarda 1,5 kbç ürün, tüplerin birisinde görülürken diğerinde görülmemiştir.



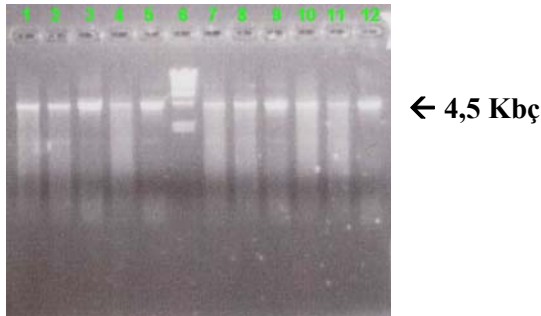
**Şekil 3.25. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A:** 1, A4-1; 2, A4-2; 3, A4-birleşmiş; 4, 1A1-1; 5, 1A1-2; 6, 1A1-birleşmiş; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kb); 8, 6A5; 9, 27E3; 10, L1; 11, L13; 12, L14. **B:** 1, L15; 2, P17; 3, P19; 4, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 5, P20-1; 6, P20-2; 7, P20-birleşmiş; 8, P24-1; 9, P24-2; 10, P24-birleşmiş.

Termal döngü cihazının farklı kuyularında aynı reaksiyon karışımı ile farklı sonuçların alınması üzerine Bölümümüzde bulunan bir diğer termal döngü cihazının denenmesi kararlaştırıldı. Farklı genomik DNA özütlemeye yöntemleri (Wizard® Genomic DNA Purification Kiti, Promega, hızlı yöntem ve CTAB yöntemi) ile elde edilmiş genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak iki farklı termal döngü cihazı ile program 7'de preparatif *rrn*-PCR gerçekleştirildi. Her iki cihazla da benzer sonuçlar elde edildi. (Şekil 3.26.) Göreceli daha temiz profil elde edildiği için kit ile izole edilen genomik DNA'ların kalıp olarak kullanılmasına karar verildi.

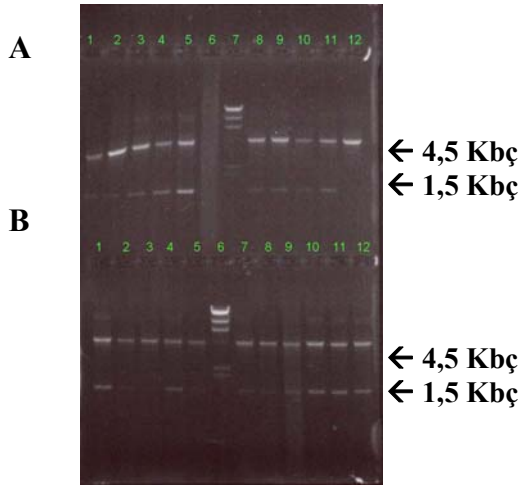


**Şekil 3.26. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A:** 1, A4-CTAB-TD1; 2, A4-CTAB-TD2. **B:** 1, P22-KİT-TD1; 2, P22-KİT-TD2; 3, P22-CTAB-TD1; 4, P22-CTAB-TD2; 5, 7A36-TD1; 6, 7A36-KİT-TD2; 7, 7A36-CTAB-TD1; 8, 7A36-CTAB-TD2; 9, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 10, 6A5-CTAB-TD1; 11, 6A5-CTAB-TD2. (TD1: Laboratuvarımızda bulunan termal döngü cihazı, TD2: Bölümümüzde bulunan diğer termal döngü cihazı)

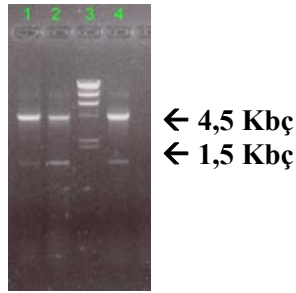
25 yerel izolat ve 11 referans soyun tümü için Wizard® Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Promega) ile saflaştırılan genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı *rrn*-PCR'lar 50  $\mu$ l/tüp reaksiyon hacminde 7 nolu programda gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 1  $\mu$ l'si alınarak % 1 lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.27. 3.28. ve 3.29.) ve miktar tayini yapıldı (Çizelge 3.4. ve 3.5.). Bundan sonraki *rrn*-ARDRA çalışmalarında bu PCR ürünleri kullanıldı.



**Şekil 3.27. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. 1, A4; 2, 6A5; 3, A28; 4, P19; 5, P20; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, 8A3; 8, L14; 9, L16; 10, L22; 11, 7A36; 12, P22.**



**Şekil 3.28. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A:** 1, P24; 2, A3; 3, A7; 4, A18; 5, A23; 6, A26; 7, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 8, 1A1; 9, 5A1; 10, 9A20; 11, 10A5; 12, 13A10. **B:** 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA; 7, L10; 8, L13; 9, L15; 10, L21; 11, P17; 12, P21.



**Şekil 3.29. *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. 1, 27E3; 2, 29A1; 3, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 4, 61A1.**

**Çizelge 3.4. Yerel izolatların *rrn*-PCR ürün derişimleri.**

| İZOLAT ADI | DERİŞİM (ng/ $\mu$ l) |
|------------|-----------------------|
| L1         | 200                   |
| L3         | 100                   |
| L5         | 150                   |
| L6         | 150                   |
| L8         | 150                   |
| L10        | 150                   |
| L13        | 150                   |
| L14        | 125                   |
| L15        | 150                   |
| L16        | 175                   |
| L21        | 200                   |
| L22        | 125                   |
| P17        | 200                   |
| P19        | 100                   |
| P20        | 200                   |
| P21        | 200                   |
| P22        | 200                   |
| P24        | 150                   |
| A3         | 200                   |
| A4         | 150                   |
| A7         | 200                   |
| A18        | 150                   |
| A23        | 175                   |
| A26        | Elde edilemedi        |
| A28        | 200                   |

**Çizelge 3.5.** Referans soyların *rrn*-PCR ürün derişimleri.

| İZOLAT ADI | DERİŞİM (ng/μl) |
|------------|-----------------|
| 1A1        | 150             |
| 5A1        | 175             |
| 6A5        | 125             |
| 7A36       | 100             |
| 8A3        | 100             |
| 9A20       | 100             |
| 10A5       | 125             |
| 13A10      | 200             |
| 27E3       | 200             |
| 29A1       | 150             |
| 61A1       | 200             |

### 3.3. 16S rDNA DİZİ ANALİZİ

16S rRNA geninin 758-777 aralığına eşlenik FG55 ve 312-327 aralığına eşlenik MT1 geri primerleri ile okunan dizilimler dizi analiz cihazının yazılımından yararlanılarak hizalandı. Çakışan kısımlar gözönüne alınarak iki dizi, FG55 ile elde edilen dizinin 3' ucuna MT1 ile elde edilen dizi eklenerek birleştirildi. Daha sonra elde edilen bu birleştirilmiş dizi “Nükleotit Dizi Çeviricisi” (<http://www.u.arizona.edu/~jhoying/SequenceConverter.html>) programı kullanılarak ters çevrildi ve eşlenik dizisi alındı. Şekil 3.33.'te görüldüğü üzere FG55 ve FG45 primerleri 16S rDNA dizisinin ortasına bağlanmakta ve diziyi birbirine ters yönlerle doğru okumaktadırlar. FG55-MT1 birleştirilmiş dizisinin ters çevrilmesindeki amaç diziyi diğer primer çifti tarafından okunan dizi ile uygun konuma getirebilmektir. Bu şekilde ters çevrilen dizinin eşlenik dizisinin arkasına FG45-MT2 ileri primerleri ile elde edilen birleştirilmiş dizi eklenerek her bir izolat için 16S rDNA geninin tam dizilimleri elde edilmiş oldu. Her bir primerle elde edilen diziler arasında çakışmanın olmadığı durumlarda diziler uygun konumda arka arkaya eklendi. Bu şekilde elde edilen 16S rDNA dizilimlerinin uzunluğu 1246 ile 1471 baz arasındadır.

Aşağıda Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi ile elde edilen ham veriden DNA dizilimlerinin elde edilmesi ve elde edilen bu dizinin veritabanlarında depolanan DNA dizileri ile karşılaştırılması, L6 izolatı özelinde örneklenmiştir. L6 izolatının 16S rDNA geni FG45 ileri primeri kullanılarak DTCS yöntemi ile dizilenmiş ve elde edilen ham veri dizi analiz cihazının yazılımına ait analiz programı kullanılarak, baz dizisine dönüştürülmüştür. İleri ve geri primerlerle

elde edilen diziler birleştirildikten sonra elde edilen tam 16S rDNA dizisi nükleotit veritabanlarında bulunan DNA dizileri ile BLAST hızlı tarama programı kullanılarak karşılaştırılmış ve benzerlik gösterdiği soylar belirlenmiştir. Bu işlemin basamakları ve elde edilen sonuç şekil 3.30- 3.35.’te görülmektedir.

Dizi analizi sonucunda elde edilen ham verinin işlenmesi için önce, “Edit” butonuna basılarak açılan pencerede “general” alt penceresi seçildikten sonra, dizi analizine alınan DNA bir PCR ürünü olduğu için “PCR product” işaretlendi (şekil 3.30.A. ve 3.30.B.).



Elde edilen dizi aynı soy için MT2 ileri primeri ile okunmuş olan diziyle “align” edildi (Şekil 3.30.E.) ve örtüşen kısımlar dikkate alınarak iki dizi birbiri ile birleştirildi.

L6 izolatu için elde edilen FG45-MT2 dizisi aşağıda görülmektedir (Şekil 3.31.):

```
5'_GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTGCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTT
TCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCCGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATC
TGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGC
AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAACCA_3'
```

**Şekil 3.31. *Bacillus* sp. L6 izolatının FG45 ve MT2 ileri primerleri ile elde edilen 16S rDNA dizilimi.**

FG55 ve MT1 geri primerleri ile de aynı basamaklar izlenerek diziler elde edildi ve birleştirildi (Şekil 3.32.).

```
5'_TTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACATGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC
ACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTT
TCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAA
CCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCA
GTTACTCTTGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC
TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCC
CGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTA
CGCATCGTCGCCTTGAGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT
CTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCC
GGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTA
CTACCCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATG
TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCT_3'
```

**Şekil 3.32. *Bacillus* sp. L6 izolatının FG55 ve MT1 geri primerleri ile elde edilen 16S rDNA dizilimi.**

Şekil 3.33.'de 16S rDNA dizi analizinde kullanılan ileri ve geri primerlerin, GenBank'tan alınan *B. subtilis* 16S ribozomal RNA geni tam dizisi (Accession DQ301917) üzerindeki konumlarının, "Dizi Özütleme" programı (<http://bioinformatics.org/seqext/>) kullanılarak gösterimi verilmiştir. FG45 ve FG55 primerleri birbirinin eşleniğidir ve 16S rDNA dizisinde 758-777 baz aralığına tutunmaktadır. MT1 primeri 312-327 bölgesine, MT2 ise 1193-1212 aralığına tutunmaktadır.

```

GGCGCGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTA
^10 ^20 ^30 ^40 ^50 ^60 ^70 ^80 ^90
CCGCGCGACGGATTATGTACGTTTCAGCTCGCTGTCTACCTCGAAGCAGGGACTACAATCGCCGCTGCCCATCAATTGTGACCCCATTTGACGGGACAT
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG
^110 ^120 ^130 ^140 ^150 ^160 ^170 ^180 ^190
TCTGACCTTATTGAGGCCCTTTGGCCCCGATTATGGCCTACCAACAACTTGGCGTACCAAGTTTGTATTTCCACCGAAGCCGATGGTGAATGTCTACC
ACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
^210 ^220 ^230 ^240 ^250 ^260 ^270 ^280 ^290
TGGGCGCCGCTAATCGATCAACCACCTCCATTGCCGAGTGGTCCGTGCTACGCATCGGCTGGACTCTCCCACTAGCCGGTGTGACCCCTGACTCTGTGC
-----
3' atgcctccgtcgtca 5' MT1 primer
GCCGAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTATGAGGTTTTCCGGATCGTAA
^310 ^320 ^330 ^340 ^350 ^360 ^370 ^380 ^390
CGGGTCTGAGGATGCCCTCCGTGCTCATCCCTTAGAAGCGTTACCTGCTTTCAGACTGCTCGTTGCGGCGCACTCACTACTTCCAAAAGCTAGCATT
AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACCGTTTCAAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
^410 ^420 ^430 ^440 ^450 ^460 ^470 ^480 ^490
TCGAGACAACAATCCCTTCTTGTTCATGGCAAGCTTTATCCCGCATGGAAGTCCCATGGATTGGTCTTTCGGTGCCGATTGATGCACGGTCTGCGGCGC
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGA
^510 ^520 ^530 ^540 ^550 ^560 ^570 ^580 ^590
CATTATGCATCCACCGTTCGCAACAGGCCTTAATAACCCGCAATTTCCGAGCGTCCGCCAAGAAATTCAGACTACACTTTCGGGGGCGGAGTTGGCCCTT
GGTCAATTGGAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAA
^610 ^620 ^630 ^640 ^650 ^660 ^670 ^680 ^690
CCAGTAACCTTTGACCCCTTGAACACTCAGTCTTCTCCTCTCACCTTAAGGTGCACATCGCCACTTTACGATCTCTACACCTCCTTGTGTGACCCGCTT
-----
5' attagataccctggttagtcc 3' FG45 primer
3' taatctatgggaccatcagg 5' FG55 primer
GGCGACTCTCTGGTCTGTAACAGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAA
^710 ^720 ^730 ^740 ^750 ^760 ^770 ^780 ^790
CCGCTGAGAGACCAGACATTGACTGCGACTCCTCGCTTTCGCACCCCTCGCTTGTCTAATCTATGGGACCATCAGGTGCGGCATTTGCTACTCACGATT
GTGTTAGGGGGTTTCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
^810 ^820 ^830 ^840 ^850 ^860 ^870 ^880 ^890
CACAATCCCCCAAAGCGGGGAATCACGACGTCGATTGCGTAATTCGTGAGGCGGACCCCTCATGCCAGCGTTCTGACTTTGAGTTTCTCTAACTGCCCC
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAATCTTAGAGATAGGACGTCCCC
^910 ^920 ^930 ^940 ^950 ^960 ^970 ^980 ^990
CGGGCGTGTTCGCCACCTCGTACACCAAATTAAGCTTCGTTGCGCTTCTTGGAAATGGTCCAGAACTGTAGGAGACTGTAGGATCTCTATCTCAGGGG
TTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGC
^1010 ^1020 ^1030 ^1040 ^1050 ^1060 ^1070 ^1080 ^1090
AAGCCCCGCTCTCACTGTCCACACGTACCAACAGCAGTGCAGCACAGCACTCTACAACCAATTGAGGGCGTTGCTCGCGTTGGGAACTAGAATCAACG
-----
5' gctacaca
CAGCATTCACTTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGGTACACA
^1110 ^1120 ^1130 ^1140 ^1150 ^1160 ^1170 ^1180 ^1190
GTCGTAAGTGAACCCGTGAGATTCCACTGACGGCGACTGTTTGGCCCTCCTCCACCCCTACTGCAGTTTAGTAGTACGGGGAATACTGGACCCGATGTGT
cgtgctacaatg 3' MT2 primer
CGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGCCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAATCCCAAAATCTGTTGTGAGTTGCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG
^1210 ^1220 ^1230 ^1240 ^1250 ^1260 ^1270 ^1280 ^1290
GCACGATGTTACCTGTCTGTTTCCGGTGCCTTTGGCGCTCCAATTTCGGTTAGGGTGTATTAGACAACAGTCAAGCCTACGCTGCAGCGTTGAGCTGACGC
TGAAGCTGGAATCGACTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAAGAGAGTTTGTAAACA
^1310 ^1320 ^1330 ^1340 ^1350 ^1360 ^1370 ^1380 ^1390
ACTTCGACCTTAGCTGATCATTAGCGCCTAGTGTACGGCGCACTTATGCAAGGGCCGGAAACATGTGTGGCGGGCAGTGTGGTGTCTCAAAACATTGT
-----
CCGAAGTCGCTGAGGTAACTTTTAGGAGCGACCGCGCG
^1410 ^1420 ^1430
GGGCTTCAGCGACTCCATTGGAAAATCCTCGGTGCGCGCG
-----

```

Şekil 3.33. 16S rDNA dizi analizinde kullanılan ileri ve geri primerlerin *B. subtilis* rRNA geni (GenBank, DQ301917) üzerindeki yerleşimleri.

FG55-MT1 geri primerleri ile elde edilen birleşmiş dizi ters çevrilerek eşleneğine ait dizi alındı. Bu dizinin hemen arkasına FG45-MT2 ileri primerleri ile elde edilen birleştirilmiş dizi eklendi. Böylece, 16S rDNA gen diziliminin hemen tamamı 5'-3' doğrultusunda elde edilmiş oldu (Şekil 3.34.):

```

5_ AGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC
GGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTG

```

AACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGG  
 CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACTCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG  
 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
 GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGC  
 ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT  
 AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTT  
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA  
 GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCATGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGTG  
 TTAGGGGGTTTCCGCCCTCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
 TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
 TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACC  
 CTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC  
 TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC  
 AGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
 GACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC  
 AAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG  
 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC  
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACAC  
 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGG  
 GGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCA\_3'

**Şekil 3.34. *Bacillus* sp. L6 izolatının 16S rDNA dizilimi (1450 baz).**

Elde edilen 16S rDNA dizilimi NCBI web sitesinde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bulunan BLAST programı kullanılarak mevcut nükleotit veri tabanına karşı tarandı. BLAST taraması sonucunda L6 izolatının en yüksek benzerlik (% 99) gösterdiği soylardan birisi olan *Bacillus pumilus* soyu ile hizalama sonucu aşağıda görülmektedir (Şekil 3.35.).

**Bacillus pumilus gene for 16S rRNA, strain:KT1012**  
**Length=1504**  
**Score = 1400 bits (758), Expect = 0.0**  
**Identities = 763/765 (99%), Gaps = 2/765 (0%)**  
**Strand=Plus/Plus**

|                                                                                                                                      |     |                                                                 |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------|------|
| Query                                                                                                                                | 2   | GTTCGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGA    | 61   |
| Sbjct                                                                                                                                | 1   | GTTCGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGA    | 60   |
| Query                                                                                                                                | 62  | CAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT    | 121  |
| Sbjct                                                                                                                                | 61  | CAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT    | 120  |
| Query                                                                                                                                | 122 | GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACC    | 181  |
| Sbjct                                                                                                                                | 121 | GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACC    | 180  |
| Query                                                                                                                                | 182 | GCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCAT    | 241  |
| Sbjct                                                                                                                                | 181 | GCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCAT    | 240  |
| Query                                                                                                                                | 242 | TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACTCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG    | 301  |
| Sbjct                                                                                                                                | 241 | TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC - CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG  | 299  |
| Query                                                                                                                                | 302 | TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA     | 361  |
| Sbjct                                                                                                                                | 300 | TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA     | 359  |
| Query                                                                                                                                | 362 | ATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG    | 421  |
| Sbjct                                                                                                                                | 360 | ATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG    | 419  |
| Query                                                                                                                                | 422 | GATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGAC   | 481  |
| Sbjct                                                                                                                                | 420 | GATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGAC   | 479  |
| Query                                                                                                                                | 482 | GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG    | 541  |
| Sbjct                                                                                                                                | 480 | GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG    | 539  |
| Query                                                                                                                                | 542 | GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT    | 601  |
| Sbjct                                                                                                                                | 540 | GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT    | 599  |
| Query                                                                                                                                | 602 | GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAA       | 661  |
| Sbjct                                                                                                                                | 600 | GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAA       | 659  |
| Query                                                                                                                                | 662 | GAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACT     | 721  |
| Sbjct                                                                                                                                | 660 | GAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACT     | 719  |
| Query                                                                                                                                | 722 | GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCATGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA                    | 766  |
| Sbjct                                                                                                                                | 720 | GGCGAAGGCGACTCTCTGGTC - TGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA                  | 763  |
| Score = 1243 bits (673), Expect = 0.0                                                                                                |     |                                                                 |      |
| Identities = 688/695 (98%), Gaps = 2/695 (0%)                                                                                        |     |                                                                 |      |
| Strand=Plus/Plus                                                                                                                     |     |                                                                 |      |
| Query                                                                                                                                | 752 | ACGCTGAGGAGCGAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA    | 811  |
| Sbjct                                                                                                                                | 812 | ACGATGA - GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC - CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA | 869  |
| Query                                                                                                                                | 812 | AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC     | 871  |
| Sbjct                                                                                                                                | 870 | AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC     | 929  |
| Query                                                                                                                                | 872 | GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT    | 931  |
| Sbjct                                                                                                                                | 930 | GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT    | 989  |
| Şekil 3.35. <i>Bacillus</i> sp. L6 izolatu 16S rDNA dizisinin <i>B. pumilus</i> (GenBank, AB11595.1) 16S rDNA dizisi ile alignmenti. |     |                                                                 |      |
| Query                                                                                                                                | 932 | GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGT    | 991  |
| Sbjct                                                                                                                                | 990 | GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGT    | 1049 |
| Query                                                                                                                                | 992 | GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC       | 1051 |

```

Sbjct  1050  GCATGGTTATCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  1109
Query  1052  CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC  1111
          |||
Sbjct  1110  CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC  1169
Query  1112  GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG  1171
          |||
Sbjct  1170  GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG  1229
Query  1172  CTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAAAATCTG  1231
          |||
Sbjct  1230  CTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAAAATCTG  1289
Query  1232  TTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCG  1291
          |||
Sbjct  1290  TTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCG  1349
Query  1292  CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCA  1351
          |||
Sbjct  1350  CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCA  1409
Query  1352  CGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGT  1411
          |||
Sbjct  1410  CGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGT  1469
Query  1412  GGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA  1446
          |||
Sbjct  1470  GGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA  1504

```

Şekil 3.35. Devamı

Aşağıda L6 soyu ve moleküler tiplendirme çalışmalarında ön plana çıkan birkaç soy için 16S rDNA diziliminin NCBI BLAST programı kullanılarak gerçekleştirilen hizalama sonuçları görülmektedir (Çizelge 3.6.-3.11.). Çizelge 3.12.'de tüm yerel *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizine göre benzerlik gösterdikleri soylar ve okunan dizilerin baz uzunlukları görülmektedir.

Çizelge 3.6. L6 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1450 baz) BLAST sonucu.

| Accession | Description | Max<br>score | Total<br>score | Query<br>coverage | E<br>value | Max<br>ident |
|-----------|-------------|--------------|----------------|-------------------|------------|--------------|
|-----------|-------------|--------------|----------------|-------------------|------------|--------------|

| <b>Accession</b>           | <b>Description</b>                                                           | <b><u>Max</u><br/><u>score</u></b> | <b><u>Total</u><br/><u>score</u></b> | <b><u>Query</u><br/><u>coverage</u></b> | <b><u>E</u><br/><u>value</u></b> | <b><u>Max</u><br/><u>ident</u></b> |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <a href="#">AB115957.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> gene for 16S rRNA, strain:KT1012                     | <a href="#">1400</a>               | 2644                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">AB211228.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> gene for 16S ribosomal RNA, strain: NKCM8905         | <a href="#">1400</a>               | 2637                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">EF197942.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence    | <a href="#">1397</a>               | 2652                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">AM409371.1</a> | <i>Bacillus sp.</i> NJ-82 partial 16S rRNA gene, strain NJ-82                | <a href="#">1397</a>               | 2641                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">DQ448760.1</a> | <i>Bacillus sp.</i> CNJ742 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence     | <a href="#">1397</a>               | 2639                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">AY741720.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence             | <a href="#">1397</a>               | 2646                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">AB098578.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence                  | <a href="#">1397</a>               | 2652                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">DQ523500.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain B402 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">1395</a>               | 2594                                 | 97%                                     | 0.0                              | 99%                                |
| <a href="#">DQ445268.1</a> | <i>Bacillus sp.</i> ZD414 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | <a href="#">1393</a>               | 2642                                 | 99%                                     | 0.0                              | 99%                                |

**Çizelge 3.7.** L10 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1452 baz) BLAST sonucu.

| Accession  | Description                                                                                                                                               | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| EF502020.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain EDR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                             | 1400      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428253.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428251.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428250.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2639        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428240.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2661        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428238.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428237.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1400      | 2644        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF492885.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                               | 1400      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ676957.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain Jinran 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                        | 1400      | 2661        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ444283.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain YJ001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                            | 1400      | 2654        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| DQ377150.1 | <i>Bacillus</i> sp. ceb01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                                        | 1400      | 2650        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| AB232386.1 | <i>Bacillus subtilis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: B1144                                                                               | 1400      | 2661        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AF411118.1 | <i>Bacillus</i> sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence                                                                                        | 1400      | 2657        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY887082.1 | <i>Bacillus subtilis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                                         | 1400      | 2648        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF433408.1 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain BCRC 14193 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                              | 1399      | 2648        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ415893.2 | <i>Bacillus subtilis</i> strain MA139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                            | 1399      | 2648        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY587809.1 | Bacterium Te22R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                                                  | 1399      | 2652        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ365582.1 | <i>Bacillus</i> sp. GS06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                                         | 1399      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428249.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1397      | 2641        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF428247.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                          | 1397      | 2646        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| EF491625.1 | <i>Bacillus subtilis</i> isolate G8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                              | 1395      | 2654        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF221612.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain T2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                               | 1395      | 2637        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF032683.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain AU53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                             | 1395      | 2644        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ659145.1 | <i>Bacillus polyfermenticus</i> strain GR010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                     | 1395      | 2639        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY149473.1 | <i>Bacillus polyfermenticus</i> 16S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1395      | 2639        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY587833.1 | Bacterium Te70R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                                                  | 1395      | 2631        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY530960.1 | <i>Bacillus licheniformis</i> strain HK-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                                        | 1395      | 2460        | 93%            | 0.0     | 99%       |

Çizelge 3.8. L15 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1382 baz) BLAST sonucu.

| Accession  | Description                                                                          | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| EF488975.1 | <i>Bacillus pumilus</i> strain BSH-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | 1397      | 2509        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF491624.1 | <i>Bacillus pumilus</i> isolate ZB13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | 1397      | 2509        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| DQ988522.1 | <i>Bacillus pumilus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                     | 1397      | 2498        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| AY548949.1 | <i>Bacillus pumilus</i> strain 8N-4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence        | 1397      | 2509        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| AY587832.1 | Bacterium Te68R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                             | 1395      | 2508        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF523475.1 | <i>Bacillus pumilus</i> strain BPT-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence       | 1391      | 2504        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| EF198246.1 | <i>Bacillus</i> sp. MAC11B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                  | 1391      | 2498        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| DQ207559.1 | <i>Bacillus pumilus</i> isolate CECRIbio 02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1391      | 1391        | 55%            | 0.0     | 99%       |
| AY548955.1 | <i>Bacillus pumilus</i> strain S9 16S ribosomal RNA gene, complete sequence          | 1391      | 2504        | 100%           | 0.0     | 99%       |

**Çizelge 3.9.** P20 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1465 baz) BLAST sonucu.

| Accession  | Description                                                                         | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| AY587784.1 | Bacterium Te30A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                            | 1410      | 2635        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY587783.1 | Bacterium Te28A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                            | 1410      | 2624        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ513324.1 | <i>Bacillus thuringiensis</i> strain DMB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | 1408      | 2545        | 95%            | 0.0     | 99%       |
| AF390088.1 | <i>Bacillus</i> sp. W-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                   | 1406      | 2423        | 93%            | 0.0     | 99%       |
| EF428972.1 | <i>Bacillus</i> sp. PS6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                    | 1404      | 2415        | 92%            | 0.0     | 99%       |
| EF381743.1 | <i>Paenibacillus larvae</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                | 1404      | 2526        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ207729.2 | <i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence    | 1404      | 2644        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| CP000485.1 | <i>Bacillus thuringiensis</i> str. AI Hakam, complete genome                        | 1404      | 3.709e+04   | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ448749.1 | <i>Bacillus</i> sp. CNJ732 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | 1404      | 2637        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ207562.1 | <i>Bacillus cereus</i> isolate CECRIbio 06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1404      | 2550        | 96%            | 0.0     | 99%       |
| AE017355.1 | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian str. 97-27, complete genome         | 1404      | 3.708e+04   | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AE017334.2 | <i>Bacillus anthracis</i> str. 'Ames Ancestor', complete genome                     | 1404      | 2.911e+04   | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AE017225.1 | <i>Bacillus anthracis</i> str. Sterne, complete genome                              | 1404      | 2.911e+04   | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY425946.1 | <i>Bacillus cereus</i> strain G9241 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | 1404      | 2650        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY224388.1 | <i>Bacillus cereus</i> strain BGSC 6A5 rrmM operon, complete sequence               | 1404      | 2644        | 99%            | 0.0     | 99%       |

**Çizelge 3.10.** P22 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1402 baz) BLAST sonucu.

| Accession                  | Description                                                                        | Max score            | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">AB021185.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> gene for 16S ribosomal RNA                                  | <a href="#">1312</a> | 2532        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ514312.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> strain P27-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence      | <a href="#">1310</a> | 2530        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AJ784845.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. Con a/4 partial 16S rRNA gene, isolate Con a/4                 | <a href="#">1308</a> | 2397        | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ333292.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> isolate LLH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | <a href="#">1304</a> | 1304        | 51%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AF217809.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. KYJ963 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                | <a href="#">1290</a> | 2509        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ270752.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. B-2036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                | <a href="#">1288</a> | 2404        | 95%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ365587.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> strain GS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | <a href="#">1282</a> | 2162        | 86%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AJ550461.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> partial 16S rRNA gene                                       | <a href="#">1282</a> | 2493        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AJ563600.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> partial 16S rRNA gene, strain B14                           | <a href="#">1277</a> | 2497        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ339687.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> isolate BRL02-65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | <a href="#">1269</a> | 1269        | 50%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ532282.1</a> | Uncultured bacterium clone KSC2-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | <a href="#">1260</a> | 2450        | 100%           | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">AY939830.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. R3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                    | <a href="#">1260</a> | 2369        | 95%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AY422986.1</a> | <i>Bacillus flexus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                    | <a href="#">1256</a> | 2476        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">EF428248.1</a> | <i>Bacillus megaterium</i> strain HDYM-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">1255</a> | 2441        | 100%           | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">DQ789400.1</a> | <i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence                | <a href="#">1255</a> | 2445        | 100%           | 0.0     | 98%       |

Çizelge 3.11. A28 yerel izolatu 16S rDNA dizisi (1427 baz) BLAST sonucu.

| Accession  | Description                                                                         | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| DQ343614.1 | <i>Bacillus</i> sp. A7(2006) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence               | 1371      | 2436        | 95%            | 0.0     | 98%       |
| DQ993674.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain BCRC 10058 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ631809.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain A32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | 1369      | 2576        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ401073.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain Setapak 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AB188212.1 | <i>Bacillus</i> sp. TUT1206 gene for 16S rRNA, partial sequence                     | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AB110598.1 | <i>Bacillus subtilis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence                        | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| Z99104.2   | <i>Bacillus subtilis</i> complete genome (section 1 of 21): from 1 to 213080        | 1369      | 1.791e+04   | 99%            | 0.0     | 99%       |
| DQ017585.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain YYW-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence      | 1369      | 2567        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY995572.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain IDCC1105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AY995568.1 | <i>Bacillus subtilis</i> strain IDCC 1101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | 1369      | 2572        | 99%            | 0.0     | 99%       |
| AB098574.1 | <i>Bacillus</i> sp. TUT1010 gene for 16S rRNA, partial sequence                     | 1369      | 2534        | 99%            | 0.0     | 98%       |

**Çizelge 3.12.** Yerel *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizine göre benzerlik gösterdikleri soylar ve okunan 16S rDNA dizilimlerinin baz sayıları. BLAST sonuçlarında % 97,5'in üzerinde benzerlik gösteren diziler dikkate alınmıştır.

| İzolat Adı | Benzerlik Görülen Tür adı                                                                              | Baz Sayısı |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| L1         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1438       |
| L3         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1448       |
| L5         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1453       |
| L6         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1450       |
| L8         | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> | 1465       |
| L10        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> | 1452       |
| L13        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | 1425       |
| L14        | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1425       |
| L15        | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1382       |
| L16        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | 1246       |
| L21        | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1471       |
| L22        | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | 1405       |
| P17        | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       | 1394       |
| P19        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | 1469       |
| P20        | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       | 1465       |
| P21        | <i>B. licheniformis</i>                                                                                | 1334       |
| P22        | <i>B. flexus</i> / <i>B. megaterium</i>                                                                | 1402       |
| P24        | <i>B. licheniformis</i>                                                                                | 1444       |
| A3         | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | 1425       |
| A4         | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       | 1287       |
| A7         | <i>B. subtilis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                                            | 1449       |
| A18        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | 1386       |
| A23        | <i>B. subtilis</i>                                                                                     | 1443       |
| A26        | <i>B. subtilis</i> / <i>B. velezensis</i>                                                              | 1354       |
| A28        | <i>B. subtilis</i>                                                                                     | 1427       |

**Çizelge 3.13.** Yerel *Bacillus* İzolatları için klasik tiplendirme çalışmaları ve 16S rDNA Dizilimlerine Göre Önerilen Tür Adları.

| İzolat Adı | Olası Tür Adı                                 |                                                        |                                                      |                                                                                                        |
|------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | Kızılay Mikrob. Lab.                          | API                                                    | VITEK                                                | 16S rDNA                                                                                               |
| L1         | <i>B. subtilis</i><br><i>B. firmus</i>        | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. pumilus</i>                                    | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L3         | <i>B. pumilus</i><br><i>B. sphaericus</i>     | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. pumilus</i>                                    | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L5         | ?                                             | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. pumilus</i>                                    | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L6         | <i>B. pumilus</i>                             | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. pumilus</i>                                    | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L8         | ?<br><i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i>  | <i>B. stearothermophilus</i><br><i>B. firmus</i>       | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> |
| L10        | ?<br><i>B. subtilis</i>                       | <i>B. stearothermophilus</i>                           | <i>B. amyloliquefaciens</i>                          | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> |
| L13        | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     |
| L14        | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i>       | <i>B. pumilus</i><br>(unacceptable)                    | Unidentified                                         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L15        | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i>       | <i>B. pumilus</i><br>(unacceptable)                    | Unidentified                                         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L16        | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. amyloliquefaciens</i>                            | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     |
| L21        | <i>B. pumilus</i>                             | <i>B. pumilus</i>                                      | <i>B. pumilus</i>                                    | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| L22        | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i>       | <i>B. pumilus</i><br>(unacceptable)                    | Unidentified                                         | <i>B. pumilus</i>                                                                                      |
| P17        | ?                                             | <i>B. cereus</i>                                       | <i>B. cereus</i> group                               | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       |
| P19        | <i>B. licheniformis</i>                       | <i>B. subtilis</i><br><i>B. amyloliquefaciens</i>      | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     |
| P20        | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. amyloliquefaciens</i><br><i>B. subtilis</i>      | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       |
| P21        | <i>B. licheniformis</i>                       | <i>B. licheniformis</i>                                | Unidentified                                         | <i>B. licheniformis</i>                                                                                |
| P22        | <i>B. megaterium</i>                          | <i>B. coagulans</i>                                    | <i>B. cereus</i>                                     | <i>B. flexus</i> / <i>B. megaterium</i>                                                                |
| P24        | <i>B. licheniformis</i>                       | <i>B. licheniformis</i><br><i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. licheniformis</i>                              | <i>B. licheniformis</i>                                                                                |
| A3         | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. subtilis</i>                                     | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     |
| A4         | ?                                             | <i>B. cereus</i>                                       | <i>B. cereus</i>                                     | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>                                       |
| A7         | ?                                             | <i>B. subtilis</i>                                     | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                                            |
| A18        | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. amyloliquefaciens</i>                            | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     |
| A23        | <i>B. subtilis</i>                            | <i>B. amyloliquefaciens</i>                            | <i>B. subtilis</i>                                   | <i>B. subtilis</i>                                                                                     |
| A26        | <i>B. stearothermophilus</i>                  | (unacceptable)                                         | <i>B. licheniformis</i>                              | <i>B. subtilis</i> / <i>B. velezensis</i>                                                              |
| A28        | <i>B. subtilis</i><br><i>B. licheniformis</i> | (unacceptable)                                         | <i>B. licheniformis</i><br>(Questionable biopattern) | <i>B. subtilis</i>                                                                                     |

### 3.4. ARDRA

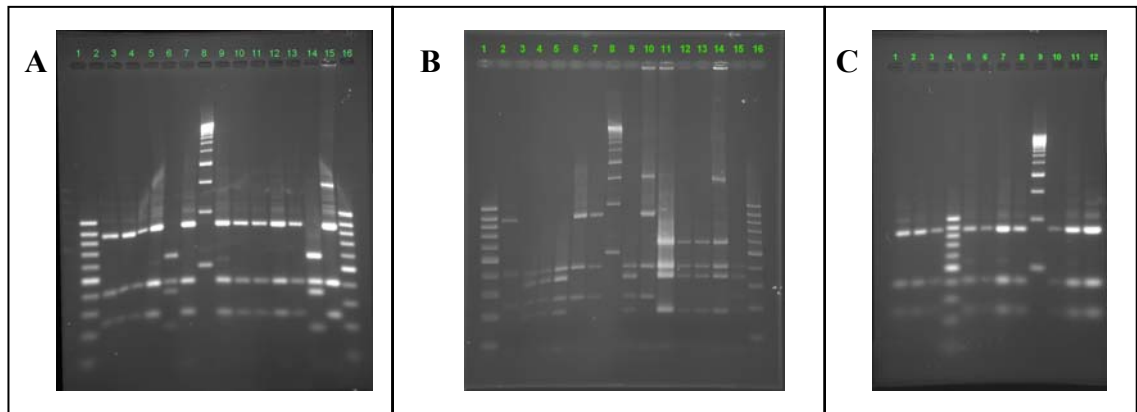
Klasik tiplendirme ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarının ışığında 25 yerel izolat ve 11 referans soy için *Sau3AI*, *MboII* ve *CfoI* enzimleri ile gerçekleştirilen 16S ve *rrn*-ARDRA çalışmalarının sonuçları aşağıdaki bölümlerde anlatılmıştır.

#### 3.4.1. 16S ARDRA

25 yerel *Bacillus* izolatı ve 11 referans *Bacillus* soyunun 16S rDNA PCR ürünlerinin *Sau3AI*, *MboII* ve *CfoI* enzimleri ile kesim profilleri % 1,8 metafor içeren agaroz jelde görüntülendi. Bu jellerde yerel izolatlar daha önce gerçekleştirilen tiplendirme çalışmalarında elde edilen sonuçlar gözetilerek ilgili referans soya yakın konumlanacak şekilde yerleştirildi. Jellerde her bir örnek için gözlenen bant profilleri tablolaştırılarak, aynı enzimlerle sindirilmiş referans soyların bant profilleri ile karşılaştırıldı.

##### 3.4.1.1. CfoI

16S rDNA PCR ürünlerinin *CfoI* kesim profilleri Şekil 3.36.A-C'de görülmektedir.



**Şekil 3.36. 16S rDNA'ların *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. A:** 1, 100 bç belirteç (Fermentas); 2, A23; 3, L10; 4, L13; 5, L16; 6, P20; 7, 1A1; 8, 500 bç belirteç (Fermentas); 9, A3; 10, A7; 11, A18; 12, 27 E3; 13, L8; 14, 29A1; 15, 9A20; 16, 100 bç belirteç (Fermentas). **B:** 1, 100 bç belirteç (Fermentas); 2, P19; 3, P21; 4, P24; 5, 5A1; 6, A26; 7, A28; 8, 500 bç belirteç (Fermentas); 9, 61A1; 10, P22; 11, 7A36; 12, P17; 13, A4; 14, 6A5; 15, 13A10; 16, 100 bç belirteç (Fermentas). **C:** 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, 100 bç belirteç (Fermentas); 5, 8A3; 6, L6; 7, L14; 8, L15; 9, 500 bç belirteç (Fermentas); 10, L21; 11, L22; 12, 10A5. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbp; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbp.

8A3 *B. pumilus* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 250 bç, 410 bç, 550 bç, 880 bç, 1000 bç, 1300 bç büyüklüğündeki bantları ve 1100-1300 bç arasında “smear” içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi ile yapılan tiplendirme çalışmaları sonucunda *B. pumilus* olabileceklerine karar verilmiş olan 8 yerel izolat L1, L3, L5, L6, L14, L15, L21 ve L22’nin *CfoI* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında, referans soyun kesim profilinde gözlenen 1100-1300 bç arasındaki “smear”ın, ayırt edici bir faktör olarak kabul edilmemesi halinde, yalnızca L14 ve L22 izolatları geriye kalan 5 bant açısından referans soy ile uyumlu bulunmuştur. L1, L3, L5, L6 ve L15 izolatları referans soyda gözlenen 550 bç bandı, L21 izolatı 550 bç ve 1000 bç bantları, L8, L10, L13 ve L16 izolatları ise 550 bç ve 1300 bç bantları içermemektedir (Çizelge 3.14.). 16S rDNA dizi analizine göre *B. cereus*, *B. thuringiensis* olabileceği belirlenen P17, P20 ve A4 izolatları yalnızca 410 bç büyüklüğündeki bandı içerirken, *B. licheniformis* olabileceği belirlenen P21 ve P24 izolatları 250 bç ve 410 bç büyüklüğündeki, *B. subtilis* olabileceği öngörülen P19, A26 ve A28 ile *B. flexus* olabileceği öngörülen P22 izolatları ise 250, 410 ve 880 bç büyüklüğündeki bantları içermemekte, buna karşın, *B. subtilis/B. licheniformis* olabileceği öngörülen A3, A7, A18 ve A23 izolatları 550 ve 1300 bç büyüklüğündeki bantlar dışında tüm bantları içermektedir.

**Çizelge 3.14.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 8A3 *B. pumilus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 8A3 <i>B. pumilus</i> |         |     |     |      |                   |      | Diğer                  |
|------------|-----------------------|---------|-----|-----|------|-------------------|------|------------------------|
|            | 250                   | 400/410 | 550 | 880 | 1000 | 1100-1300 “smear” | 1300 |                        |
| L1         | +                     | +       | -   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L3         | +                     | +       | -   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L5         | +                     | +       | -   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L6         | +                     | +       | -   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L8         | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100                    |
| L10        | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100, 1150/1200         |
| L13        | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100                    |
| L14        | +                     | +       | +   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L15        | +                     | +       | -   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| L16        | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100, 600               |
| L21        | +                     | +       | -   | +   | -    | -                 | +    |                        |
| L22        | +                     | +       | +   | +   | +    | -                 | +    |                        |
| P17        | -                     | +       | -   | -   | -    | -                 | -    | 200, 350, 600          |
| P19        | +                     | +       | -   | +   | -    | -                 | -    |                        |
| P20        | -                     | +       | -   | -   | -    | -                 | -    | 100, 210/220, 380, 650 |
| P21        | +                     | +       | -   | -   | -    | -                 | -    | 200, 350               |
| P22        | +                     | +       | -   | +   | -    | +                 | -    | 100                    |
| P24        | +                     | +       | -   | -   | -    | -                 | -    | 200, 350               |
| A3         | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100, 600, 1150/1200    |
| A4         | -                     | +       | -   | -   | -    | -                 | -    | 200, 350, 600          |
| A7         | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100                    |
| A18        | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100                    |
| A23        | +                     | +       | -   | +   | +    | +                 | -    | 100, 1150/1200         |
| A26        | +                     | +       | -   | +   | -    | +                 | -    | 1100                   |
| A28        | +                     | +       | -   | +   | -    | -                 | -    | 1150/1200              |

1A1 *B. subtilis* ve 27E3 *B. subtilis* “natto” referans soylarının *CfoI* ile kesim sonrası bant profilleri 100 bç, 250 bç, 410 bç, 880 bç, 1000 bç büyüklüğündeki bantlar ile 1100-1300 bç arasında “smear” içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi ile *B. subtilis* olabileceklerine karar verilmiş olan 8 yerel izolat L8, L13, L16, A3, A7, A18, A23 ve P19’dur. Ayrıca L10 ve A28 izolatları manuel testler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına, A26 izolatı ise yalnızca 16S rDNA dizi analizine göre *B. subtilis*’e benzerlik göstermiştir. Manuel testler ve ticari kitler ile *B. subtilis* olarak adlandırılan P20 izolatı ise 16S rDNA dizi analizine göre *B. cereus* grubuna benzerlik göstermektedir; bu izolat için API kiti ile elde edilen sonuçlara göre, ayrıca, *B. amyloliquefaciens*’e de benzerlik göstermiştir. Bu izolatlardan L8, L13, A7 ve A18 *CfoI* ile kesim sonrası ilgili referans soylar ile aynı bant profilini göstermiştir. L10 ve A23 izolatları referans soyların verdiği bantlara ek olarak 1100-1300 bç arasındaki “smear” içinde 1150/1200 bç dolaylarında belirgin bir bant vermiştir. L16 izolatı referans soyların verdiği bantlara ek olarak yaklaşık 600 bç büyüklüğünde bir bant, A3 izolatı ise referans soyların verdiği bantlara ek olarak 600 bç ve 1150/1200 bç civarında ekstra bantlar içermektedir. P20 izolatının kesim profilinde referans soylarda gözlenen 250 bç ile 880 bç ve 1000 bç büyüklüğündeki bantlar ile 1100-1300 bç aralığında “smear” görülmemekte, buna karşın 210/220 bç, 380 bç ve 650 bç dolaylarında ekstra bantlar gözlenmektedir. P19, A26 ve A28 izolatları ise referans soylarda bulunan 250 bç, 400/410 bç ve 880 bç büyüklüğündeki bantları içermekte, A26 ve A28 izolatları ek olarak, sırasıyla 1100 ve 1150/1200 bç büyüklüğünde bantlar vermektedir (Çizelge 3.15.).

**Çizelge 3.15.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 1A1 *B. subtilis* ve 27E3 *B. subtilis* “*natto*” referans soyları için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 1A1 <i>B. subtilis</i> ve 27E3 <i>B. subtilis</i> “ <i>natto</i> ” |     |         |     |      |                   | Diğer             |
|------------|--------------------------------------------------------------------|-----|---------|-----|------|-------------------|-------------------|
|            | 100                                                                | 250 | 400/410 | 880 | 1000 | 1100-1300 “smear” |                   |
| L1         | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 1300              |
| L3         | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 1300              |
| L5         | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 1300              |
| L6         | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 1300              |
| L8         | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 |                   |
| L10        | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 | 1150/1200         |
| L13        | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 |                   |
| L14        | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 550, 1300         |
| L15        | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 1300              |
| L16        | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 | 600               |
| L21        | -                                                                  | +   | +       | +   | -    | -                 | 1300              |
| L22        | -                                                                  | +   | +       | +   | +    | -                 | 550, 1300         |
| P17        | -                                                                  | -   | +       | -   | -    | -                 | 200, 350, 600     |
| P19        | -                                                                  | +   | +       | +   | -    | -                 |                   |
| P20        | +                                                                  | -   | +       | -   | -    | -                 | 210/220, 380, 650 |
| P21        | -                                                                  | +   | +       | -   | -    | -                 | 200, 350          |
| P22        | +                                                                  | +   | +       | +   | -    | +                 |                   |
| P24        | -                                                                  | +   | +       | -   | -    | -                 | 200, 350          |
| A3         | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 | 600, 1150/1200    |
| A4         | -                                                                  | -   | +       | -   | -    | -                 | 200, 350, 600     |
| A7         | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 |                   |
| A18        | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 |                   |
| A23        | +                                                                  | +   | +       | +   | +    | +                 | 1150/1200         |
| A26        | -                                                                  | +   | +       | +   | -    | +                 | 1100              |
| A28        | -                                                                  | +   | +       | +   | -    | -                 | 1150/1200         |

5A1 *B. licheniformis* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 200 bç, 250 bç, 350 bç, 400 bç, 600 bç ve 780 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. licheniformis* olabileceğine karar verilmiş olan 2 izolat P21 ve P24’tür. Bu izolatların dışında, manuel testler ve ticari kitler ile A28, manuel testler ile P19, ticari kitler ile A26 ve 16S rDNA dizi analizi ile L8 ve L10 izolatlarında *B. licheniformis*’e benzerlik bulunmaktadır. Bu yerel izolatların *CfoI* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında hiçbir soyun tam olarak aynı profili göstermediği görülmüştür. İzolatların hiçbirisi 600 bç ve 780 bç’lik bantları vermemiş, 100 bç büyüklüğündeki bant ise bu izolatlardan yalnızca L8 ve L10’da görülmüştür. Buna ek olarak L8, L10, P19, A26 ve A28 izolatları 200 bç ve 350 bç’lik bantları da vermemektedir. P21 ve P24 izolatlarında ekstra bant gözlenmemekle birlikte, P19 izolatında 880 bç ve A26 izolatında 880 bç ve 1100 bç büyüklüğünde ekstra bantlar ile birlikte 1100-1300 bç arasında “smear”, A28 izolatında 880 bç ve 1150/1200 bç büyüklüğündeki bantlara ek olarak 1100-1300 bç arasında “smear” ve L10’da ayrıca 1150/1200 bç büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir (Çizelge 3.16.).

**Çizelge 3.16.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 5A1 *B. licheniformis* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırması.

| İzolat adı | 5A1 <i>B. licheniformis</i> |     |     |     |         |     |     | Diğer                           |
|------------|-----------------------------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|---------------------------------|
|            | 100                         | 200 | 250 | 350 | 400/410 | 600 | 780 |                                 |
| L1         | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1300                 |
| L3         | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1300                 |
| L5         | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1300                 |
| L6         | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1300                 |
| L8         | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300            |
| L10        | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300, 1150/1200 |
| L13        | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300            |
| L14        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 550, 880, 1000, 1300            |
| L15        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1300                 |
| L16        | +                           | -   | +   | -   | +       | +   | -   | 880, 1000, 1100-1300            |
| L21        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1300                       |
| L22        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 550, 880, 1000, 1300            |
| P17        | -                           | +   | -   | +   | +       | +   | -   |                                 |
| P19        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880                             |
| P20        | +                           | -   | -   | -   | +       | -   | -   | 210/220, 380, 650               |
| P21        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | -   |                                 |
| P22        | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1100-1300                  |
| P24        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | -   |                                 |
| A3         | +                           | -   | +   | -   | +       | +   | -   | 880, 1000, 1100-1300, 1150/1200 |
| A4         | -                           | +   | -   | +   | +       | +   | -   |                                 |
| A7         | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300            |
| A18        | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300            |
| A23        | +                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1000, 1100-1300, 1150/1200 |
| A26        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1100, 1100-1300            |
| A28        | -                           | -   | +   | -   | +       | -   | -   | 880, 1150/1200                  |

6A5 *B. cereus* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 200 bç, 350 bç, 400 bç, 750 bç, 880 bç, 950 bç, 1100 bç ve 1200 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi ile *B. cereus* olabileceklerine karar verilmiş olan 2 yerel soy P17 ve A4'tür. Bunun yanısıra 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre P20 izolatı da *B. cereus* grubuna benzerlik göstermektedir. VITEK Sistemi ile elde edilen sonuçlara göre *B. cereus* şüphesi taşıyan P22 soyu için 16S rDNA dizi analizi ile *B. cereus* grubuna benzerlik bulunmadı. Bu yerel izolatların *CfoI* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında her dört soyun da aynı profili göstermediği görülmüştür. Ticari kitler ile *B. cereus* olduğu belirlenen P17 ve A4 izolatlarının kesim profillerinde referans soyda gözlenen 100 bç, 750 bç, 880 bç, 950 bç, 1100 bç ve 1200 bç'lik bantlar gözlenmemekte, buna karşın her iki izolatta da 600 bç dolaylarında ekstra bir bant gözlenmektedir. 16S rDNA dizi analizine göre *B. cereus* olarak belirlenen P20 izolatında ise referans soyla ortak olarak yalnızca 100 bç ve 400 bç büyüklüğündeki bantlar görülmekte, bunun yanı sıra 210/220 bç, 380 bç ve 650 bç büyüklüğünde bantlar görülmektedir. VITEK sonucuna göre *B. cereus* olarak görülen P22 izolatı referans soyda görülen bantlardan yalnızca 100 bç, 400 bç ve 880 bç büyüklüğündeki

bantları içermekte, buna ek olarak 250 bç büyüklüğündeki bant ile 1100-1300 bç arasında “smear” taşımaktadır (Çizelge 3.17.).

**Çizelge 3.17.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 6A5 *B. cereus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 6A5 <i>B. cereus</i> |     |     |         |     |     |     |      |      | Diğer                                |
|------------|----------------------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|------|------|--------------------------------------|
|            | 100                  | 200 | 350 | 400/410 | 750 | 880 | 950 | 1100 | 1200 |                                      |
| L1         | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000, 1300                      |
| L3         | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000, 1300                      |
| L5         | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000, 1300                      |
| L6         | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000, 1300                      |
| L8         | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300              |
| L10        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300, 1150/1200   |
| L13        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300              |
| L14        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 550, 1000, 1300                 |
| L15        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000, 1300                      |
| L16        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 600, 1000, 1100-1300            |
| L21        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1300                            |
| L22        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 550, 1000, 1300                 |
| P17        | -                    | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -    | -    | 600                                  |
| P19        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250                                  |
| P20        | +                    | -   | -   | +       | -   | -   | -   | -    | -    | 210/220, 380, 650                    |
| P21        | -                    | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -    | -    | 250                                  |
| P22        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1100-1300                       |
| P24        | -                    | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -    | -    | 250                                  |
| A3         | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 600, 1000, 1100-1300, 1150/1200 |
| A4         | -                    | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -    | -    | 600                                  |
| A7         | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300              |
| A18        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300              |
| A23        | +                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1000,<br>1100-1300, 1150/1200   |
| A26        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | +    | -    | 250, 1100-1300                       |
| A28        | -                    | -   | -   | +       | -   | +   | -   | -    | -    | 250, 1150/1200                       |

7A36 *B. megaterium* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 200 bç, 350 bç, 400 bç ve 600 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce yapılan manuel testler sonucunda *B. megaterium* olabileceğine karar verilmiş olan yerel izolat P22'nin kesim profili referans soyun kesim profiline uymamaktadır. 200 bç, 350 bç ve 600 bç büyüklüğündeki bantlar P22'de gözlenmemekte, buna karşın, 250 bç ve 880 bç büyüklüğündeki ekstra bantlar ve 1100-1300 bç arasında “smear” gözlenmektedir. Bu soy API kiti ile *B. coagulans* olarak belirlenmiş, 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre yapılan taramada ise *B. flexus/B. megaterium* olarak adlandırılmıştır (Çizelge 3.18.).

**Çizelge 3.18.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 7A36 *B. megaterium* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 7A36 <i>B. megaterium</i> |     |     |         |     | Diğer                                |
|------------|---------------------------|-----|-----|---------|-----|--------------------------------------|
|            | 100                       | 200 | 350 | 400/410 | 600 |                                      |
| L1         | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1300                 |
| L3         | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1300                 |
| L5         | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1300                 |
| L6         | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1300                 |
| L8         | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300            |
| L10        | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300 |
| L13        | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300            |
| L14        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 550, 880, 1000, 1300            |
| L15        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1300                 |
| L16        | +                         | -   | -   | +       | +   | 250, 880, 1000, 1100-1300            |
| L21        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1300                       |
| L22        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 550, 880, 1000, 1300            |
| P17        | -                         | +   | +   | +       | +   |                                      |
| P19        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880                             |
| P20        | +                         | -   | -   | +       | -   | 210/220, 380, 650                    |
| P21        | -                         | +   | +   | +       | -   | 250                                  |
| P22        | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1100-1300                  |
| P24        | -                         | +   | +   | +       | -   | 250                                  |
| A3         | +                         | -   | -   | +       | +   | 250, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300 |
| A4         | -                         | +   | +   | +       | +   |                                      |
| A7         | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300            |
| A18        | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300            |
| A23        | +                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300 |
| A26        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 880, 1100, 1100-1300            |
| A28        | -                         | -   | -   | +       | -   | 250, 1150/1200                       |

9A20 *B. stearotheophilus* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili *B. subtilis* referansları 1A1 ve 27E3 için elde edilen bant profilleri ile birebir uyum göstermektedir. Bu nedenle *CfoI* bu soylar için ayırt edici değildir. Manuel testlere göre A26, ticari kitlere göre L8 ve L10 izolatları *B. stearotheophilus* ile benzer bulunmuştur. A26 izolatu referans soyun profilinde gözlenen 100 bç ve 1000 bç'lik bantları vermediği gibi 1100 bç büyüklüğünde ekstra bir bant taşımaktadır. L8 izolatının kesim profili referans soyunki ile birebir uyum göstermektedir. L10 izolatu ise referans soyun bantlarına ek olarak 1150/1200 bç büyüklüğünde bir bant vermektedir. Çizelge 3.19.'da da görüldüğü üzere L8, L13, A7 ve A18 izolatları referans soyla uyumludur. Diğer yerel izolatların kesim profillerinde görülen referans soyla uyumlu/farklı bantlar Çizelge 3.19'da görülmektedir. Bu izolatların hiçbirisi referans soyun kesim profiline tam olarak uymamaktadır.

**Çizelge 3.19.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 9A20 *B. stearothermophilus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 9A20 <i>B. stearothermophilus</i> |     |         |     |      |                      | Diğer             |
|------------|-----------------------------------|-----|---------|-----|------|----------------------|-------------------|
|            | 100                               | 250 | 400/410 | 880 | 1000 | 1100-1300<br>“smear” |                   |
| L1         | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 1300              |
| L3         | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 1300              |
| L5         | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 1300              |
| L6         | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 1300              |
| L8         | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    |                   |
| L10        | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    | 1150/1200         |
| L13        | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    |                   |
| L14        | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 550, 1300         |
| L15        | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 1300              |
| L16        | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    | 600               |
| L21        | -                                 | +   | +       | +   | -    | -                    | 1300              |
| L22        | -                                 | +   | +       | +   | +    | -                    | 550, 1300         |
| P17        | -                                 | -   | +       | -   | -    | -                    | 200, 350, 600     |
| P19        | -                                 | +   | +       | +   | -    | -                    |                   |
| P20        | +                                 | -   | +       | -   | -    | -                    | 210/220, 380, 650 |
| P21        | -                                 | +   | +       | -   | -    | -                    | 200, 350          |
| P22        | +                                 | +   | +       | +   | -    | +                    |                   |
| P24        | -                                 | +   | +       | -   | -    | -                    | 200, 350          |
| A3         | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    | 600,<br>1150/1200 |
| A4         | -                                 | -   | +       | -   | -    | -                    | 200, 350, 600     |
| A7         | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    |                   |
| A18        | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    |                   |
| A23        | +                                 | +   | +       | +   | +    | +                    | 1150/1200         |
| A26        | -                                 | +   | +       | +   | -    | +                    | 1100              |
| A28        | -                                 | +   | +       | +   | -    | -                    | 1150/1200         |

10A5 *B. amyloliquefaciens* soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 250 bç, 410 bç, 880 bç, 1000 bç ve 1300 bç büyüklüğündeki bantlar ile 1100-1300 bç arasında “smear” içermektedir. 25 yerel izolatın *CfoI* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında hiçbir soyun tam olarak aynı profili göstermediği görülmüştür. 1100-1300 bç arasındaki “smear” ayırt edici bir faktör olarak dikkate alınmadığı takdirde L1, L3, L5, L6 ve L15 izolatları referans soyun içerdiği bantların tamamını göstermektedir (Çizelge 3.20.). Ticari kit ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. amyloliquefaciens*’e benzer görülen L10 izolatı referans soya ait 1300 bç bandı taşımazken, 100 bç ve 1150/1200 bç büyüklüğünde iki ekstra bant taşımaktadır. 16S dizi analizi sonucuna göre *B. amyloliquefaciens* ile benzerlik taşıdığı gözlenen L8 izolatı referans soya ait 1300 bç bandı taşımamakta ve 100 bç ekstra bir bant vermektedir. Ticari kitler ile elde edilen sonuçlara göre *B. amyloliquefaciens*’e benzer bulunan izolatlar L16, P20, A18 ve A23’tür. P20 izolatı referans soy ile ortak olarak yalnızca 400/410 bç’lik bandı taşımaktadır. Bunun dışında 100 bç, 210/220 bç, 380 bç ve 650 bç büyüklüğünde 4 bant vermektedir. L16, A18 ve A23 izolatları 1300 bç büyüklüğündeki bant dışında referans soy ile

uyum göstermekte ancak hepsi 100 bç, 600 bç ve 1150/1200 bç büyüklüğündeki bantlardan bir veya ikisini taşımaktadır.

**Çizelge 3.20.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 10A5 <i>B. amyloliquefaciens</i> |         |     |      |                      |      | Diğer                     |
|------------|----------------------------------|---------|-----|------|----------------------|------|---------------------------|
|            | 250                              | 400/410 | 880 | 1000 | 1100-1300<br>“smear” | 1300 |                           |
| L1         | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    |                           |
| L3         | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    |                           |
| L5         | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    |                           |
| L6         | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    |                           |
| L8         | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100                       |
| L10        | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100,<br>1150/1200         |
| L13        | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100                       |
| L14        | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    | 550                       |
| L15        | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    |                           |
| L16        | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100, 600                  |
| L21        | +                                | +       | +   | -    | -                    | +    |                           |
| L22        | +                                | +       | +   | +    | -                    | +    | 550                       |
| P17        | -                                | +       | -   | -    | -                    | -    | 200, 350, 600             |
| P19        | +                                | +       | +   | -    | -                    | -    |                           |
| P20        | -                                | +       | -   | -    | -                    | -    | 100, 210/220,<br>380, 650 |
| P21        | +                                | +       | -   | -    | -                    | -    | 200, 350                  |
| P22        | +                                | +       | +   | -    | +                    | -    | 100                       |
| P24        | +                                | +       | -   | -    | -                    | -    | 200, 350                  |
| A3         | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100, 600,<br>1150/1200    |
| A4         | -                                | +       | -   | -    | -                    | -    | 200, 350, 600             |
| A7         | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100                       |
| A18        | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100                       |
| A23        | +                                | +       | +   | +    | +                    | -    | 100,<br>1150/1200         |
| A26        | +                                | +       | +   | -    | +                    | -    | 1100                      |
| A28        | +                                | +       | +   | -    | -                    | -    | 1150/1200                 |

13A10 *B. sphaericus* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 200 bç, 250 bç, 350 bç e 400 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. P21 ve P24 izolatlarının profili referans soyun bant profiline tam olarak uyum göstermektedir. (Çizelge 3.21.). Manuel testlerde elde edilen sonuçlara göre *B. sphaericus* şüphesi taşıyan L3 izolatı referans soyun kesim profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 250 bç ve 400/410 bç'lik bantları taşıırken, 880 bç, 1000 bç ve 1300 bç büyüklüğünde 3 ekstra bant içermektedir.

**Çizelge 3.21.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 13A10 *B. sphaericus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırması.

| İzolat adı | 13A10 <i>B. sphaericus</i> |     |     |         | Diğer                                     |
|------------|----------------------------|-----|-----|---------|-------------------------------------------|
|            | 200                        | 250 | 350 | 400/410 |                                           |
| L1         | -                          | +   | -   | +       | 880, 1000, 1300                           |
| L3         | -                          | +   | -   | +       | 880, 1000, 1300                           |
| L5         | -                          | +   | -   | +       | 880, 1000, 1300                           |
| L6         | -                          | +   | -   | +       | 880, 1000, 1300                           |
| L8         | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1100-1300                 |
| L10        | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300      |
| L13        | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1100-1300                 |
| L14        | -                          | +   | -   | +       | 550, 880, 1000, 1300                      |
| L15        | -                          | +   | -   | +       | 880, 1000, 1300                           |
| L16        | -                          | +   | -   | +       | 100, 600, 880, 1000, 1100-1300            |
| L21        | -                          | +   | -   | +       | 880, 1300                                 |
| L22        | -                          | +   | -   | +       | 550, 880, 1000, 1300                      |
| P17        | +                          | -   | +   | +       | 600                                       |
| P19        | -                          | +   | -   | +       | 880                                       |
| P20        | -                          | -   | -   | +       | 100, 210/220, 380, 650                    |
| P21        | +                          | +   | +   | +       |                                           |
| P22        | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1100-1300                       |
| P24        | +                          | +   | +   | +       |                                           |
| A3         | -                          | +   | -   | +       | 100, 600, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300 |
| A4         | +                          | -   | +   | +       | 600                                       |
| A7         | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1100-1300                 |
| A18        | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1100-1300                 |
| A23        | -                          | +   | -   | +       | 100, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300      |
| A26        | -                          | +   | -   | +       | 880, 1100, 1100-1300                      |
| A28        | -                          | +   | -   | +       | 1150/1200                                 |

29A1 *B. firmus* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 210/220 bç, 380 bç, 410 bç, 650 bç ve 780 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir. L1 izolatı manuel testler sonucunda *B. subtilis/B. firmus*, L8 izolatı ise API Kiti ile yapılan tiplendirme sonucunda *B. stearothermophilus/B. firmus* olarak adlandırılmıştır. Bu izolatlardan L1, 29A1 *B. firmus* referans soyunun *CfoI* kesimi sonrası verdiği bantlardan yalnızca 400 bç büyüklüğündeki, L8 ise 100 bç ve 400 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Buna karşın her iki izolat da 250 bç, 880 bç ve 1000 bç büyüklüğünde bantlar taşımaktadır (Çizelge 3.22.).

**Çizelge 3.22.** 25 yerel izolat için *CfoI* ile elde edilen bantların 29A1 *B. firmus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 29A1 <i>B. firmus</i> |         |     |         |     |     | Diğer                                     |
|------------|-----------------------|---------|-----|---------|-----|-----|-------------------------------------------|
|            | 100                   | 210/220 | 380 | 400/410 | 650 | 780 |                                           |
| L1         | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1300                      |
| L3         | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1300                      |
| L5         | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1300                      |
| L6         | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1300                      |
| L8         | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300                 |
| L10        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300      |
| L13        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300                 |
| L14        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 550, 880, 1000, 1300                 |
| L15        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1300                      |
| L16        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 600, 880, 1000, 1100-1300            |
| L21        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1300                            |
| L22        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 550, 880, 1000, 1300                 |
| P17        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 200, 350, 600                             |
| P19        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880                                  |
| P20        | +                     | +       | +   | +       | +   | -   |                                           |
| P21        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 200, 250, 350                             |
| P22        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1100-1300                       |
| P24        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 200, 250, 350                             |
| A3         | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 600, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300 |
| A4         | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 200, 350, 600                             |
| A7         | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300                 |
| A18        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1100-1300                 |
| A23        | +                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1000, 1150/1200, 1100-1300      |
| A26        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1100, 1100-1300                 |
| A28        | -                     | -       | -   | +       | -   | -   | 250, 880, 1150/1200                       |

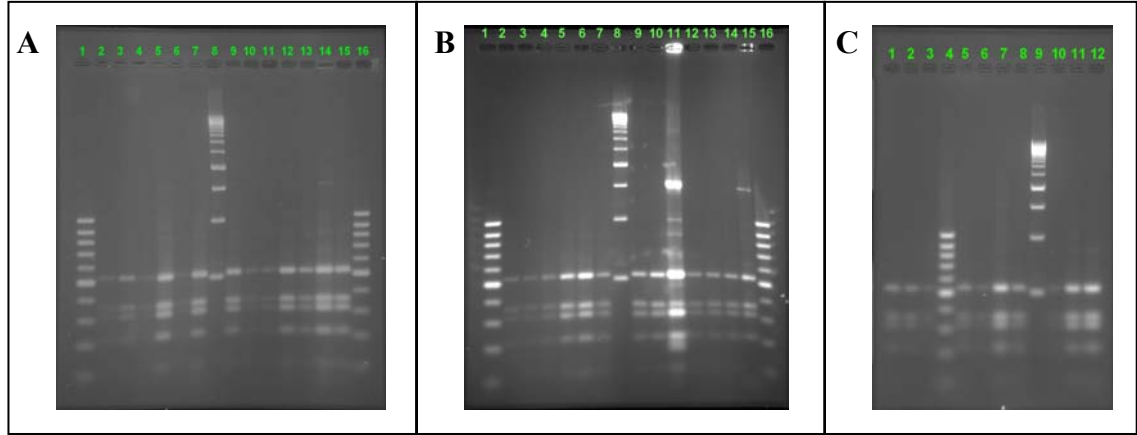
61A1 *B. coagulans* referans soyunun *CfoI* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 200 bç, 250 bç, 350 bç, 400 bç ve 550 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir (Çizelge 3.23.). API Kiti ile yapılan analiz sonucunda *B. coagulans*'a benzer bulunan P22 izolatı, 61A1 *B. coagulans* referans soyu ile uyumlu olarak yalnızca 100 bç, 250 bç ve 400 bç büyüklüğündeki bantları içermekte, ek olarak 880 bç büyüklüğünde bir bant ve 1100-1300 bç arasında “smear” taşımaktadır.

**Çizelge 3.23.** 25 yerel izolat için CfoI ile elde edilen bantların 61A1 *B. coagulans* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 61A1 <i>B. coagulans</i> |     |     |     |         |     | Diğer                                      |
|------------|--------------------------|-----|-----|-----|---------|-----|--------------------------------------------|
|            | 100                      | 200 | 250 | 350 | 400/410 | 550 |                                            |
| L1         | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000, 1300                            |
| L3         | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000, 1300                            |
| L5         | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000, 1300                            |
| L6         | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000, 1300                            |
| L8         | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1100-1300                    |
| L10        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1150/1200,<br>1100-1300      |
| L13        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1100-1300                    |
| L14        | -                        | -   | +   | -   | +       | +   | 880, 1000, 1300                            |
| L15        | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000, 1300                            |
| L16        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 600, 880, 1000,<br>1100-1300               |
| L21        | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1300                                  |
| L22        | -                        | -   | +   | -   | +       | +   | 880,1000, 1300                             |
| P17        | -                        | +   | -   | +   | +       | -   | 600                                        |
| P19        | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880                                        |
| P20        | +                        | -   | -   | -   | +       | -   | 210/220, 380, 650                          |
| P21        | -                        | +   | +   | +   | +       | -   |                                            |
| P22        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1100-1300                             |
| P24        | -                        | +   | +   | +   | +       | -   |                                            |
| A3         | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 600, 880, 1000,<br>1150/1200,<br>1100-1300 |
| A4         | -                        | +   | -   | +   | +       | -   | 600                                        |
| A7         | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1100-1300                    |
| A18        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1100-1300                    |
| A23        | +                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1000,<br>1150/1200,<br>1100-1300      |
| A26        | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1100,<br>1100-1300                    |
| A28        | -                        | -   | +   | -   | +       | -   | 880, 1150/1200                             |

### 3.4.1.2. MboII

16S rDNA PCR ürünlerinin *MboII* kesim profilleri Şekil 3.37.A-C’de görülmektedir.



**Şekil 3.37. 16S rDNA’ların *MboII* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. A: 1, 100 bç belirteç; 2, A23; 3, L10; 4, L13; 5, L16; 6, P20; 7, 1A1; 8, 500 bç belirteç; 9, A3; 10, A7; 11, A18; 12, 27E3; 13, L8; 14, 29A1; 15, 9A20; 16, 100 bç belirteç. B: 1, 100 bç belirteç; 2, P19; 3, P21; 4, P24; 5, 5A1; 6, A26; 7, A28; 8, 500 bç belirteç; 9, 61A1; 10, P22; 11, 7A36; 12, P17; 13, A4; 14, 6A5; 15, 13A10; 16, 100 bç belirteç. C: 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, 100 bç belirteç; 5, 8A3; 6, L6; 7, L14; 8, L15; 9, 500 bç belirteç; 10, L21; 11, L22; 12, 10A5. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbç.**

1A1 *B. subtilis* referans soyunun *MboII* ile kesim profili 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç, 650 bç ve 750 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. subtilis* olabileceklerine karar verilmiş olan 12 yerel izolat L8, L10, L13, L16, A3, A7, A18, A23, A26, A28, P19 ve P20 de dahil 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soyun kesim profiline uyum göstermemektedir (Çizelge 3.24.). *MboII* ile kesilen izolatların tamamı 1A1 *B. subtilis* referans soyunun kesim profilinde bulunan 210 bç, 320 bç ve 380 bç büyüklüğündeki bantları taşımakta, 510/520 bç büyüklüğündeki bant 8 izolat (L1, L3, L5, L6, L14, L15, L21 ve L22) dışındaki tüm izolatlarda görülmekte, 650 bç büyüklüğündeki bant yalnızca P20’de, 750 bç büyüklüğündeki bant ise L8, L16, A3, A7 ve A18 izolatlarında gözlenmektedir.

**Çizelge 3.24.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 1A1 *B. subtilis* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

|            | 1A1 <i>B. subtilis</i> |     |     |         |     |     |                    |
|------------|------------------------|-----|-----|---------|-----|-----|--------------------|
| İzolat adı | 210                    | 320 | 380 | 510/520 | 650 | 750 | Diğer              |
| L1         | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 540                |
| L3         | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 540                |
| L5         | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 540                |
| L6         | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 540                |
| L8         | +                      | +   | +   | +       | -   | +   |                    |
| L10        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   |                    |
| L13        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   |                    |
| L14        | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 100, 540, 700, 850 |
| L15        | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 100, 540           |
| L16        | +                      | +   | +   | +       | -   | +   |                    |
| L21        | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 540                |
| L22        | +                      | +   | +   | -       | -   | -   | 100, 540, 850      |
| P17        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| P19        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| P20        | +                      | +   | +   | +       | +   | -   |                    |
| P21        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| P22        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| P24        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| A3         | +                      | +   | +   | +       | -   | +   |                    |
| A4         | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| A7         | +                      | +   | +   | +       | -   | +   |                    |
| A18        | +                      | +   | +   | +       | -   | +   |                    |
| A23        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   |                    |
| A26        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |
| A28        | +                      | +   | +   | +       | -   | -   | 100                |

27E3 *B. subtilis* “natto” referans soyunun *MboII* ile kesim sonrasında 1A1 *B. subtilis* referans soyunda gözlenen 650 bç’lık bantı vermediği gözlemlendi. 27E3 *B. subtilis*’in kesim profili 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç ve 750 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. subtilis* olabileceklerine karar verilmiş olan 12 yerel izolat L8, L10, L13, L16, A3, A7, A18, A23, A26, A28, P19 ve P20’dir. L8, L16, A3, A7 ve A18’in kesim profilleri referans soy ile birebir uyum göstermektedir. L10, L13 ve A23 izolatları referans soyda gözlenen 750 bç’lık bantı içermemektedir (Çizelge 3.25.).

**Çizelge 3.25.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 27E3 *B. subtilis* “*natto*” referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

|            | 27E3 <i>B. subtilis</i> “ <i>natto</i> ” |     |     |         |     |                    |
|------------|------------------------------------------|-----|-----|---------|-----|--------------------|
| İzolat adı | 210                                      | 320 | 380 | 510/520 | 750 | Diğer              |
| L1         | +                                        | +   | +   | -       | -   | 540                |
| L3         | +                                        | +   | +   | -       | -   | 540                |
| L5         | +                                        | +   | +   | -       | -   | 540                |
| L6         | +                                        | +   | +   | -       | -   | 540                |
| L8         | +                                        | +   | +   | +       | +   |                    |
| L10        | +                                        | +   | +   | +       | -   |                    |
| L13        | +                                        | +   | +   | +       | -   |                    |
| L14        | +                                        | +   | +   | -       | -   | 100, 540, 700, 850 |
| L15        | +                                        | +   | +   | -       | -   | 100, 540           |
| L16        | +                                        | +   | +   | +       | +   |                    |
| L21        | +                                        | +   | +   | -       | -   | 540                |
| L22        | +                                        | +   | +   | -       | -   | 100, 540, 850      |
| P17        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| P19        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| P20        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 650                |
| P21        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| P22        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| P24        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| A3         | +                                        | +   | +   | +       | +   |                    |
| A4         | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| A7         | +                                        | +   | +   | +       | +   |                    |
| A18        | +                                        | +   | +   | +       | +   |                    |
| A23        | +                                        | +   | +   | +       | -   |                    |
| A26        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |
| A28        | +                                        | +   | +   | +       | -   | 100                |

5A1 *B. licheniformis* referans soyunun *MboII* ile kesim profili 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç ve 850 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. licheniformis* olabileceklerine karar verilmiş olan 7 yerel izolat L8, L10, P19, P21, P24, A26 ve A28’dir. Bu yerel izolatların *MboII* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında izolatların hepsinin 850 bç’lik bant dışında tüm bantları içerdikleri görülmüştür (Çizelge 3.26.).

**Çizelge 3.26.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 5A1 *B. licheniformis* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 5A1 <i>B. licheniformis</i> |     |     |     |         |     | Diğer    |
|------------|-----------------------------|-----|-----|-----|---------|-----|----------|
|            | 100                         | 210 | 320 | 380 | 510/520 | 850 |          |
| L1         | -                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L3         | -                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L5         | -                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L6         | -                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L8         | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 750      |
| L10        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| L13        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| L14        | +                           | +   | +   | +   | -       | +   | 540, 700 |
| L15        | +                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L16        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 750      |
| L21        | -                           | +   | +   | +   | -       | -   | 540      |
| L22        | +                           | +   | +   | +   | -       | +   | 540      |
| P17        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| P19        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| P20        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 650      |
| P21        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| P22        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| P24        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| A3         | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 750      |
| A4         | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| A7         | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 750      |
| A18        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   | 750      |
| A23        | -                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| A26        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |
| A28        | +                           | +   | +   | +   | +       | -   |          |

6A5 *B. cereus* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç ve 510/520 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. cereus* olabilecekleri düşünülen 4 yerel izolat P17, P20, P22 ve A4'tür. Bu yerel izolatların *MboII* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında P17, P22 ve A4 izolatlarının referans soy ile aynı profili gösterdiği, P20 izolatının ise 100 bç'lik bant dışında tüm bantları içerdiği görülmüştür. Bu izolatlar dışında P19, P21, P24, A26 ve A28 de referans soy ile aynı bant profilini göstermektedir (Çizelge 3.27.).

**Çizelge 3.27.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 6A5 *B. cereus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 6A5 <i>B. cereus</i> |     |     |     |         | Diğer         |
|------------|----------------------|-----|-----|-----|---------|---------------|
|            | 100                  | 210 | 320 | 380 | 510/520 |               |
| L1         | -                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L3         | -                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L5         | -                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L6         | -                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L8         | -                    | +   | +   | +   | +       | 750           |
| L10        | -                    | +   | +   | +   | +       |               |
| L13        | -                    | +   | +   | +   | +       |               |
| L14        | +                    | +   | +   | +   | -       | 540, 700, 850 |
| L15        | +                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L16        | -                    | +   | +   | +   | +       | 750           |
| L21        | -                    | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L22        | +                    | +   | +   | +   | -       | 540, 850      |
| P17        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| P19        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| P20        | -                    | +   | +   | +   | +       | 650           |
| P21        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| P22        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| P24        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| A3         | -                    | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A4         | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| A7         | -                    | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A18        | -                    | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A23        | -                    | +   | +   | +   | +       |               |
| A26        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |
| A28        | +                    | +   | +   | +   | +       |               |

7A36 *B. megaterium* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 170 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç, 480 bç, 510/520 bç, 700 bç, 850 bç ve 1000 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce yapılan manuel testler sonucunda *B. megaterium* olabileceğine karar verilmiş olan yerel izolat P22'nin kesim profili referans soyun kesim profiline uymamaktadır. P22 izolatı *MboII* ile kesim sonrasında yalnızca 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç ve 510/520 bç büyüklüğündeki bantları vermiştir. Referans soyun kesim profilinde bulunan 170 bç, 480 bç, 700bç, 850 bç ve 1000 bç büyüklüğündeki bantlar P22 16S rDNA'sının *MboII* kesim profilinde bulunmamaktadır (Çizelge 3.28.).

**Çizelge 3.28.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 7A36 *B. megaterium* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 7A36 <i>B. megaterium</i> |     |     |     |     |     |         |     |     |      | Diğer |
|------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|------|-------|
|            | 100                       | 170 | 210 | 320 | 380 | 480 | 510/520 | 700 | 850 | 1000 |       |
| L1         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L3         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L5         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L6         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L8         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 750   |
| L10        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| L13        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| L14        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | +   | +   | -    | 540   |
| L15        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L16        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 750   |
| L21        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | -   | -    | 540   |
| L22        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | -       | -   | +   | -    | 540   |
| P17        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| P19        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| P20        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 650   |
| P21        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| P22        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| P24        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| A3         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 750   |
| A4         | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| A7         | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 750   |
| A18        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    | 750   |
| A23        | -                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| A26        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |
| A28        | +                         | -   | +   | +   | +   | -   | +       | -   | -   | -    |       |

8A3 *B. pumilus* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç ve 540 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. pumilus* olabileceklerine karar verilmiş olan 8 yerel izolat L1, L3, L5, L6, L14, L15, L21 ve L22'dir. Bu yerel izolatların *MboII* kesim profilleri referans soyunki ile karşılaştırıldığında, izolatların hiçbirisinin 510/520 bç büyüklüğündeki bandı içermediği, buna karşın diğer dört bandı verdiği görülmüştür. İzolatlardan L14 ayrıca 100 bç, 700 bç ve 850 bç, L22 ise 100 bç ve 850 bç büyüklüğünde bantlar içermektedir. *MboII* ile kesilen diğer 17 izolatın tamamının yalnızca 540 bç büyüklüğündeki bandı içermediği, bunun dışındaki diğer dört bandı verdiği görülmüştür. Bu izolatlar ayrıca 100 bç, 650 bç veya 750 bç büyüklüğünde bir bant daha vermektedir (Çizelge 3.29.).

**Çizelge 3.29.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 8A3 *B. pumilus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 8A3 <i>B. pumilus</i> |     |     |         |     | Diğer         |
|------------|-----------------------|-----|-----|---------|-----|---------------|
|            | 210                   | 320 | 380 | 510/520 | 540 |               |
| L1         | +                     | +   | +   | -       | +   |               |
| L3         | +                     | +   | +   | -       | +   |               |
| L5         | +                     | +   | +   | -       | +   |               |
| L6         | +                     | +   | +   | -       | +   |               |
| L8         | +                     | +   | +   | +       | -   | 750           |
| L10        | +                     | +   | +   | +       | -   |               |
| L13        | +                     | +   | +   | +       | -   |               |
| L14        | +                     | +   | +   | -       | +   | 100, 700, 850 |
| L15        | +                     | +   | +   | -       | +   | 100           |
| L16        | +                     | +   | +   | +       | -   | 750           |
| L21        | +                     | +   | +   | -       | +   |               |
| L22        | +                     | +   | +   | -       | +   | 100, 850      |
| P17        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| P19        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| P20        | +                     | +   | +   | +       | -   | 650           |
| P21        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| P22        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| P24        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| A3         | +                     | +   | +   | +       | -   | 750           |
| A4         | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| A7         | +                     | +   | +   | +       | -   | 750           |
| A18        | +                     | +   | +   | +       | -   | 750           |
| A23        | +                     | +   | +   | +       | -   |               |
| A26        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |
| A28        | +                     | +   | +   | +       | -   | 100           |

9A20 *B. stearothermophilus* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç, 650 bç, 750 bç ve 900 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel soyun hiçbirisi referans soyun kesim profili ile uyum göstermemiştir. İzolatların tamamı 210 bç, 320 bç, 380 bç büyüklüğündeki bantları içerirken, hiçbirisi 900 bç büyüklüğündeki bandı vermemiştir (Çizelge 3.30.). Manuel testlere göre *B. stearothermophilus*'e benzer bulunan A26 izolatu referans soyun verdiği bantlardan yalnızca 210 bç, 320 bç, 380 bç ve 510/520 bç büyüklüğündeki bantları taşımakta, ek olarak 100 bç büyüklüğünde ekstra bir bant vermektedir. Ticari kitlere göre *B. stearothermophilus* ile benzerlik gösteren izolatlardan L8 referans soyda gözlenen bantlardan 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç ve 750 bç büyüklüğündeki bantları verirken, L10 izolatu ise yalnızca 210 bç, 320 bç, 380 bç ve 510/520 bç büyüklüğündeki bantları vermektedir.

**Çizelge 3.30.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 9A20 *B. stearothermophilus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 9A20 <i>B. stearothermophilus</i> |     |     |         |     |     |     | Diğer              |
|------------|-----------------------------------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|--------------------|
|            | 210                               | 320 | 380 | 510/520 | 650 | 750 | 900 |                    |
| L1         | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 540                |
| L3         | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 540                |
| L5         | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 540                |
| L6         | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 540                |
| L8         | +                                 | +   | +   | +       | -   | +   | -   |                    |
| L10        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   |                    |
| L13        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   |                    |
| L14        | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 100, 540, 700, 850 |
| L15        | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 100, 540           |
| L16        | +                                 | +   | +   | +       | -   | +   | -   |                    |
| L21        | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 540                |
| L22        | +                                 | +   | +   | -       | -   | -   | -   | 100, 540, 850      |
| P17        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| P19        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| P20        | +                                 | +   | +   | +       | +   | -   | -   |                    |
| P21        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| P22        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| P24        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| A3         | +                                 | +   | +   | +       | -   | +   | -   |                    |
| A4         | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| A7         | +                                 | +   | +   | +       | -   | +   | -   |                    |
| A18        | +                                 | +   | +   | +       | -   | +   | -   |                    |
| A23        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   |                    |
| A26        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |
| A28        | +                                 | +   | +   | +       | -   | -   | -   | 100                |

10A5 *B. amyloliquefaciens* soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç, 540 bç, 700 bç ve 850 bç'lik bantları içermektedir. L14 izolatının bant profili referans soy ile uyum göstermektedir. İzolatların tamamının kesim profillerinde 210 bç, 320 bç, 380 bç büyüklüğündeki bantlar görülürken, 700 bç büyüklüğündeki bant yalnızca L14'te, 850 bç büyüklüğündeki bant ise yalnızca L14 ve L22'de görülmüştür (Çizelge 3.31.). Ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizine göre 10A5 *B. amyloliquefaciens* ile benzerlik gösteren L8, L10, L16, P20, A18 ve A23 izolatlarından L10 ve A23 yalnızca 210 bç, 320 bç e 380 bç'lik bantları verirken, bu üç banda ek olarak L8, L16 ve A18 izolatları 750 bç, P20 izolatı ise 650 bç büyüklüğünde ekstra bir bant taşımaktadır.

**Çizelge 3.31.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 10A5 <i>B. amyloliquefaciens</i> |     |     |     |     |     |     | Diğer |
|------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
|            | 100                              | 210 | 320 | 380 | 540 | 700 | 850 |       |
| L1         | -                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L3         | -                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L5         | -                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L6         | -                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L8         | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 750   |
| L10        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| L13        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| L14        | +                                | +   | +   | +   | +   | +   | +   |       |
| L15        | +                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L16        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 750   |
| L21        | -                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   |       |
| L22        | +                                | +   | +   | +   | +   | -   | +   |       |
| P17        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| P19        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| P20        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 650   |
| P21        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| P22        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| P24        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| A3         | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 750   |
| A4         | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| A7         | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 750   |
| A18        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   | 750   |
| A23        | -                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| A26        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |
| A28        | +                                | +   | +   | +   | -   | -   | -   |       |

13A10 *B. sphaericus* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç, 620 bç, 850 bç ve 1000 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soyun bant profili ile uyum göstermemiştir. Referans soyun bant profilinde bulunan 620 bç ve 1000 bç büyüklüğündeki bantlar hiçbir izolat profilinde bulunmamakta, 850 bç büyüklüğündeki bant ise yalnızca L14 ve L22 izolatlarında görülmektedir (Çizelge 3.32.). Manuel testlere göre *B. sphaericus* şüphesi taşıyan L3 izolatu ise referans soyun kesim profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 210 bç, 320 bç ve 380 bç büyüklüğündeki bantları taşıırken, 540 bç büyüklüğünde ekstra bir bant içermektedir.

**Çizelge 3.32.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 13A10 *B. sphaericus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 13A10 <i>B. sphaericus</i> |     |     |     |         |     |     |      | Diğer    |
|------------|----------------------------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|------|----------|
|            | 100                        | 210 | 320 | 380 | 510/520 | 620 | 850 | 1000 |          |
| L1         | -                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L3         | -                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L5         | -                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L6         | -                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L8         | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 750      |
| L10        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| L13        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| L14        | +                          | +   | +   | +   | -       | -   | +   | -    | 540, 700 |
| L15        | +                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L16        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 750      |
| L21        | -                          | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -    | 540      |
| L22        | +                          | +   | +   | +   | -       | -   | +   | -    | 540      |
| P17        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| P19        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| P20        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 650      |
| P21        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| P22        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| P24        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| A3         | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 750      |
| A4         | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| A7         | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 750      |
| A18        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    | 750      |
| A23        | -                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| A26        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |
| A28        | +                          | +   | +   | +   | +       | -   | -   | -    |          |

29A1 *B. firmus* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç, 650 bç, 750 bç, 900 bç ve 950 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir. *MboII* ile kesilen izolatların tümünde 210 bç, 320 bç ve 380 bç büyüklüğündeki bantlar görülürken, 900 bç ve 950 bç büyüklüğündeki bantlar hiçbirisinde görülmemiştir. 650 bç büyüklüğündeki bant ise yalnızca P20’de gözlenmiştir (Çizelge 3.33.). Manuel testlere göre *B. firmus*’a benzer bulunan L1 izolatu referans soyun bant profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 210 bç, 320 bç ve 380 bç’lik bantları taşıırken, ek olarak 540 bç büyüklüğünde ekstra bir bant vermektedir. Ticari kitler ile elde edilen sonuçlara göre *B. firmus* şüphesi taşıyan L8 izolatu referans soya ait bantlardan yalnızca 210 bç, 320 bç, 380 bç, 510/520 bç ve 750 bç büyüklüğündeki bantları vermektedir.

**Çizelge 3.33.** 25 yerel izolat için *MboII* ile elde edilen bantların 29A1 *B. firmus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 29A1 <i>B. firmus</i> |     |     |         |     |     |     |     | Diğer              |
|------------|-----------------------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|--------------------|
|            | 210                   | 320 | 380 | 510/520 | 650 | 750 | 900 | 950 |                    |
| L1         | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 540                |
| L3         | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 540                |
| L5         | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 540                |
| L6         | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 540                |
| L8         | +                     | +   | +   | +       | -   | +   | -   | -   |                    |
| L10        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   |                    |
| L13        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   |                    |
| L14        | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 100, 540, 700, 850 |
| L15        | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 100, 540           |
| L16        | +                     | +   | +   | +       | -   | +   | -   | -   |                    |
| L21        | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 540                |
| L22        | +                     | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -   | 100, 540, 850      |
| P17        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| P19        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| P20        | +                     | +   | +   | +       | +   | -   | -   | -   |                    |
| P21        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| P22        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| P24        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| A3         | +                     | +   | +   | +       | -   | +   | -   | -   |                    |
| A4         | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| A7         | +                     | +   | +   | +       | -   | +   | -   | -   |                    |
| A18        | +                     | +   | +   | +       | -   | +   | -   | -   |                    |
| A23        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   |                    |
| A26        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |
| A28        | +                     | +   | +   | +       | -   | -   | -   | -   | 100                |

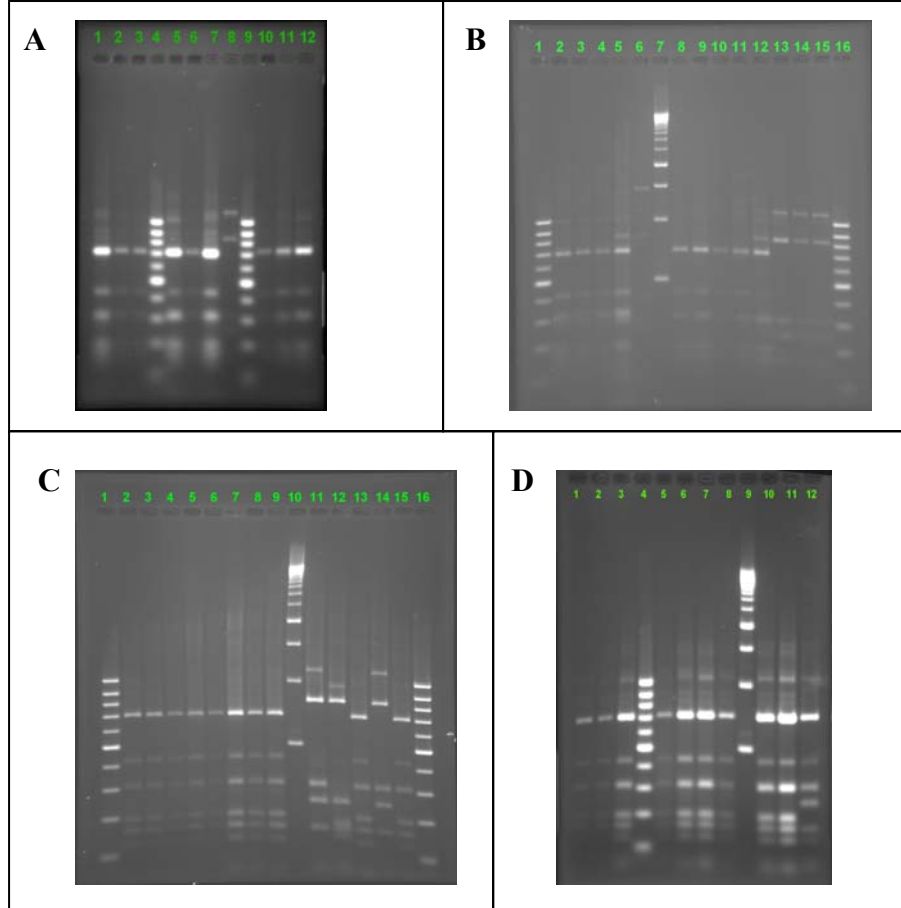
61A1 *B. coagulans* referans soyunun *MboII* ile kesim sonrası bant profili 6A5 *B. cereus* referans soyunun kesim profili ile aynıdır. Bu nedenle *MboII* enziminin bu iki soy arasında ayırım yapamadığı söylenebilir. 61A1 *B. coagulans* referans soyunun bant profili 100 bç, 210 bç, 320 bç, 380 bç ve 510/520 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Aynı enzimle kesilen P17, P19, P21, P22, P24, A4, A26 ve A28 izolatları da referans soy ile aynı bant profilini göstermektedir. Bunlardan P22 izolatı API kiti ile elde edilen sonuçlara göre *B. coagulans* ile benzerlik göstermiştir. İzolatların tamamı referans soyda bulunan 210 bç, 320 bç, 380 bç büyüklüğündeki bantları içerirken, bazıları ya 100 bç ya da 510 bç büyüklüğündeki bandı içermekte ya da ikisini birden içermemektedir (Çizelge 3.34.).

**Çizelge 3.34.** 25 yerel izolat için *MbolI* ile elde edilen bantların 61A1 *B. coagulans* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması.

| İzolat adı | 61A1 <i>B. coagulans</i> |     |     |     |         | Diğer         |
|------------|--------------------------|-----|-----|-----|---------|---------------|
|            | 100                      | 210 | 320 | 380 | 510/520 |               |
| L1         | -                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L3         | -                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L5         | -                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L6         | -                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L8         | -                        | +   | +   | +   | +       | 750           |
| L10        | -                        | +   | +   | +   | +       |               |
| L13        | -                        | +   | +   | +   | +       |               |
| L14        | +                        | +   | +   | +   | -       | 540, 700, 850 |
| L15        | +                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L16        | -                        | +   | +   | +   | +       | 750           |
| L21        | -                        | +   | +   | +   | -       | 540           |
| L22        | +                        | +   | +   | +   | -       | 540, 850      |
| P17        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| P19        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| P20        | -                        | +   | +   | +   | +       | 650           |
| P21        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| P22        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| P24        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| A3         | -                        | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A4         | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| A7         | -                        | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A18        | -                        | +   | +   | +   | +       | 750           |
| A23        | -                        | +   | +   | +   | +       |               |
| A26        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |
| A28        | +                        | +   | +   | +   | +       |               |

### 3.4.1.3. Sau3AI

16S rDNA PCR ürünlerinin *Sau3AI* enzimi ile kesim profilleri Şekil 3.38.A-D'de görülmektedir.



**Şekil 3.38. 16S rDNA'ların *Sau3AI* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. A: 1, A3; 2, A7; 3, A18; 4, 100 bç belirteç (Fermentas); 5, 1A1; 6, A23; 7, L16; 8, P20; 9, 100 bç belirteç (Fermentas); 10, L13; 11, 8A3; 12, 5A1. B: 1, 100 bç belirteç (Fermentas); 2, L10-*rrn*; 3, L8-*rrn*; 4, L21-*rrn*; 5, 27E3-*rrn*; 6, 6A5-*rrn*; 7, 500 bç belirteç (Fermentas); 8, L10-16S; 9, L8-16S; 10, L21-16S; 11, 8A3-16S; 12, 27E3-16S; 13, 6A5-16S; 14, P17-16S; 15, A4-16S; 16, 100 bç belirteç (Fermentas). C: 1, 100 bç belirteç (Fermentas); 2, L1; 3, L3; 4, L5; 5, 8A3; 6, L6; 7, L14; 8, L15; 9, L22; 10, 500 bç belirteç (Fermentas); 11, 29A1; 12, 7A36; 13, P22; 14, 6A5; 15, 61A1; 16, 100 bç belirteç (Fermentas). D: 1, P19; 2, P21; 3, 5A1; 4, 100 bç belirteç (Fermentas); 5, P24; 6, A26; 7, 9A20; 8, A28; 9, 500 bç belirteç (Fermentas); 10, 1A1; 11, 10A5; 12, 13A10. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbç.**

1A1 *B. subtilis* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 120 bç, 150 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç, 430 bç, 700 bç, 720 bç, 800 bç, 830 bç, 900 bç, 1031 bç ve 1050 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. subtilis* olabileceklerine karar

verilmiş olan 12 yerel izolat L8, L10, L13, L16, A3, A7, A18, A23, A26, A28, P19 ve P20 de dahil 25 yerel izolatin hiçbirisi referans soyun kesim profiline uyum göstermemektedir. Jelde silik olarak gözlenen bantlar dikkate alınmadığı taktirde L16 ve A3 soyları geriye kalan bantlar açısından referans soy ile uyumludur (Çizelge 3.35.). P17 ve A4 izolatları referans soyun kesim profilinde görülen bantların hiçbirisini taşımamaktadır.

**Çizelge 3.35.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 1A1 *B. subtilis* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 1A1 <i>B. subtilis</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      | Diğer                    |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|--------------------------|
|            | 120                    | 150 | 200 | 310 | 420 | 430 | 700 | 720 | 800 | 830 | 900 | 1031 | 1050 |                          |
| L1         | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850, 1000           |
| L3         | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L5         | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170                      |
| L6         | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170                      |
| L8         | -                      | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L10        | -                      | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L13        | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| L14        | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L15        | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L16        | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -    | +    |                          |
| L21        | -                      | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L22        | +                      | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| P17        | -                      | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| P19        | +                      | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |
| P20        | -                      | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 270, 850, 1200           |
| P21        | +                      | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |
| P22        | +                      | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170                      |
| P24        | +                      | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| A3         | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -    | +    |                          |
| A4         | -                      | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| A7         | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| A18        | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| A23        | -                      | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| A26        | +                      | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    | 80                       |
| A28        | +                      | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |

5A1 *B. licheniformis* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 80 bç, 120 bç, 150 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç, 700 bç, 720 bç, 800 bç, 830 bç, 900 bç, 1031 bç ve 1050 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. licheniformis* olabileceklerine karar verilmiş olan L8, L10, P19, P21, P24, A26 ve A28 yerel izolatlarından hiçbirisinin referans soy ile aynı bant profilini göstermediği görülmüştür. P19, P21 ve A28 izolatları 80 bç, 720 bç, 800 bç ve 1050 bç, A26 izolatu 720 bç, 800 bç ve 1050 bç büyüklüğündeki bantları içermemekte, P24 ise yalnızca 120 bç, 150 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç ve 700 bç büyüklüğündeki bantları

içermektedir. L8 ve L10 izolatları ise yalnızca 150 bç, 200 bç, 310 bç ve 700 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir (Çizelge 3.36.).

**Çizelge 3.36.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 5A1 *B. licheniformis* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 5A1 <i>B. licheniformis</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      | Diğer                    |
|------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|--------------------------|
|            | 80                          | 120 | 150 | 200 | 310 | 420 | 700 | 720 | 800 | 830 | 900 | 1031 | 1050 |                          |
| L1         | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850, 1000           |
| L3         | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L5         | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170                      |
| L6         | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170                      |
| L8         | -                           | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L10        | -                           | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L13        | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430                      |
| L14        | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L15        | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| L16        | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -    | +    | 430                      |
| L21        | -                           | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 450                 |
| L22        | -                           | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -    | -    | 170, 850                 |
| P17        | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| P19        | -                           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |
| P20        | -                           | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 270, 850, 1200           |
| P21        | -                           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |
| P22        | -                           | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 170, 430                 |
| P24        | -                           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -    | -    |                          |
| A3         | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -    | +    | 430                      |
| A4         | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| A7         | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430                      |
| A18        | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430                      |
| A23        | -                           | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430                      |
| A26        | +                           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |
| A28        | -                           | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | -    |                          |

6A5 *B. cereus* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 180 bç, 280 bç, 300 bç, 850 bç, 1200 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. cereus* olabileceklerine karar verilmiş olan P17 ve A4 yerel izolatlarının kesim profilleri referans soyunki ile örtüşmektedir. VITEK sistemi ile yapılan tiplendirme sonucu *B. cereus*'a benzer görülen P22 izolatı *Sau3AI* kesim profilinde referans soya ait hiçbir bandı taşımamaktadır. 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. cereus*'a benzer bulunan P20 izolatı ise referans soy ile uyumlu olarak yalnızca 850 bç ve 1200 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir (Çizelge 3.37.).

**Çizelge 3.37.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 6A5 *B. cereus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 6A5 <i>B. cereus</i> |     |     |     |      | Diğer                                            |
|------------|----------------------|-----|-----|-----|------|--------------------------------------------------|
|            | 180                  | 280 | 300 | 850 | 1200 |                                                  |
| L1         | -                    | -   | -   | +   | -    | 120, 170, 200, 310, 420, 700, 900, 1000          |
| L3         | -                    | -   | -   | +   | -    | 120, 170, 200, 310, 420, 700, 900                |
| L5         | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 170, 310, 420, 700                          |
| L6         | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 170, 200, 310, 420, 700                     |
| L8         | +                    | -   | -   | -   | -    | 150, 200, 310, 450, 700                          |
| L10        | +                    | -   | -   | -   | -    | 150, 200, 310, 450, 700                          |
| L13        | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 430, 720                                    |
| L14        | -                    | -   | -   | +   | -    | 120, 170, 310, 420, 700, 900                     |
| L15        | -                    | -   | -   | +   | -    | 120, 170, 200, 310, 420, 700, 900                |
| L16        | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050               |
| L21        | +                    | -   | -   | -   | -    | 150, 200, 310, 450, 700                          |
| L22        | -                    | -   | -   | +   | -    | 120, 170, 200, 310, 420, 700, 900                |
| P17        | +                    | +   | +   | +   | +    |                                                  |
| P19        | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |
| P20        | -                    | -   | -   | +   | +    | 270, 310                                         |
| P21        | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, , 1031   |
| P22        | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 170, 200, 310, 430, 700                     |
| P24        | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700                     |
| A3         | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050               |
| A4         | +                    | +   | +   | +   | +    |                                                  |
| A7         | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A18        | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A23        | -                    | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A26        | -                    | -   | -   | -   | -    | 80, 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031 |
| A28        | -                    | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |

7A36 *B. megaterium* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 150 bç, 170 bç, 250 bç, 850 bç, 950 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler sonucunda *B. megaterium* olabileceğine karar verilmiş olan P22 yerel izolatının kesim profili referans soyun kesim profili ile uyum göstermemektedir (Çizelge 3.38.). P22'nin profili yalnızca, referans soyun *Sau3AI* profilinde bulunan 170 bç büyüklüğündeki bandı içermektedir.

**Çizelge 3.38.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 7A36 *B. megaterium* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 7A36 <i>B. megaterium</i> |     |     |     |     | Diğer                                       |
|------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------------------------------------|
|            | 150                       | 170 | 250 | 850 | 950 |                                             |
| L1         | -                         | +   | -   | +   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 900, 1000          |
| L3         | -                         | +   | -   | +   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 900                |
| L5         | -                         | +   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700                     |
| L6         | -                         | +   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700                     |
| L8         | +                         | -   | -   | -   | -   | 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L10        | +                         | -   | -   | -   | -   | 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L13        | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 430, 720                               |
| L14        | -                         | +   | -   | +   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 900                |
| L15        | -                         | +   | -   | +   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 900                |
| L16        | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050          |
| L21        | +                         | -   | -   | -   | -   | 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L22        | -                         | +   | -   | +   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 900                |
| P17        | -                         | -   | -   | +   | -   | 180, 280, 300, 1200                         |
| P19        | +                         | -   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |
| P20        | -                         | -   | -   | +   | -   | 270, 310, 1200                              |
| P21        | +                         | -   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 830, 900, , 1031   |
| P22        | -                         | +   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 430, 700                     |
| P24        | +                         | -   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700                     |
| A3         | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050          |
| A4         | -                         | -   | -   | +   | -   | 180, 280, 300, 1200                         |
| A7         | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 310, 430, 720                          |
| A18        | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 310, 430, 720                          |
| A23        | -                         | -   | -   | -   | -   | 200, 310, 430, 720                          |
| A26        | +                         | -   | -   | -   | -   | 80, 120, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031 |
| A28        | +                         | -   | -   | -   | -   | 120, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |

8A3 *B. pumilus* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 150 bç, 180 bç, 200 bç, 310 bç, 450 bç, 700 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. Daha önce manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. pumilus* olabileceklerine karar verilmiş olan 8 yerel izolat L1, L3, L5, L6, L14, L15, L21 ve L22 arasından sadece L21 izolatu referans soy ile aynı kesim profilini göstermektedir. Ayrıca L8 ve L10 izolatlarının *Sau3AI* kesim profilleri de referans soy ile örtüşmektedir (Çizelge 3.39.).

**Çizelge 3.39.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 8A3 *B. pumilus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 8A3 <i>B. pumilus</i> |     |     |     |     |     | Diğer                         |
|------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|
|            | 150                   | 180 | 200 | 310 | 450 | 700 |                               |
| L1         | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420, 850, 900, 1000 |
| L3         | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420, 850, 900       |
| L5         | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420                 |
| L6         | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420                 |
| L8         | +                     | +   | +   | +   | +   | +   |                               |
| L10        | +                     | +   | +   | +   | +   | +   |                               |
| L13        | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720                      |
| L14        | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420, 850, 900       |
| L15        | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420, 850, 900       |
| L16        | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720, 800, 900, 1050      |
| L21        | +                     | +   | +   | +   | +   | +   |                               |
| L22        | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 420, 850, 900       |
| P17        | -                     | +   | -   | -   | -   | -   | 280, 300, 850, 1200           |
| P19        | +                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 420, 830, 900, 1031      |
| P20        | -                     | -   | -   | +   | -   | -   | 270, 850, 1200                |
| P21        | +                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 420, 830, 900, 1031      |
| P22        | -                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 170, 430                 |
| P24        | +                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120,420                       |
| A3         | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720, 800, 900, 1050      |
| A4         | -                     | +   | -   | -   | -   | -   | 280, 300, 850, 1200           |
| A7         | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430,720                       |
| A18        | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430,720                       |
| A23        | -                     | -   | +   | +   | -   | -   | 430,720                       |
| A26        | +                     | -   | +   | +   | -   | +   | 80, 120, 420, 830, 900, 1031  |
| A28        | +                     | -   | +   | +   | -   | +   | 120, 420, 830, 900, 1031      |

9A20 *B. stearothermophilus* ve 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soylarının *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profilleri 120 bç, 150 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç, 700 bç, 830 bç, 900 bç, 1031 bç büyüklüğündeki bantları içermekte ve *Sau3AI* enzimi bu iki referans soy arasında ayırım sağlayamamaktadır. P19, P21, A26 ve A28 izolatlarının kesim profili referans soylarınki ile örtüşmektedir (Çizelge 3.40. ve 3.41.). Bu izolatlardan A26 manuel testlerin sonuçlarına göre *B. stearothermophilus*'a benzemektedir. Ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *B. stearothermophilus* olabilecekleri düşünülen L8 ve L10 izolatları referans soyların bant profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 150 bç, 200 bç, 310 bç ve 700 bç büyüklüğünde olanları vermekte, ek olarak 180 bç ve 450 bç büyüklüğünde iki bant daha taşımaktadır. Ticari kitlerle elde edilen sonuçlara göre *B. amyloliquefaciens* ile benzerlik gösteren L16, P20, A18 ve A23 izolatlarından A18 ve A23, referans soylara ait bantlardan yalnızca 200 bç ve 310 bç olanları taşıırken, 430 bç ve 720 bç büyüklüğünde iki ekstra bant daha içermektedir. L16 izolatı 200 bç, 310 bç ve 900 bç bantlara ek olarak 430 bç, 720 bç, 800 bç ve 1050 bç büyüklüğünde



13A10 *B. sphaericus* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 120 bç, 150 bç, 270 bç, 310 bç, 420 bç, 700 bç, 1031 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir (Çizelge 3.42.). Manuel testlerle elde edilen sonuçlara göre *B. sphaericus* ile benzerlik görülen L3 izolatı referans soyun kesim profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 120 bç, 310 bç, 410 bç ve 700 bç bantları içerirken, ek olarak 170 bç, 200 bç ve 900 bç büyüklüğündeki bantları vermektedir.

**Çizelge 3.42.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 13A10 *B. sphaericus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

|            | 13A10 <i>B. sphaericus</i> |     |     |     |     |     |      |                               |
|------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------------------------------|
| İzolat adı | 120                        | 150 | 270 | 310 | 420 | 700 | 1031 | Diğer                         |
| L1         | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200, 900, 1000           |
| L3         | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200, 900                 |
| L5         | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200                      |
| L6         | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200                      |
| L8         | -                          | +   | -   | +   | -   | +   | -    | 180, 200, 450                 |
| L10        | -                          | +   | -   | +   | -   | +   | -    | 180, 200, 450                 |
| L13        | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720                 |
| L14        | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200, 900                 |
| L15        | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200, 900                 |
| L16        | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720, 800, 900, 1050 |
| L21        | -                          | +   | -   | +   | -   | +   | -    | 180, 200, 450                 |
| L22        | +                          | -   | -   | +   | +   | +   | -    | 170, 200, 900                 |
| P17        | -                          | -   | -   | -   | -   | -   | -    | 180, 280, 300, 1200           |
| P19        | +                          | +   | -   | +   | +   | +   | +    | 200, 830, 900                 |
| P20        | -                          | -   | +   | +   | -   | -   | -    | 1200                          |
| P21        | +                          | +   | -   | +   | +   | +   | +    | 200, 830, 900                 |
| P22        | +                          | -   | -   | +   | -   | +   | -    | 170, 200, 430                 |
| P24        | +                          | +   | -   | +   | +   | +   | -    | 200                           |
| A3         | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720, 800, 900, 1050 |
| A4         | -                          | -   | -   | -   | -   | -   | -    | 180, 280, 300, 1200           |
| A7         | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720                 |
| A18        | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720                 |
| A23        | -                          | -   | -   | +   | -   | -   | -    | 200, 430, 720                 |
| A26        | +                          | +   | -   | +   | +   | +   | +    | 830, 900                      |
| A28        | +                          | +   | -   | +   | +   | +   | +    | 830, 900                      |

27E3 *B. subtilis* “natto” referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 150 bç, 180 bç, 200 bç, 310 bç, 450 bç, 700 bç, 850 bç, 1050 bç, 1200 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel soyun hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir (Çizelge 3.43.).

**Çizelge 3.43.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 27E3 *B. subtilis* “*natto*” referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 27E3 <i>B. subtilis</i> “ <i>natto</i> ” |     |     |     |     |     |     |      |      | Diğer                        |
|------------|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------------------------------|
|            | 150                                      | 180 | 200 | 310 | 450 | 700 | 850 | 1050 | 1200 |                              |
| L1         | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -    | -    | 120, 170, 420, 900, 1000     |
| L3         | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -    | -    | 120, 170, 420, 900           |
| L5         | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 170, 420                |
| L6         | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 170, 420                |
| L8         | +                                        | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -    | -    |                              |
| L10        | +                                        | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -    | -    |                              |
| L13        | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430, 720                     |
| L14        | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -    | -    | 120, 170, 420, 900           |
| L15        | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -    | -    | 120, 170, 420, 900           |
| L16        | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +    | -    | 430, 720, 800, 900           |
| L21        | +                                        | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -    | -    |                              |
| L22        | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +   | -    | -    | 120, 170, 420, 900           |
| P17        | -                                        | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -    | +    | 280, 300                     |
| P19        | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 420, 830, 900, 1031     |
| P20        | -                                        | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -    | +    | 270                          |
| P21        | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 420, 830, 900, 1031     |
| P22        | -                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 170, 430                |
| P24        | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 420                     |
| A3         | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +    | -    | 430, 720, 800, 900           |
| A4         | -                                        | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -    | +    | 280, 300                     |
| A7         | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430, 720                     |
| A18        | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430, 720                     |
| A23        | -                                        | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -    | -    | 430, 720                     |
| A26        | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 80, 120, 420, 830, 900, 1031 |
| A28        | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -    | -    | 120, 420, 830, 900, 1031     |

29A1 *B. firmus* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 170 bç, 250 bç, 300 bç, 850 bç, 1100 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. 25 yerel izolatın hiçbirisi referans soy bant profili ile uyum göstermemiştir. Referans soyun kesim profilinde bulunan 250 bç ve 1100 bç büyüklüğündeki bantlar hiçbir izolatın profilinde görülmemektedir. 300 bç büyüklüğündeki bant ise yalnızca P17 ve A4’te bulunmaktadır (Çizelge 3.44.). Manuel testlere göre *B. firmus* olabileceği düşünülen L1 izolatı, referans soyun bant profilinde gözlenen bantlardan yalnızca 170 bç ve 850 bç büyüklüğündeki iki bandı taşımakta, buna karşın 120 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç, 700 bç, 900 bç ve 1000 bç büyüklüğünde fazladan 7 bant vermektedir. Ticari kitler ile elde edilen sonuçlara göre *B. firmus* ile benzerlik gösteren L8 izolatı ise referans soyun verdiği bantların hiçbirisini taşımamaktadır. L8 izolatı için *Sau3AI* kesimi ile elde edilen bantlar 150 bç, 180 bç, 200 bç, 310 bç, 450 bç ve 700 bç’dir.

**Çizelge 3.44.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 29A1 *B. firmus* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

| İzolat adı | 29A1 <i>B. firmus</i> |     |     |     |      | Diğer                                            |
|------------|-----------------------|-----|-----|-----|------|--------------------------------------------------|
|            | 170                   | 250 | 300 | 850 | 1100 |                                                  |
| L1         | +                     | -   | -   | +   | -    | 120, 200, 310, 420, 700, 900, 1000               |
| L3         | +                     | -   | -   | +   | -    | 120, 200, 310, 420, 700, 900                     |
| L5         | +                     | -   | -   | -   | -    | 120, 200, 310, 420, 700                          |
| L6         | +                     | -   | -   | -   | -    | 120, 200, 310, 420, 700                          |
| L8         | -                     | -   | -   | -   | -    | 150, 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L10        | -                     | -   | -   | -   | -    | 150, 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L13        | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| L14        | +                     | -   | -   | +   | -    | 120, 200, 310, 420, 700, 900                     |
| L15        | +                     | -   | -   | +   | -    | 120, 200, 310, 420, 700, 900                     |
| L16        | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050               |
| L21        | -                     | -   | -   | -   | -    | 150, 180, 200, 310, 450, 700                     |
| L22        | +                     | -   | -   | +   | -    | 120, 200, 310, 420, 700, 900                     |
| P17        | -                     | -   | +   | +   | -    | 180, 280, 1200                                   |
| P19        | -                     | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |
| P20        | -                     | -   | -   | +   | -    | 270, 310, 1200                                   |
| P21        | -                     | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |
| P22        | +                     | -   | -   | -   | -    | 120, 200, 310, 430, 700                          |
| P24        | -                     | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700                     |
| A3         | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720, 800, 900, 1050               |
| A4         | -                     | -   | +   | +   | -    | 180, 280, 1200                                   |
| A7         | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A18        | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A23        | -                     | -   | -   | -   | -    | 200, 310, 430, 720                               |
| A26        | -                     | -   | -   | -   | -    | 80, 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031 |
| A28        | -                     | -   | -   | -   | -    | 120, 150, 200, 310, 420, 700, 830, 900, 1031     |

61A1 *B. coagulans* referans soyunun *Sau3AI* ile kesim sonrası bant profili 120 bç, 170 bç, 200 bç, 310 bç, 420 bç, 700 bç büyüklüğündeki bantları içermektedir. L5 ve L6 yerel izolatlarının kesim profilleri referans soy ile örtüşmektedir. L1, L3, L14, L15 ve L22 izolatları referans soyun *Sau3AI* ile verdiği bantlara ek olarak 850 bç ve 900 bç büyüklüğünde, L1 ayrıca 1000 bç büyüklüğünde bantlar vermiştir. P17 ve A4 izolatları 61A1 *B. coagulans* referans soyunun *Sau3AI* kesim profilinde bulunan bantların hiçbirisini taşımamaktadır (Çizelge 3.45.). API kiti ile elde edilen sonuçlara göre *B. coagulans*'a benzer bulunan P22 izolatı referans soyun *Sau3AI* kesim profilinde gözlenen 420 bç bandı taşımazken, 430 bç ekstra bir bant vermektedir.

**Çizelge 3.45.** 25 yerel izolat için *Sau3AI* ile elde edilen bantların 61A1 *B. coagulans* referans soyu için elde edilenlerle karşılaştırılması. Kırmızı ile gösterilenler jelde silik gözlenen bantlardır.

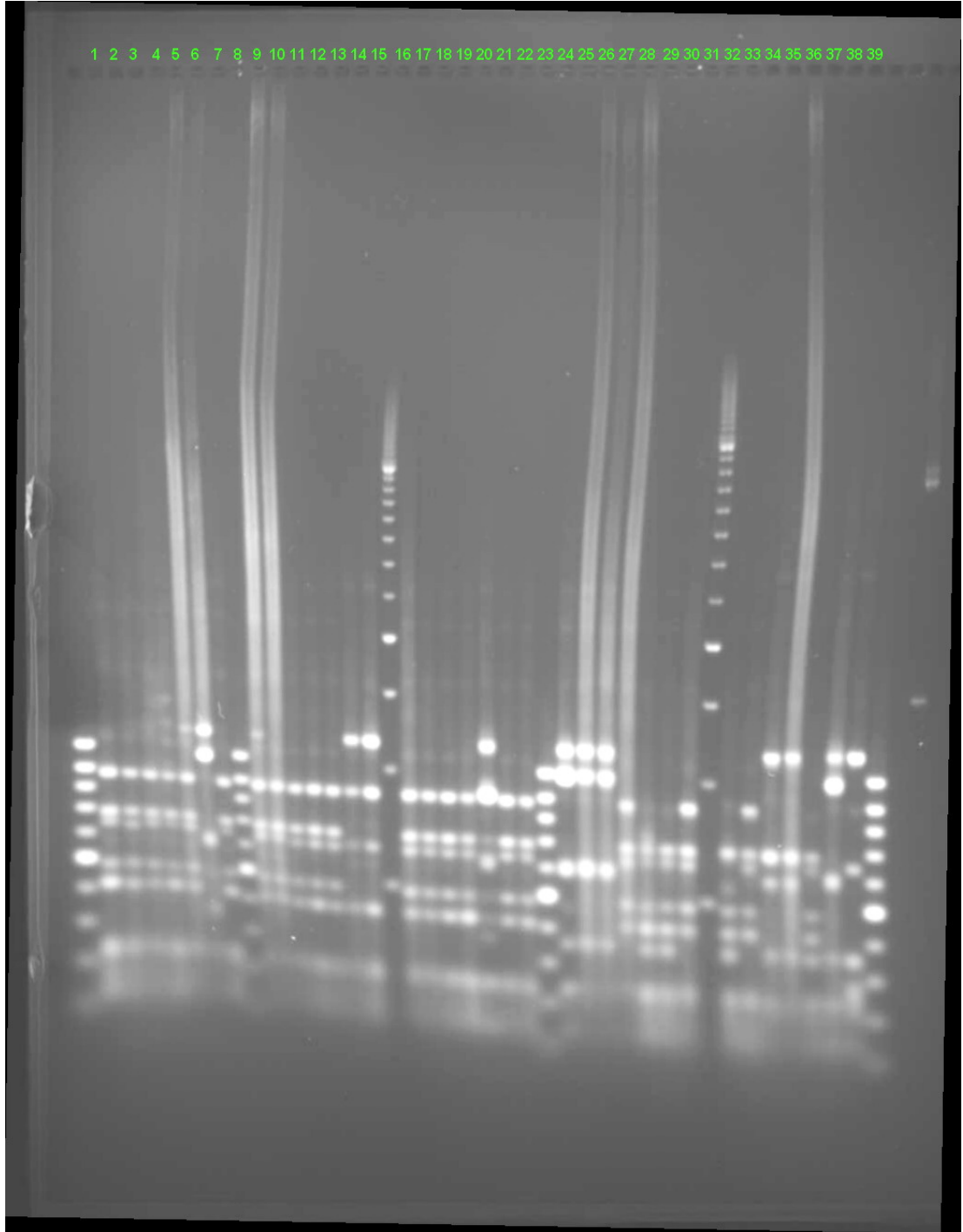
|            | 61A1 <i>B. coagulans</i> |     |     |     |     |     |                          |
|------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|
| İzolat adı | 120                      | 170 | 200 | 310 | 420 | 700 | Diğer                    |
| L1         | +                        | +   | +   | +   | +   | +   | 850, 900, 1000           |
| L3         | +                        | +   | +   | +   | +   | +   | 850, 900                 |
| L5         | +                        | +   | +   | +   | +   | +   |                          |
| L6         | +                        | +   | +   | +   | +   | +   |                          |
| L8         | -                        | -   | +   | +   | -   | +   | 150, 180, 450            |
| L10        | -                        | -   | +   | +   | -   | +   | 150, 180, 450            |
| L13        | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720                 |
| L14        | +                        | +   | +   | +   | +   | +   | 850, 900                 |
| L15        | +                        | +   | +   | +   | +   | +   | 850, 900                 |
| L16        | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720, 800, 900, 1050 |
| L21        | -                        | -   | +   | +   | -   | +   | 150, 180, 450            |
| L22        | +                        | +   | +   | +   | +   | +   | 850, 900                 |
| P17        | -                        | -   | -   | -   | -   | -   | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| P19        | +                        | -   | +   | +   | +   | +   | 150, 830, 900, 1031      |
| P20        | -                        | -   | -   | +   | -   | -   | 270, 850, 1200           |
| P21        | +                        | -   | +   | +   | +   | +   | 150, 830, 900, 1031      |
| P22        | +                        | +   | +   | +   | -   | +   | 430                      |
| P24        | +                        | -   | +   | +   | +   | +   | 150                      |
| A3         | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720, 800, 900, 1050 |
| A4         | -                        | -   | -   | -   | -   | -   | 180, 280, 300, 850, 1200 |
| A7         | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720                 |
| A18        | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720                 |
| A23        | -                        | -   | +   | +   | -   | -   | 430, 720                 |
| A26        | +                        | -   | +   | +   | +   | +   | 80, 150, 830, 900, 1050  |
| A28        | +                        | -   | +   | +   | +   | +   | 150, 830, 900, 1050      |

### 3.4.2. *rrn*-ARDRA

#### 3.4.2.1. Özgün olmayan ikincil ürünün varlığı dikkate alınmadan gerçekleştirilen ARDRA analizi

##### 3.4.2.1.1. Jel profilleri

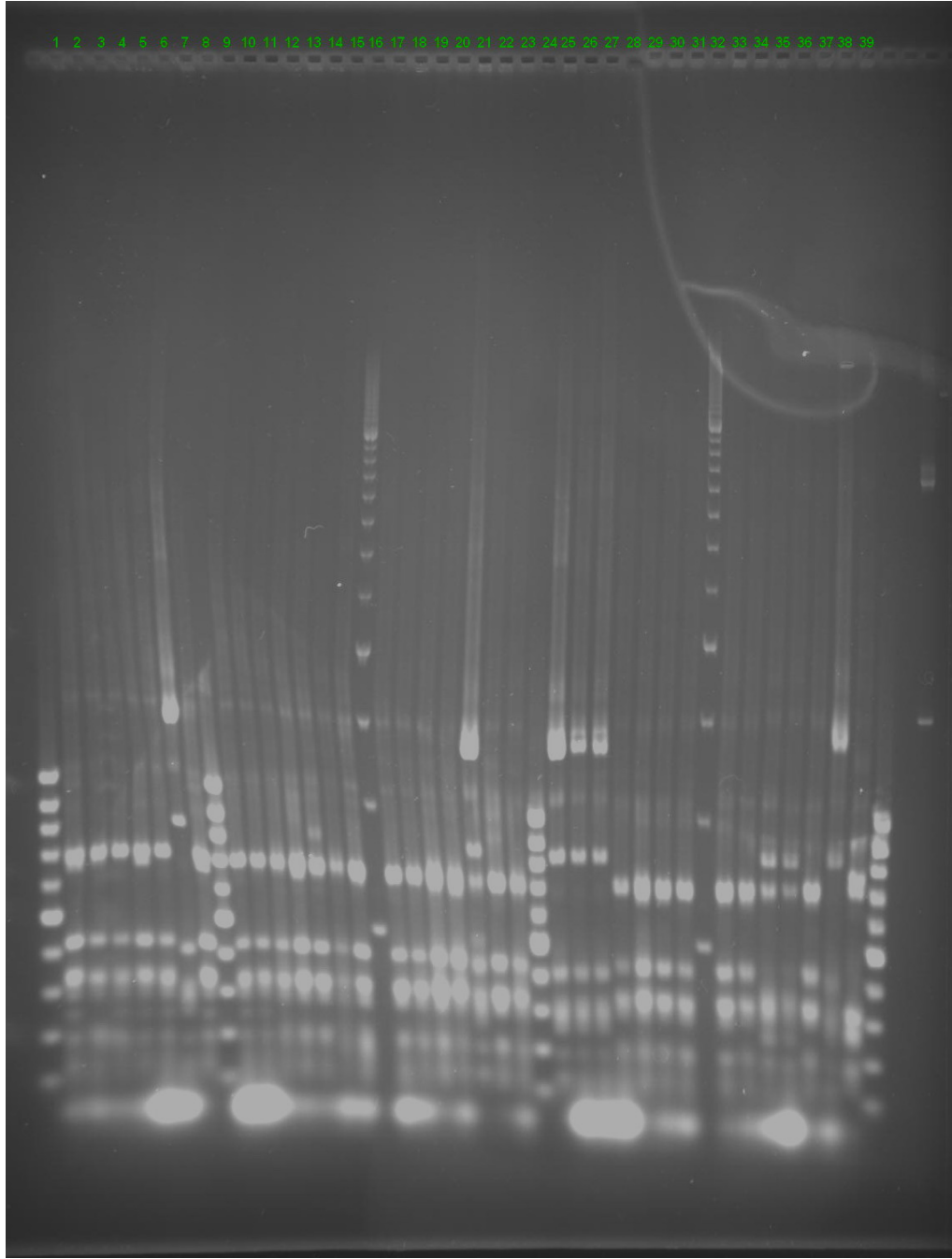
25 yerel izolat ve 11 referans soyun *rrn*-PCR ürünlerinin *Sau3AI*, *MboII* ve *CfoI* enzimleri ile kesim sonuçları metafor içeren % 1 agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.39.-3.41.). Bu jellerde yerel izolatlar, daha önce gerçekleştirilen tiplendirme çalışmalarında elde edilen sonuçlar gözetilerek ilgili referans soya yakın konumlanacak şekilde yerleştirildi. Şekillerde kuyu numaraları verilirken, baştaki ve sondaki 100 bç belirteçler (Fermentas) dışlandı.



**Şekil 3.39. *rrn*-PCR ürünlerinin *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 8, 100 bç belirteç (Fermentas); 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 16, 500 bç belirteç (Fermentas); 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 24, 100 bç belirteç (Fermentas); 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 32, 500 bç belirteç (Fermentas); 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbç.**



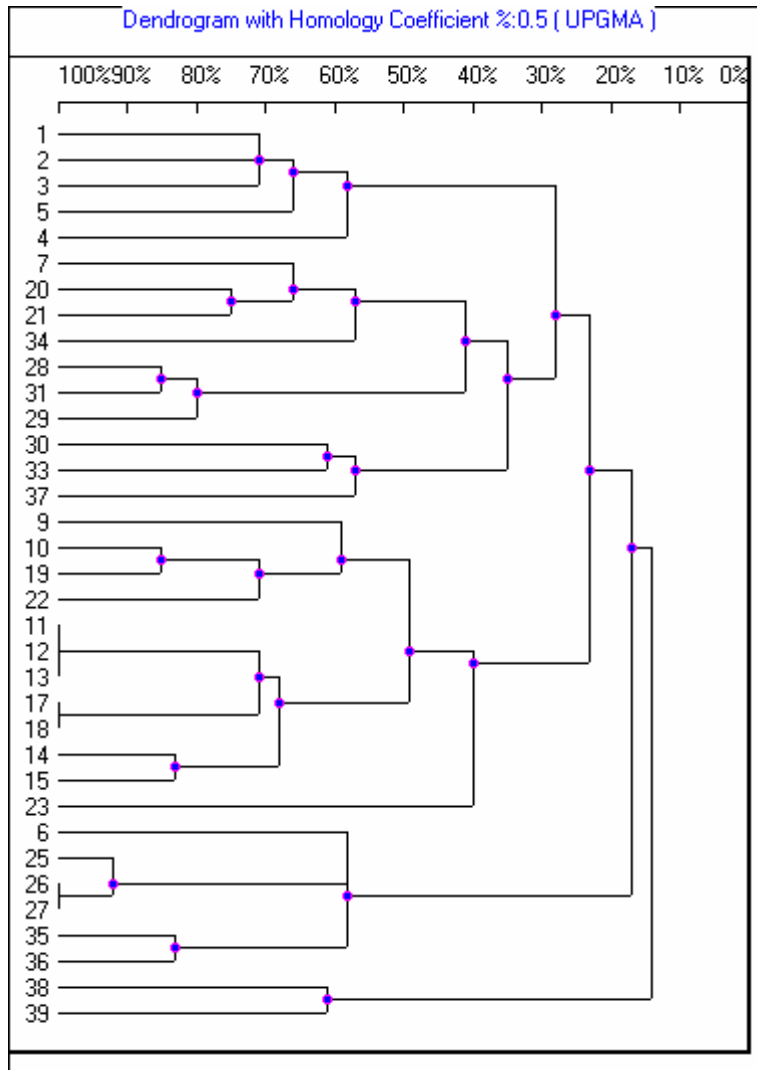
**Şekil 3.40. *rrn*-PCR ürünlerinin *Mbo*II restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 8, 100 bç belirteç (Fermentas); 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 16, 500 bç belirteç (Fermentas); 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 24, 100 bç belirteç (Fermentas); 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 32, 500 bç belirteç (Fermentas); 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbç.**



**Şekil 3.41. *rrn*-PCR ürünlerinin *Sau*3A1 restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili.**  
**1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 8, 100 bç belirteç (Fermentas); 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 16, 500 bç belirteç (Fermentas); 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 24, 100 bç belirteç (Fermentas); 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 32, 500 bç belirteç (Fermentas); 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10. 100 bç belirteç, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç; 500 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 Kbç.**

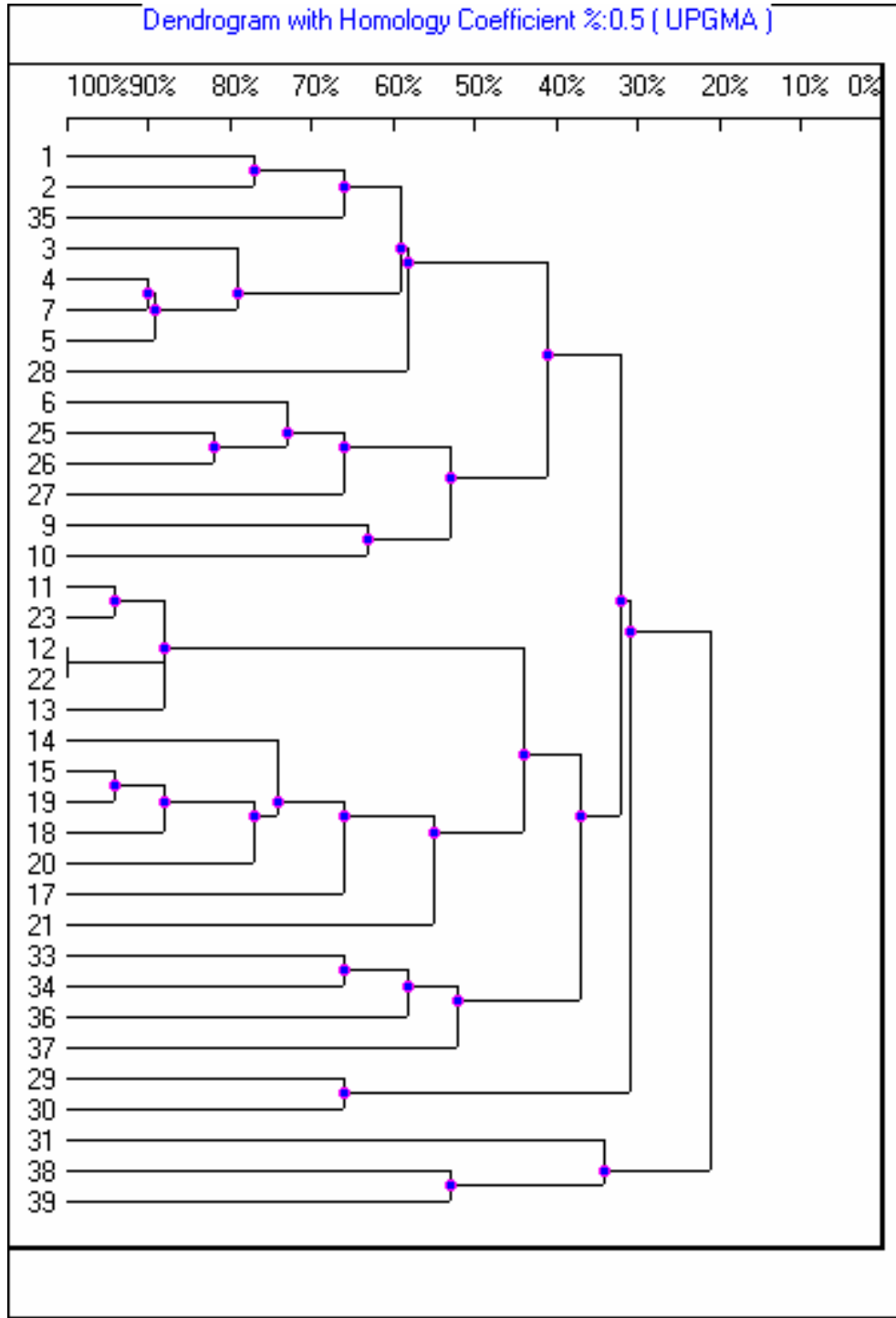
### 3.4.2.1.2. Dendogramlar

Jellerde gözlenen bant profilleri görüntüleme cihazının yazılımından yararlanılarak dijital ortama aktarıldı ve dendogramlar çizildi. Dendogramlar çizilirken belirteç kuyuları dışlanmıştır. Dendogramlardaki numaralar her bir soy için jellerdeki kuyu numaraları ile eşleniktir. Şekil 3.42.-3.44.'te görülen dendogramlar Vilber Lourmat Görüntüleme Sisteminin yazılımı BIO 1D++ ile UPGMA (unweighted pair group match average) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.42. *Bacillus* sp. yerel izolatları ile *Bacillus* referans soylarının *rrn* operonlarının *CfoI* bant profilinden elde edilen dendogram. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10.

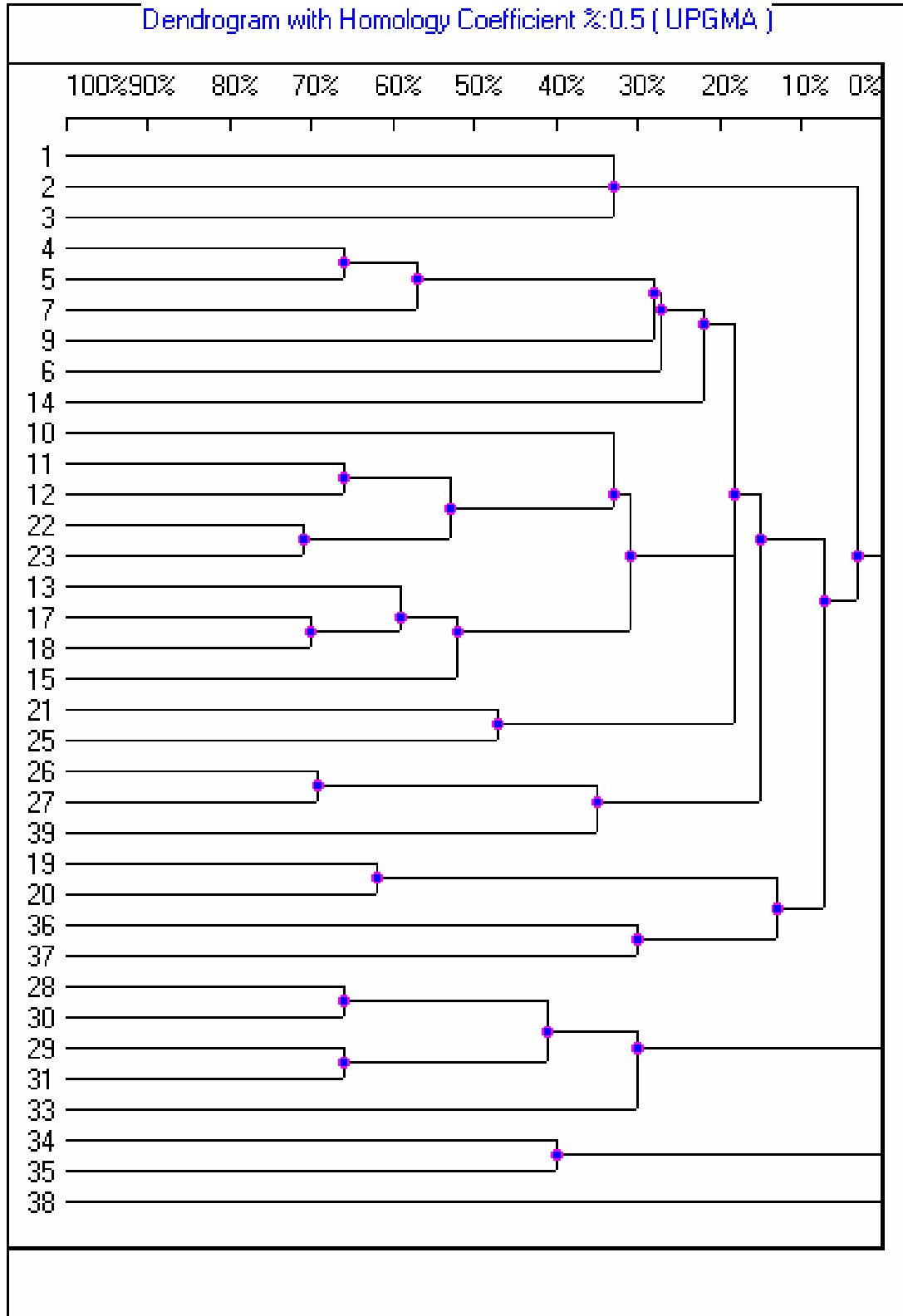
*CfoI* profilinden yol açıkılarak çizilen dendogramda en fazla % 30, en az % 10 homolojiye sahip dört temel küme göze çarpmakta, alt kümeler arasındaki pattern homolojisi yaklaşık % 35 ile % 50 arasında değişmektedir. Soylar arasında en fazla benzerlik gösterenler % 100 homolojiye sahip olan L13, *B. amyloliquefaciens* 10A5 ve *B. subtilis* “natto” 27E3; L16 ve P20 ile A4 ve *B. cereus* 6A5’tir. Birinci kümede dört grup gözlenmektedir. Birinci grupta bulunan L1, L3 ve L5 izolatları % 70 homolojiye sahiptir. L14 soyu bu soylara % 66 benzerlik gösterirken, L6 ise % 58 benzerlik taşımaktadır. İkinci grupta A18 ve A23 soyları % 75 homoloji gösterirken, L21 soyu bu soylara % 66 benzerlik göstermektedir. *B. stearothermophilus* 9A20 soyu ise grubun diğer üyeleri ile % 58 homoloji taşımaktadır. Üçüncü grupta % 85 homolojiye sahip P19 ve A28 soyları ile bunlara % 80 benzerlik gösteren P21 soyu bulunmaktadır. Dördüncü grupta ise % 60 homolojiye sahip P24 ve *B. licheniformis* 5A1 soyları ile bunlara % 58 homoloji gösteren *B. coagulans* 61A1 soyu bulunmaktadır. İkinci ve üçüncü gruplar % 40 homoloji gösterirken, dördüncü grup % 35 ve birinci grup yaklaşık % 30 homoloji göstermektedir. İkinci kümede üç grup göze çarpmaktadır. Bunlardan birincisi % 85 homolojiye sahip *B. pumilus* 8A3 ve A7, bunlara % 71 benzerlik gösteren A3 ve grup üyelerine % 60 benzerlik gösteren L22’dir. İkinci grupta % 100 homoloji gösteren L13, *B. amyloliquefaciens* 10A5 ve *B. subtilis* “natto” 27E3 soyları ile L16 ve P20 bulunmaktadır. Bu iki alt grup birbirlerine % 71 benzerlik göstermektedir. Üçüncü grupta ise % 82 homolojiye sahip L8 ve L10 soyları bulunmaktadır. İkinci ve üçüncü grup % 69 benzerlik gösterirken, birinci grup bunlara % 50 benzerlik göstermektedir. Hiçbir gruba dahil olmayan *B. subtilis* 1A1 soyu ise kümenin diğer üyelerine % 40 homoloji göstermektedir. Üçüncü kümede iki grup görülmektedir. Bunlardan ilki % 100 homolojiye sahip A4 ve *B. cereus* 6A5 ile bunlara % 92 homoloji gösteren P17 soyunu içermektedir. İkinci grupta % 82 homoloji gösteren P22 ve *B. megaterium* 7A36 soyları bulunmaktadır. Birinci ve ikinci grup ile L15 soyu % 60 homoloji göstermektedir. Dördüncü kümede ise % 62 homolojiye sahip *B. firmus* 29A1 ve *B. sphaericus* 13A10 soyları bulunmaktadır.



**Şekil 3.43. *Bacillus* sp. yerel izolatları ile *Bacillus referans* soylarının *rrn* operonlarının *MboII* bant profilinden elde edilen dendrogram. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10.**

*MboII* enzimi ile en fazla % 40, en az % 20 homolojiye sahip dört temel küme elde edilmiştir. Alt kümeler arasındaki pattern homolojisi yaklaşık % 35 ile % 58

arasında değişmektedir. Soylar arasında en fazla benzerlik gösterenler % 100 homolojiye sahip olup, A3 ve *B. amyloliquefaciens* 10A5'tir. Birinci kümede dört grup göze çarpmaktadır. Birinci grupta % 66 benzerlik taşıyan L1 ve L3 soyları ile bunlara % 66 benzer olan P22 soyu bulunmaktadır. İkinci grupta L6 ve L21 soyları % 90 benzerlik taşıırken, L14 soyu bu soylara % 89 benzerdir. L5 soyu ise grubun elemanları ile % 80 benzerlik taşımaktadır. Üçüncü grupta % 82 benzerlik taşıyan P17 ve A4, bu soylara % 72 homoloji gösteren L15 ve grubun elemanlarına % 66 homoloji gösteren *B. cereus* 6A5 bulunmaktadır. Dördüncü grupta ise % 63 homolojiye sahip L22 ve *B. pumilus* 8A3 soyları bulunmaktadır. Birinci ve ikinci grup arasında % 60 homoloji bulunurken, hiçbir gruba dahil olmayan P19 soyu bu soylara % 59 homoloji göstermektedir. Üçüncü ve dördüncü gruplar % 52 homolojiye sahiptir ve diğer gruplara yaklaşık % 40 benzerlik göstermektedir. İkinci kümede üç grup ayırt edilmektedir. Bunlardan ilki % 100 homolojiye sahip *B. amyloliquefaciens* 10A5 ve A3, % 95 homolojiye sahip L13 ve *B. subtilis* 1A1 soylarını içermektedir. Bu soylar birbirlerine ve *B. subtilis* "natto" 27E3 soyuna % 90 homoloji göstermektedir. İkinci grupta L10 ve A7 soyları % 95 homolojiye sahipken P20 soyu bu soylara % 90 benzerlik göstermektedir. A18 soyu bu üç soya % 78 benzerlik göstermektedir. L8, L16 ve A23 soyları grubun diğer üyelerine sırasıyla % 75, % 66 ve % 52 benzerlik göstermektedir. Üçüncü grupta ise *B. licheniformis* 5A1 ve *B. stearothermophilus* 9A20 soyları % 66 homolojiye sahipken, *B. megaterium* 7A36 soyu bu soylara yaklaşık % 60 benzerlik göstermektedir. *B. coagulans* 61A1 soyu içe grubun üyelerine % 52 benzerlik göstermektedir. Birinci ve ikinci grup % 44 homolojiye sahipken, üçüncü grup bunlara yaklaşık % 40 homoloji göstermektedir. Üçüncü küme % 66 homolojiye sahip P21 ve P24 soylarını içermektedir. Dördüncü küme ise % 52 homolojiye sahip *B. firmus* 29A1 ve *B. sphaericus* 13A10 soyları ile bu soylara yaklaşık % 32 homoloji gösteren A28 soyunu içermektedir.



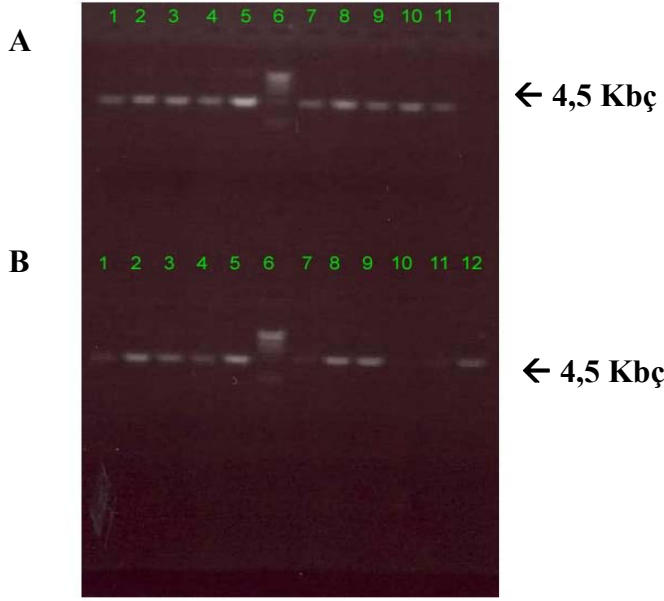
**Şekil 3.44.** *Bacillus* sp. yerel izolatları ile *Bacillus* referans soylarının *rrn* operonlarının *Sau3AI* bant profilinden elde edilen dendrogram. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 9, L22; 10, 8A3; 11, L13; 12, 10A5; 13, 27E3; 14, L8; 15, L10; 17, L16; 18, P20; 19, A7; 20, A18; 21, A23; 22, A3; 23, 1A1; 25, P17; 26, A4; 27, 6A5; 28, P19; 29, P21; 30, P24; 31, A28; 33, 5A1; 34, 9A20; 35, P22; 36, 7A36; 37, 61A1; 38, 29A1; 39, 13A10.

*Sau3AI* bant profili ile çizilen dendogram diğerlerinden oldukça farklıdır. Buna göre birbirine en yakın olan soylar en fazla yaklaşık % 70 homolojiye sahiptir. *B. firmus* 29A1 analiz edilen hiçbir soy ile benzerlik göstermemiştir (% 0 homoloji). Ayrıca P22 ile *Geobacillus stearothermophilus* yaklaşık % 40 homoloji gösterirken diğer soylarla aralarındaki homoloji yüzdesi 0'dır. % 50'nin üzerinde homolojiye sahip soylar şu şekilde özetlenebilir: L6 ve L14 izolatları % 65 homolojiye sahipken, L21 izolatu bu soylara % 58 benzerlik taşımaktadır; % 65 homolojiye sahip L13 ve 10A5 soyları ile % 70 homolojiye sahip A3 ve 1A1 soyları birbirlerine % 52 benzerlik göstermektedir; 27E3 soyu % 70 homolojiye sahip L16 ve P20 soylarına % 60 benzerlik gösterirken, L10 soyu bu üç soya % 50 benzerlik göstermektedir; A23 ve P17 soyları % 50, A4 ve 6A5 soyları % 70, A7 ve A18 soyları % 60, P19 ve P24 soyları % 65 ve P21 ve A28 soyları % 65 homoloji göstermektedir.

#### **3.4.2.2.1. Jelden izole edilen özgül PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA analizi**

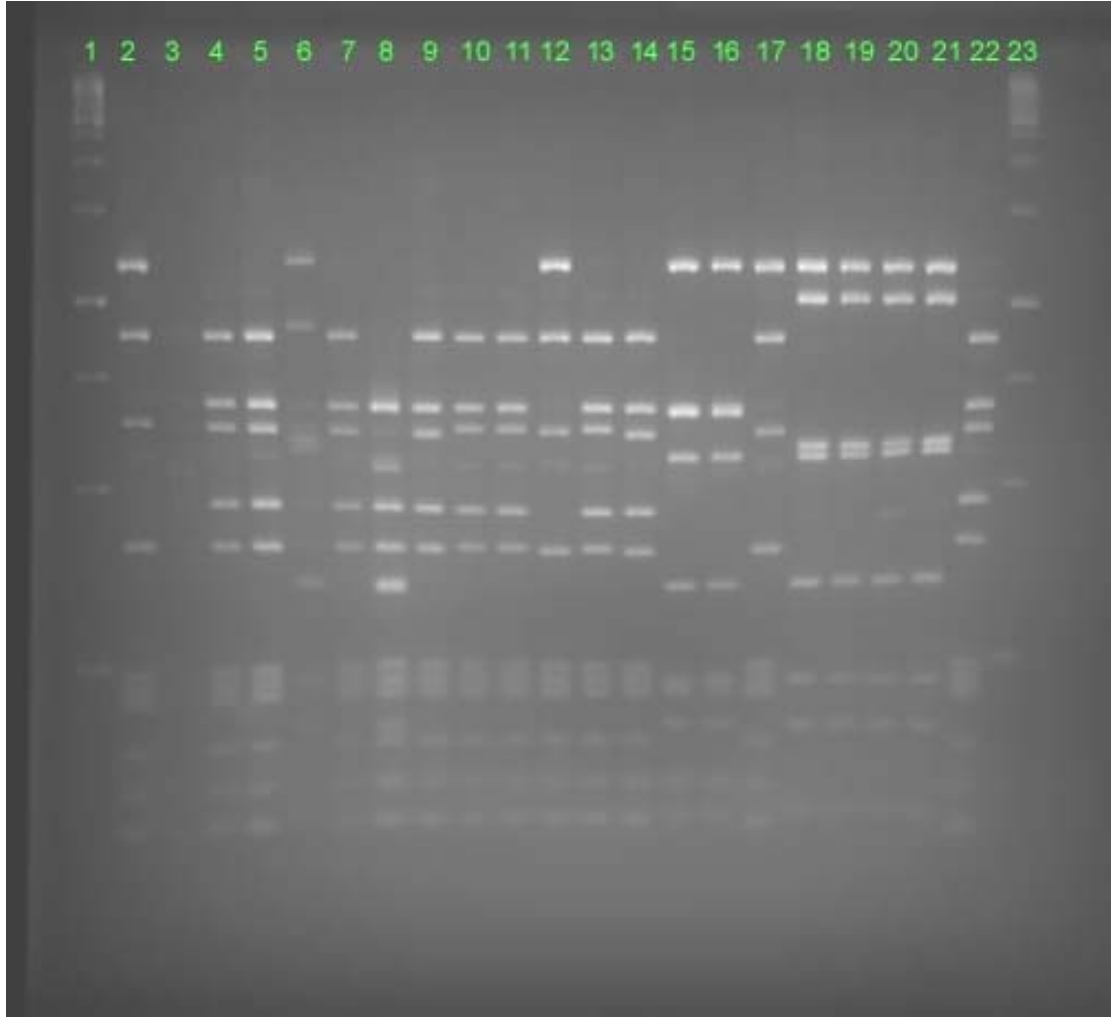
Özgül olmayan 1,5 kbç PCR ürününün varlığının dikkate alınmadığı *rrn*-ARDRA analizinin sonuçları ile karşılaştırma yapmak amacıyla sınırlı sayıdaki soy için özgül 4,5 kbç PCR ürünü izole edilerek *rrn*-ARDRA gerçekleştirildi.

Ön tiplendirme çalışmaları, 16S rDNA dizi analizi ve 16S-ARDRA sonuçlarına göre dikkate değer bulunan L1, L10, L15, L21, A4, A26, A28, P17, P20, P21, ve P22 yerel izolatları ve 1A1, 5A1, 6A5, 7A36, 8A3, 9A20, 10A5, 27E3, 29A1 ve 61A1 referans soyları ile gerçekleştirilen *rrn*-PCR'da 4,5 kbç özgül PCR ürününe ek olarak 1,5 kbç PCR ürünü de çoğaldı. 4,5 kbç PCR ürünleri jelden izole edildi. Elde edilen saf 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek miktar tayini yapıldı (Şekil 3.45.).

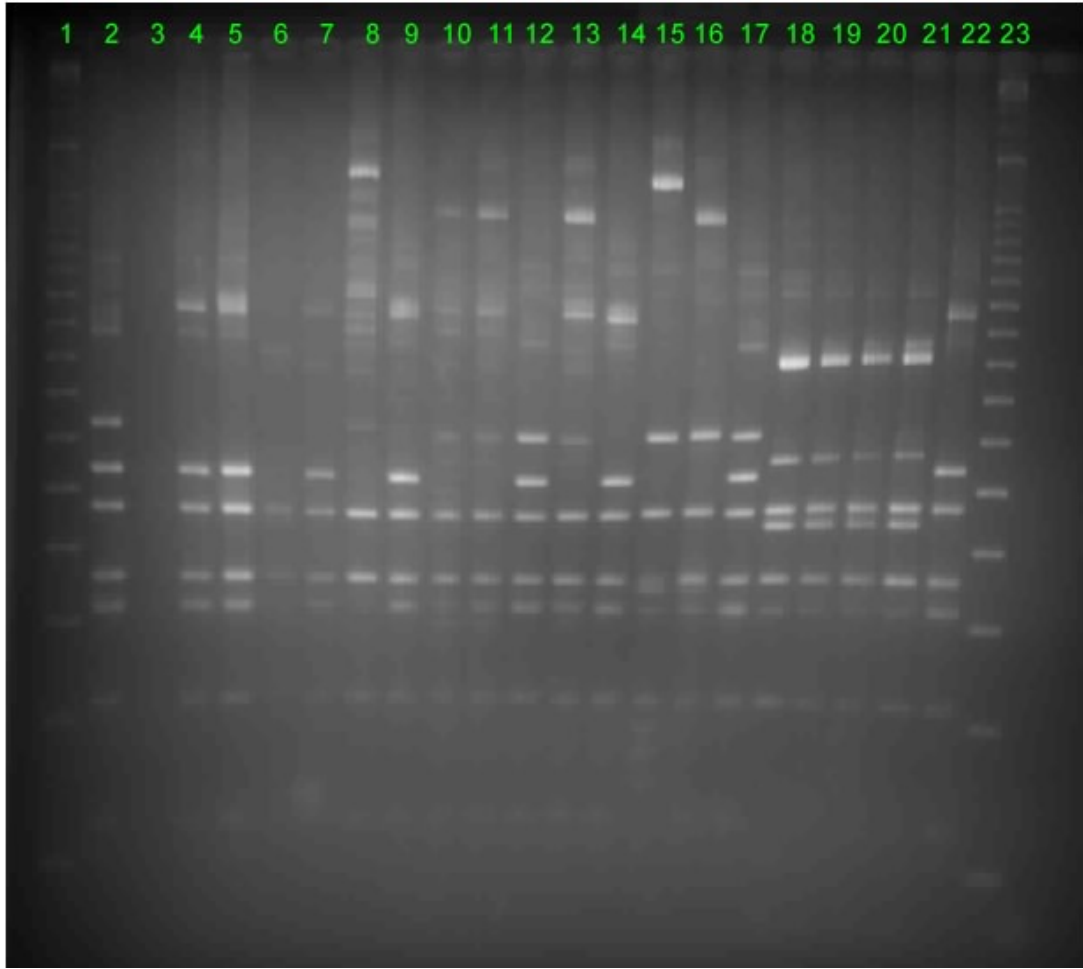


**Şekil 3.45. Jelden izole edilen 4,5 kbç'lik *rrn*-PCR ürünlerinin agaroz jel profili. A: 1, 1A1; 2, 5A1; 3, 6A5; 4, 7A36; 5, 8A3; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, 9A20; 8, 10A5; 9, 27E3; 10, 29A1; 11, 61A1. B: 1, L1; 2, L10; 3, L15; 4, L21; 5, A4; 6, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 7, A26; 8, A28; 9, P17; 10, P20; 11, P21; 12, P22.**

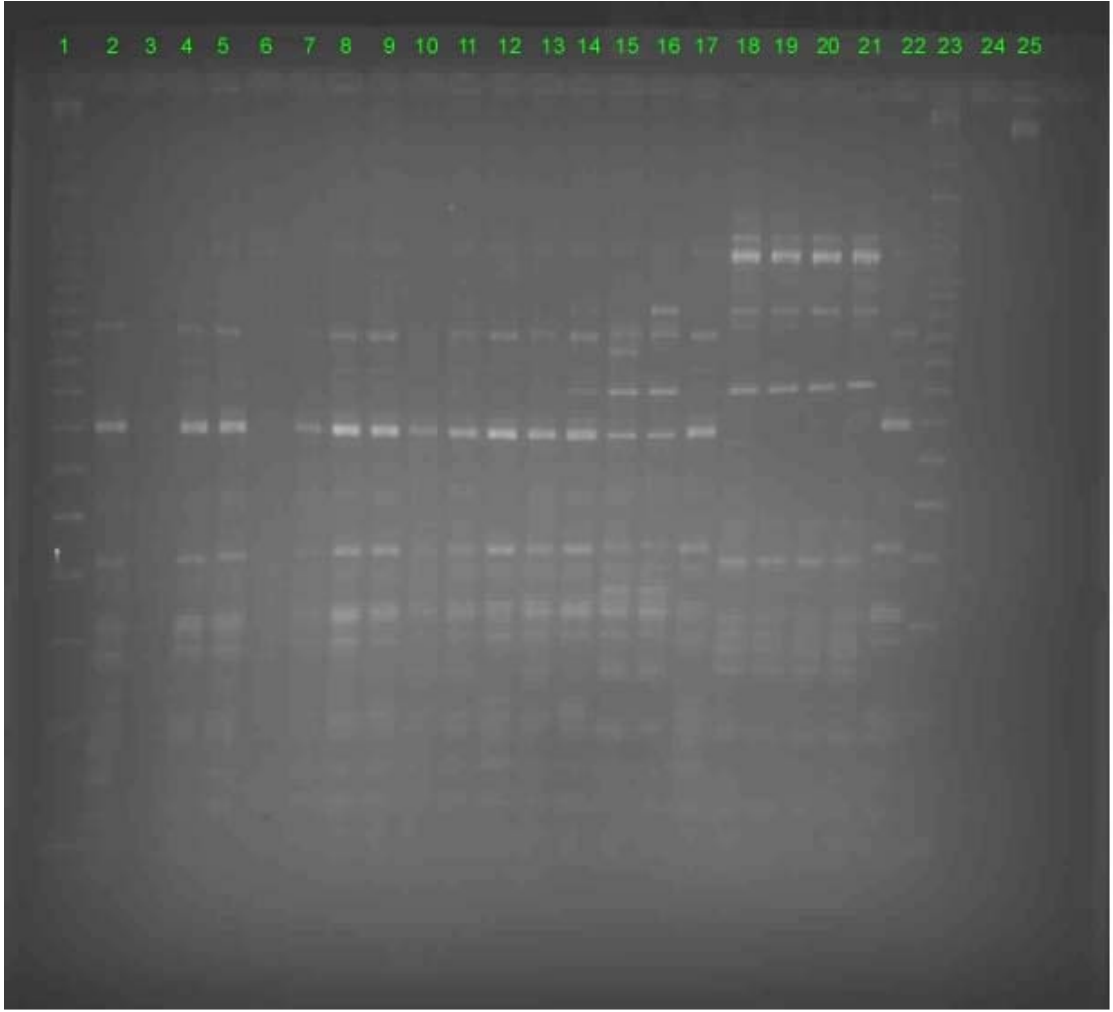
Seçilen 11 yerel izolat ve 10 referans soyun jelden izole edilen 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünlerinin *Sau*3AI, *Mbo*II ve *Cfo*I enzimleri ile kesim sonuçları metafor içeren % 3 agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.46.-3.48.). Bu jellerde yerel izolatlar daha önce gerçekleştirilen tiplendirme çalışmalarında elde edilen sonuçlar gözetilerek ilgili referans soya yakın konumlanacak şekilde yerleştirildi.



**Şekil 3.46. Jelden izole edilen 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünlerinin *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. 1, 1 kbç belirteç (10.0, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 Kbç, Fermentas); 2, L10; 3, P20; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5; 23, 1 kbç belirteç (10.0, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 Kbç, Fermentas).**



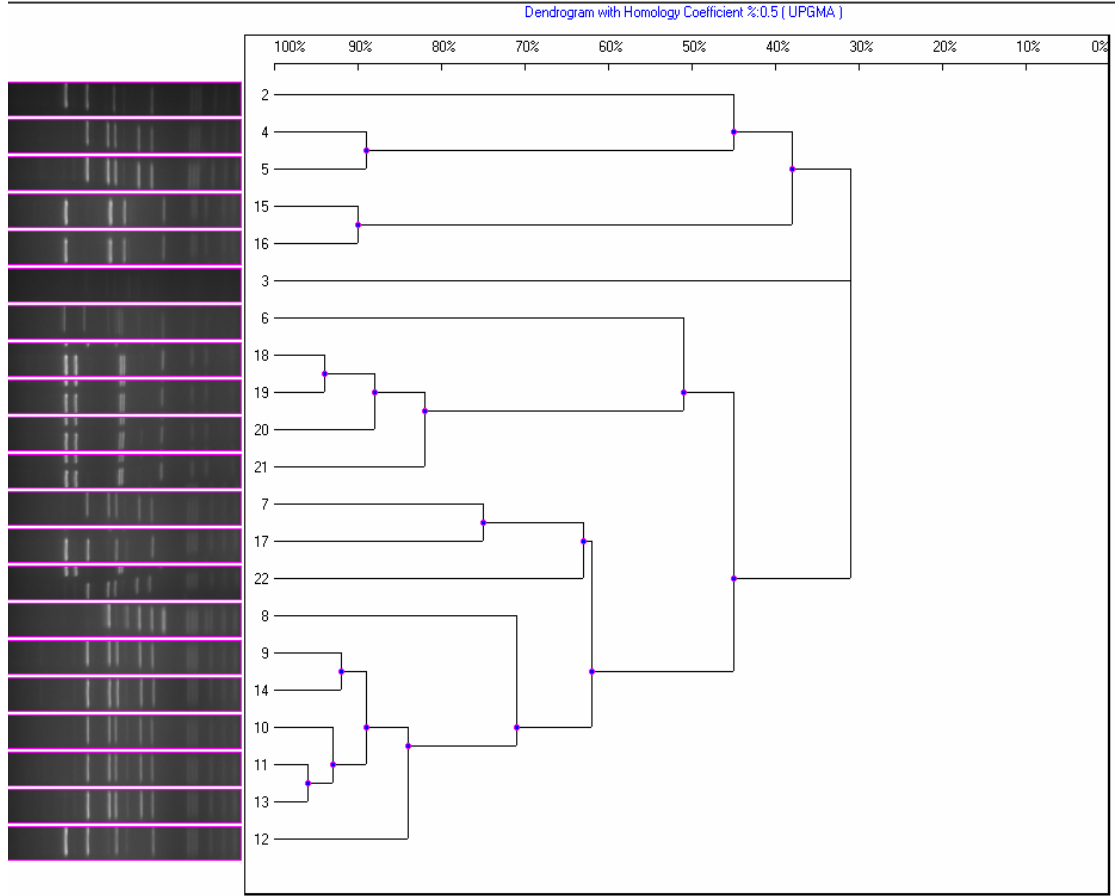
**Şekil 3.47. Jelden izole edilen 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünlerinin *Mbo*II restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. 1, 500+100 bç belirteç (Fermentas); 2, L10; 3, P20; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5; 23, 500+100 bç belirteç (Fermentas). 500+100 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç.**



**Şekil 3.48. Jelden izole edilen 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünlerinin *Sau3A1* restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel profili. 1, 500+100 bç belirteç (Fermentas); 2, L10; 3, P20; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5; 23, 500+100 bç belirteç (Fermentas); 24, Boş; 25, 8A3 kesilmemiş *rrn*-PCR ürünü. 500+100 bç belirteç, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 Kbç.**

#### 3.4.2.2.2. Dendogramlar

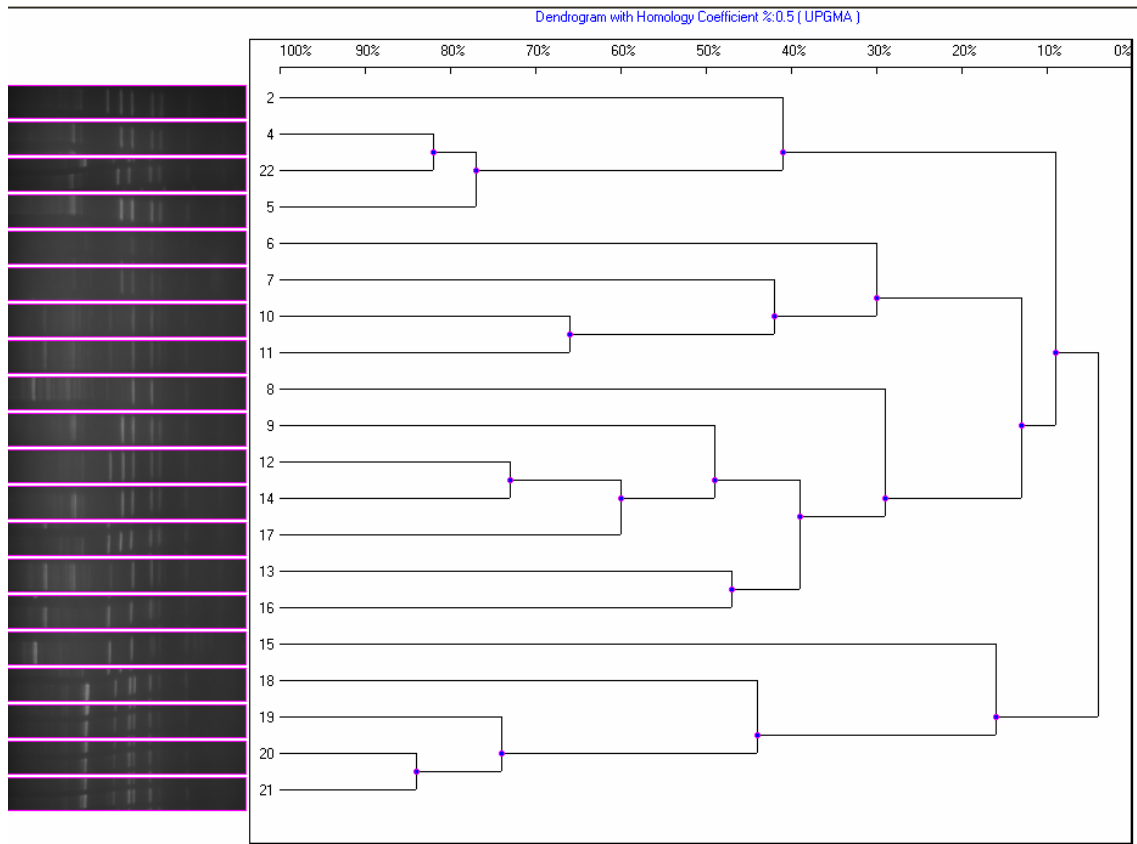
Elde edilen jel profillerden Vilber Lourmat Görüntüleme Sisteminin yazılımı BIO 1D++ ile UPGMA (unweighted pair group match avarage) yöntemi kullanılarak dendogramlar çizildi. Çizilen dendogramlarda belirteç kuyuları dışlanmıştır ve dendogramlardaki numaralar her bir soy için jellerdeki kuyu numaraları ile eşleniktir (Şekil 3.49.-3.51.).



**Şekil 3.49. *Bacillus* sp. yerel izolatları ile *Bacillus* referans soylarının *rrn* operonlarının *CfoI* bant profilinden elde edilen dendrogram. 2, L10; 3, P20; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5.**

*CfoI* enzimi ile elde edilen dendrogramda en fazla % 52, en az % 30 homolojiye sahip dört temel küme elde edildi. Alt kümeler arasındaki pattern homolojisi yaklaşık % 60 ile % 85 arasında değişmektedir. En fazla benzerlik gösteren soylar % 97 benzerlikle L21 ve L15 yerel izolatlarıdır. Birinci kümede yer alan A28 yerel izolatu ve *B. subtilis* 1A1 referans soyu ile yaklaşık % 90 homolojiye sahiptir. P20 yerel izolatu bu soylara % 45 benzerlik göstermektedir. Birbirleri ile % 90 homolojiye sahip P22 yerel izolatu ve *B. megaterium*, 7A36 referans soyu bu gruba % 38 benzerlik göstermektedir. Bu kümeye dahil görünen P20 yerel izolatu kümedeki diğer soylara % 30 homoloji göstermekle birlikte, ARDRA jelindeki örnek miktarının az gelmesine bağlı olarak bu soyun profilindeki bantlar çok siliktir ve doğru bir değerlendirme yapılamamaktadır. İkinci kümede, A4 yerel izolatu ile *B. firmus* 29A1 referans soyu % 95 homolojiye sahiptir. P17 izolatu bu soylara yaklaşık % 90 benzerlik göstermektedir. *B. cereus* 6A5 referans soyu bu üç soy ile % 82 homoloji

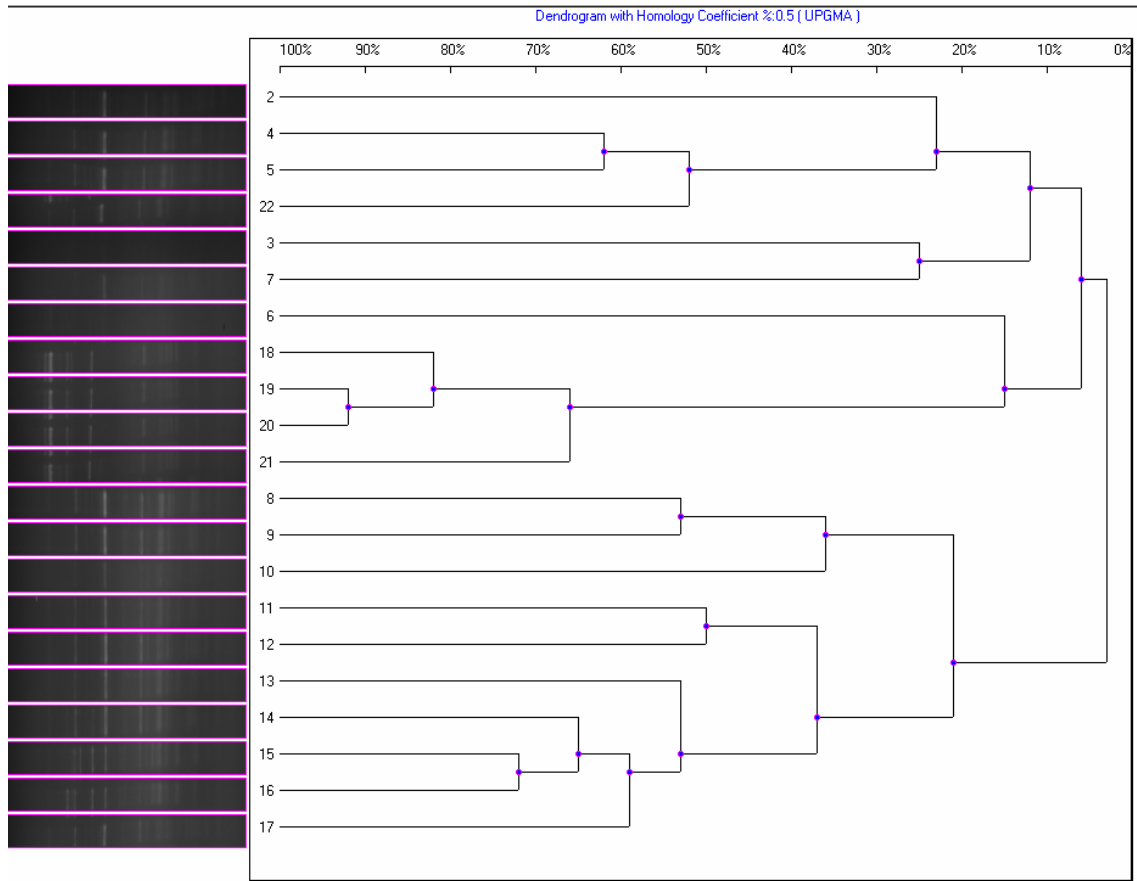
göstermektedir. Bu kümeye dahil görünen P21 izolatı diğer soylar ile yaklaşık % 50 homolojiye sahiptir. Üçüncü kümede bulunan A26 ve *B. coagulans* 61A1 % 75 homoloji gösterirken, *B. amyloliquefaciens* 10A5 referans soyu bu soylarla yaklaşık % 60 benzerlik taşımaktadır. Dördüncü kümede yer alan L21 ve L15 izolatları % 97 homoloji gösterirken, L1 izolatı bu soylarla % 94 benzerlik taşımaktadır. % 92 homolojiye sahip *B. stearothermophilus* 9A20 ve *B. subtilis* “natto” 27E3 soyları bu gruba % 90 benzerlik göstermektedir. *B. pumilus* 8A3 soyu, kümenin diğer elemanları ile % 85 ve *B. licheniformis* 5A1 soyu ise % 70 homolojiye sahiptir.



**Şekil 3.50. *Bacillus* sp. yerel izolatları ile *Bacillus* referans soylarının *rrn* operonlarının *MboII* bant profilinden elde edilen dendrogram. 2, L10; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5.**

*MboII* ile en fazla % 40, en az % 4 homolojiye sahip dört temel küme elde edildi. Alt kümeler arasındaki pattern homojisi yaklaşık % 42 ile % 75 arasında değişmektedir. En fazla benzerlik gösteren soylar % 85 homoloji ile *B. cereus* 6A5 ve P17’dir. Birinci kümede yer alan A28 ve *B. amyloliquefaciens* 10A5 % 82 benzerlik taşırken, *B. subtilis* 1A1 bu soylarla % 78 homoloji göstermektedir. L10

soyu ise bu gruba yaklaşık %40 benzerlik taşımaktadır. İkinci kümedeki L1 ve L21 izolatları % 67 benzerlik göstermekte, A26 izolatu ise bu soylarla % 42 homoloji taşımaktadır. P21 bu grup ile % 30 homoloji göstermektedir. Üçüncü kümede yer alan *B. pumilus* 8A3 ve 27E3 *B. subtilis* “natto” soyları % 73 benzerlik taşırken, *B. coagulans* 61A1 bu soylarla % 60 homoloji göstermektedir. *B. stearothermophilus* 9A20 ise bu soylara yaklaşık % 50 benzerdir. Birbirleri ile % 45 homolojiye sahip L15 ve P22 izolatları ise bu gruba % 40 benzerlik göstermektedir. *B. licheniformis* 5A1 kümenin diğer bireylerine % 30 homoloji göstermektedir. Dördüncü kümede P17 ve *B. cereus* 6A5 % 83 homoloji gösterirken, A4 izolatu bu soylara yaklaşık % 75 benzerdir. *B. firmus* 29A1 bu gruba % 42 homoloji gösterirken, *B. megaterium* 7A36 ise kümenin diğer elemanlarına % 15 benzerlik göstermektedir.



**Şekil 3.51. *Bacillus* sp. Yerel izolatları ile *Bacillus* referans soylarının *rrn* operonlarının *Sau3AI* bant profilinden elde edilen dendrogram. 2, L10; 3, P20; 4, A28; 5, 1A1; 6, P21; 7, A26; 8, 5A1; 9, 9A20; 10, L1; 11, L21; 12, 8A3; 13, L15; 14, 27E3; 15, 7A36; 16, P22; 17, 61A1; 18, 29A1; 19, A4; 20, P17; 21, 6A5; 22, 10A5**

*Bacillus* soylarının *Sau3AI* profilinden yola çıkılarak çizilen dendrogramda en fazla % 25, en az % 2 homolojiye sahip dört temel küme elde edildi. Alt kümeler

arasındaki pattern homolojisi yaklaşık % 35 ile % 65 arasında değişmektedir. Soylar arasında en fazla benzerlik gösterenler % 92 homolojiye sahip olan A4 ve P17 izolatlarıdır. Birinci kümede yer alan A28 ve *B. subtilis* 1A1 % 62 benzerlik gösterirken, *B. amyloliquefaciens* 10A5 bu soylarla %52 homoloji taşımaktadır. L10 izolatu ise bu gruba % 23 benzerlik göstermektedir. İkinci kümede yalnızca P20 ve A26 izolatları bulunmakta olup aralarındaki homoloji % 25'tir. P20 izolatının jel profili yine net bir bant ayrımı sağlayamayacak kadar siliktir. Üçüncü kümede yer alan A4 ve P17 izolatları % 92 benzerlik taşıırken, *B. firmus* 29A1 bu soylara % 82 homoloji göstermektedir. *B. cereus* 6A5 ise bu gruba % 65 benzerlik göstermektedir. P21 izolatu kümenin diğer bireylerine % 15 homoloji göstermektedir. Dördüncü kümede üç grup göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki % 52 homoloji gösteren *B. licheniformis* 5A1 ve *B. stearothermophilus* 9A20 ve bunlara % 36 benzerlik gösteren L1 izolatıdır. İkinci grup % 50 benzerlik taşıyan L21 ve *B. pumilus* 8A3 soylarıdır. Üçüncü grupta ise % 73 homoloji gösteren *B. megaterium* 7A36 ve P22 ile bu soylara sırasıyla % 65, % 60 ve % 52 benzerlik gösteren *B. subtilis* “natto” 27E3, *B. coagulans* 61A1 ve L15 soyları bulunmaktadır. İkinci ve üçüncü grup üyeleri birbirleri ile % 37 homoloji taşıırken, birinci grup bu soylara % 20 benzerdir.

Çizelge 3.46.'da bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan 16S rDNA dizi analizi, 16S ARDRA, rrrn-ARDRA sonuçları ve daha önce gerçekleştirilmiş olan ön tiplendirme çalışmalarının sonuçları birarada gösterilmektedir.

Çizelge 3.46. Moleküler tiplendirme çalışmalarının ön tiplendirme sonuçları ile karşılaştırması.

| İzolat Adı | Olası Tür Adı                                |                                                  |                    |                                                                                                        |                                                                                  |                            |                     |                                                                                                     |                                                                                                                                                          |        |                                                                                                      |       |                                                                      |
|------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------|
|            | Kızılaiy Mikrob. Lab.                        | API                                              | VITEK              | 16S rDNA                                                                                               | 16S ARDRA                                                                        |                            |                     | rrn-ARDRA                                                                                           |                                                                                                                                                          |        |                                                                                                      |       |                                                                      |
|            |                                              |                                                  |                    |                                                                                                        | CfoI                                                                             | MboII                      | Sau3A1              | 4,5 kbç+1,5 kbç                                                                                     |                                                                                                                                                          |        | 4,5 kbç                                                                                              |       |                                                                      |
|            |                                              |                                                  |                    |                                                                                                        |                                                                                  |                            |                     | cfoI                                                                                                | MboII                                                                                                                                                    | Sau3A1 | CfoI                                                                                                 | MboII | Sau3A1                                                               |
| L1         | <i>B. subtilis</i><br><i>B. firmus</i>       | <i>B. pumilus</i>                                | <i>B. pumilus</i>  | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | -                          | -                   | -                                                                                                   | <i>B. pumilus</i> (% 40)<br><i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                      | -      | <i>B. stearothermophilus</i> (% 90)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 90)<br><i>B. pumilus</i> (% 82) | -     | <i>B. licheniformis</i> (%35)<br><i>B. stearothermophilus</i> (% 35) |
| L3         | <i>B. pumilus</i><br><i>B. sphaericus</i>    | <i>B. pumilus</i>                                | <i>B. pumilus</i>  | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | -                          | -                   | -                                                                                                   | <i>B. pumilus</i> (% 40)<br><i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                      | -      | D (*)                                                                                                | D     | D                                                                    |
| L5         | ?                                            | <i>B. pumilus</i>                                | <i>B. pumilus</i>  | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | -                          | <i>B. coagulans</i> | -                                                                                                   | <i>B. pumilus</i> (% 40)<br><i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                      | -      | D                                                                                                    | D     | D                                                                    |
| L6         | <i>B. pumilus</i>                            | <i>B. pumilus</i>                                | <i>B. pumilus</i>  | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | -                          | <i>B. coagulans</i> | -                                                                                                   | <i>B. pumilus</i> (% 40)<br><i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                      | -      | D                                                                                                    | D     | D                                                                    |
| L8         | ?<br><i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i> | <i>B. stearothermophilus</i><br><i>B. firmus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> | <i>B. subtilis</i><br><i>B. subtilis</i> “natto”<br><i>B. stearothermophilus</i> | <i>B. subtilis</i> “natto” | <i>B. pumilus</i>   | <i>B. amyloliquefaciens</i> (%67)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 67)<br><i>B. subtilis</i> (% 40) | <i>B. subtilis</i> (% 42)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 42)<br><i>B. amyloliquefaciens</i> (% 42)<br><i>B. stearothermophilus</i> (% 35)<br><i>B.</i> | -      | D                                                                                                    | D     | D                                                                    |

|     |                                         |                              |                             |                                                                                                        |                                                                                  |                             |                   |                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                  |                                                        |                                                                |                                  |
|-----|-----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|     |                                         |                              |                             |                                                                                                        |                                                                                  |                             |                   |                                                                                                       | <i>licheniformis</i> (% 35)<br><i>B. coagulans</i> (% 35)<br><i>B. megaterium</i> (% 35)                                                                                                                                                   |                                                                                                                                  |                                                        |                                                                |                                  |
| L10 | ?<br><i>B. subtilis</i>                 | <i>B. stearothermophilus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. polyfermenticus</i> / <i>B. licheniformis</i> | -                                                                                | -                           | <i>B. pumilus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> (%67)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 67)<br><i>B. subtilis</i> (% 40)   | <i>B. subtilis</i> (% 42)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 42)<br><i>B. amyloliquefaciens</i> (% 42)<br><i>B. stearothermophilus</i> (% 35)<br><i>B. licheniformis</i> (% 35)<br><i>B. coagulans</i> (% 35)<br><i>B. megaterium</i> (% 35) | <i>B. subtilis</i> “natto” (% 50)<br><i>B. amyloliquefaciens</i> (% 30)<br><i>B. subtilis</i> (% 30)<br><i>B. pumilus</i> (% 30) | <i>B. subtilis</i> (%45)<br><i>B. megaterium</i> (%38) | <i>B. subtilis</i> (%40)<br><i>B. amyloliquefaciens</i> (% 40) | -                                |
| L13 | <i>B. subtilis</i>                      | <i>B. pumilus</i>            | <i>B. subtilis</i>          | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                                     | <i>B. subtilis</i><br><i>B. subtilis</i> “natto”<br><i>B. stearothermophilus</i> | -                           | -                 | <i>B. amyloliquefaciens</i> (%100)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 100)<br><i>B. subtilis</i> (% 40) | <i>B. subtilis</i> (% 92)<br><i>B. amyloliquefaciens</i> (% 87)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 87)                                                                                                                                       | <i>B. amyloliquefaciens</i> (% 65)<br><i>B. subtilis</i> (% 50)<br><i>B. subtilis</i> “natto” (% 50)<br><i>B. pumilus</i> (% 32) | D                                                      | D                                                              | D                                |
| L14 | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> ?          | ?                           | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | <i>B. amyloliquefaciens</i> | -                 | -                                                                                                     | <i>B. pumilus</i> (% 40)<br><i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                                                                                                        | -                                                                                                                                | D                                                      | D                                                              | D                                |
| L15 | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> ?          | ?                           | <i>B. pumilus</i>                                                                                      | -                                                                                | -                           | -                 | <i>B. cereus</i> (% 60)<br><i>B.</i>                                                                  | <i>B. pumilus</i> (% 52)<br><i>B. cereus</i> (%)                                                                                                                                                                                           | -                                                                                                                                | <i>B. stearothermophilus</i> (%)                       | <i>B. stearothermophilus</i>                                   | <i>B. subtilis</i> “natto” (%52) |

|     |                                         |                                                  |                           |                                                                                           |   |                                                   |                   |                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                       |                                                                                                                  |                                                                         |
|-----|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|     |                                         |                                                  |                           |                                                                                           |   |                                                   |                   | <i>megaterium</i><br>(% 60)                                                                                                                                       | 52)                                                                                                                                |                                                                                                                                                                   | 90)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>90)<br><i>B. pumilus</i><br>(% 82)                                                         | (%40)<br><i>B. pumilus</i><br>(% 40)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>40)<br><i>B. coagulans</i><br>(% 40) | <i>B.</i><br><i>megaterium</i><br>(%52)<br><i>B. coagulans</i><br>(%52) |
| L16 | <i>B. subtilis</i>                      | <i>B.</i><br><i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> | <i>B. subtilis</i>        | <i>B. subtilis</i> / <i>B.</i><br><i>mojovensis</i> /<br><i>B.</i><br><i>axarquiensis</i> | - | <i>B. subtilis</i><br>“natto”                     | -                 | <i>B.</i><br><i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (%70)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>70)<br><i>B. subtilis</i><br>(% 40)                                 | <i>B. subtilis</i><br>(% 42)<br><i>B.</i><br><i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 42)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>42) | <i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>60)<br><i>B.</i><br><i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 30)<br><i>B. subtilis</i><br>(% 30)<br><i>B. pumilus</i><br>(% 30) | D                                                                                                                                     | D                                                                                                                | D                                                                       |
| L21 | <i>B. pumilus</i>                       | <i>B. pumilus</i>                                | <i>B. pumilus</i>         | <i>B. pumilus</i>                                                                         | - | -                                                 | <i>B. pumilus</i> | <i>B.</i><br><i>stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%<br>58)<br><i>B.</i><br><i>licheniformis</i><br>(% 35)<br><i>B. coagulans</i><br>(% 35)                       | <i>B. pumilus</i><br>(% 40)<br><i>B. cereus</i> (%<br>40)                                                                          | -                                                                                                                                                                 | <i>B.</i><br><i>stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%<br>90)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>90)<br><i>B. pumilus</i><br>(% 82) | -                                                                                                                | <i>B. pumilus</i><br>(%50)                                              |
| L22 | <i>B. subtilis</i><br><i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i><br>?                           | ?                         | <i>B. pumilus</i>                                                                         | - | -                                                 | -                 | <i>B. pumilus</i><br>(% 60)<br><i>B.</i><br><i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 50)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%<br>50)<br><i>B. subtilis</i><br>(% 40) | <i>B. pumilus</i><br>(% 62)<br><i>B. cereus</i> (%<br>52)                                                                          | -                                                                                                                                                                 | D                                                                                                                                     | D                                                                                                                | D                                                                       |
| P17 | ?                                       | <i>B. cereus</i>                                 | <i>B. cereus</i><br>group | <i>B.</i><br><i>thuringiensis</i> /<br><i>B. cereus</i> / <i>B.</i><br><i>anthracis</i>   | - | <i>B. cereus</i><br><i>B.</i><br><i>coagulans</i> | <i>B. cereus</i>  | <i>B. cereus</i> (%<br>92)<br><i>B.</i><br><i>megaterium</i><br>(% 60)                                                                                            | <i>B. pumilus</i><br>(% 52)<br><i>B. cereus</i> (%<br>52)                                                                          | -                                                                                                                                                                 | <i>B. firmus</i><br>(%87)<br><i>B. cereus</i> (%<br>80)                                                                               | <i>B. cereus</i> (%<br>82)<br><i>B. firmus</i> (%<br>42)                                                         | <i>B. firmus</i><br>(%80)<br><i>B. cereus</i><br>(%65)                  |
| P19 | <i>B.</i>                               | <i>B. subtilis</i>                               | <i>B. subtilis</i>        | <i>B. subtilis</i> / <i>B.</i>                                                            | - | <i>B. cereus</i>                                  | <i>B.</i>         | <i>B.</i>                                                                                                                                                         | <i>B. pumilus</i>                                                                                                                  | <i>B.</i>                                                                                                                                                         | D                                                                                                                                     | D                                                                                                                | D                                                                       |

|     |                         |                                                |                    |                                                                  |   |                                      |                                                          |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                         |                                               |                                                                                |                                                                                 |
|-----|-------------------------|------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
|     | <i>licheniformis</i>    | <i>B. amyloliquefaciens</i>                    |                    | <i>mojovensis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                       |   | <i>B. coagulans</i>                  | <i>stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>    | <i>stearothermophilus</i> (% 40) <i>B. licheniformis</i> (% 35) <i>B. coagulans</i> (% 35)    | (% 40) <i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                                                                                                           | <i>licheniformis</i> (% 30)                                                                                             |                                               |                                                                                |                                                                                 |
| P20 | <i>B. subtilis</i>      | <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. subtilis</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i> | - | -                                    | -                                                        | <i>B. amyloliquefaciens</i> (%70) <i>B. subtilis</i> “natto” (% 70) <i>B. subtilis</i> (% 40) | <i>B. subtilis</i> (% 42) <i>B. subtilis</i> “natto” (% 42) <i>B. amyloliquefaciens</i> (% 42) <i>B. stearothermophilus</i> (% 35) <i>B. licheniformis</i> (% 35) <i>B. coagulans</i> (% 35) <i>B. megaterium</i> (% 35) | <i>B. subtilis</i> “natto” (% 60) <i>B. amyloliquefaciens</i> (% 30) <i>B. subtilis</i> (% 30) <i>B. pumilus</i> (% 30) | -                                             | Profil elde edilemedi                                                          | -                                                                               |
| P21 | <i>B. licheniformis</i> | <i>B. licheniformis</i>                        | ?                  | <i>B. licheniformis</i>                                          | - | <i>B. cereus</i> <i>B. coagulans</i> | <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. stearothermophilus</i> (% 40) <i>B. licheniformis</i> (% 35) <i>B. coagulans</i> (% 35) | -                                                                                                                                                                                                                        | <i>B. licheniformis</i> (% 30)                                                                                          | <i>B. firmus</i> (%50) <i>B. cereus</i> (%50) | -                                                                              | -                                                                               |
| P22 | <i>B. megaterium</i>    | <i>B. coagulans</i>                            | <i>B. cereus</i>   | <i>B. flexus</i> / <i>B. megaterium</i>                          | - | <i>B. cereus</i> <i>B. coagulans</i> | -                                                        | <i>B. megaterium</i> (%82) <i>B. cereus</i> (% 60)                                            | <i>B. pumilus</i> (% 40) <i>B. cereus</i> (% 40)                                                                                                                                                                         | <i>B. stearothermophilus</i> (% 40)                                                                                     | <i>B. megaterium</i> (% 90)                   | <i>B. stearothermophilus</i> (%40) <i>B. pumilus</i> (% 40) <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> (%70) <i>B. subtilis</i> “natto” (%62) <i>B. coagulans</i> |

|     |                         |                                                                   |                         |                                                                    |                                                                                  |                                         |                  |                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                 |                                                   |                                                   |                                                  |
|-----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|     |                         |                                                                   |                         |                                                                    |                                                                                  |                                         |                  |                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                 |                                                   | "natto" (% 40)<br><i>B. coagulans</i> (% 40)      | (%55)                                            |
| P24 | <i>B. licheniformis</i> | <i>B. licheniformis</i><br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> | <i>B. licheniformis</i> | <i>B. licheniformis</i>                                            | <i>B. sphaericus</i>                                                             | <i>B. cereus</i><br><i>B. coagulans</i> | -                | <i>B. licheniformis</i> (% 60)<br><i>B. coagulans</i> (% 58)                                                                               | -                                                                                                                                                                                                                                                     | <i>B. licheniformis</i> (% 30)                                                                                  | D                                                 | D                                                 | D                                                |
| A3  | <i>B. subtilis</i>      | <i>B. subtilis</i>                                                | <i>B. subtilis</i>      | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> / <i>B. axarquiensis</i> | -                                                                                | <i>B. subtilis</i> "natto"              | -                | <i>B. pumilus</i> (% 70)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 50)<br><i>B. subtilis</i> "natto" (% 50)<br><i>B. subtilis</i> (%35) | <i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (%100)<br><i>B. subtilis</i> (%87)<br><i>B. subtilis</i> "natto" (%87)                                                                                                                                         | <i>B. subtilis</i> (% 70)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 50)<br><i>B. subtilis</i> "natto" (% 30) | D                                                 | D                                                 | D                                                |
| A4  | ?                       | <i>B. cereus</i>                                                  | <i>B. cereus</i>        | <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>   | -                                                                                | <i>B. cereus</i><br><i>B. coagulans</i> | <i>B. cereus</i> | <i>B. cereus</i> (% 100)<br><i>B. megaterium</i> (% 60)                                                                                    | <i>B. pumilus</i> (% 52)<br><i>B. cereus</i> (% 52)                                                                                                                                                                                                   | <i>B. cereus</i> (% 70)<br><i>B. sphaericus</i> (% 30)                                                          | <i>B. firmus</i> (%95)<br><i>B. cereus</i> (% 80) | <i>B. cereus</i> (% 72)<br><i>B. firmus</i> (%42) | <i>B. firmus</i> (%80)<br><i>B. cereus</i> (%65) |
| A7  | ?                       | <i>B. subtilis</i>                                                | <i>B. subtilis</i>      | <i>B. subtilis</i> / <i>B. axarquiensis</i>                        | <i>B. subtilis</i><br><i>B. subtilis</i> "natto"<br><i>B. stearothermophilus</i> | <i>B. subtilis</i> "natto"              | -                | <i>B. pumilus</i> (% 82)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 50)<br><i>B. subtilis</i> "natto" (% 50)<br><i>B. subtilis</i> (%35) | <i>B. subtilis</i> (% 42)<br><i>B. subtilis</i> "natto" (% 42)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 42)<br><i>B. stearothermophilus</i> (% 35)<br><i>B. licheniformis</i> (% 35)<br><i>B. coagulans</i> (% 35)<br><i>B. megaterium</i> (% 35) | -                                                                                                               | D                                                 | D                                                 | D                                                |

|     |                                         |                                        |                                    |                                                                       |                                                                                                |                                         |                                                      |                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |   |                                                         |   |   |
|-----|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------|---|---|
| A18 | <i>B. subtilis</i>                      | <i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> | <i>B. subtilis</i>                 | <i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i> /<br><i>B. axarquiensis</i> | <i>B. subtilis</i><br><i>B. subtilis</i><br>“natto”<br><i>B. stearother</i><br><i>mophilus</i> | <i>B. subtilis</i><br>“natto”           | -                                                    | <i>B. stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%)<br>58)<br><i>B. licheniformis</i><br>(%) 35)<br><i>B. coagulans</i><br>(%) 35) | <i>B. subtilis</i><br>(% 42)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%)<br>42)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (%) 42)<br><i>B. stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%)<br>35)<br><i>B. licheniformis</i><br>(%) 35)<br><i>B. coagulans</i><br>(%) 35)<br><i>B. megaterium</i><br>(%) 35) | - | D                                                       | D | D |
| A23 | <i>B. subtilis</i>                      | <i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> | <i>B. subtilis</i>                 | <i>B. subtilis</i>                                                    | -                                                                                              | -                                       | -                                                    | <i>B. stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%)<br>58)<br><i>B. licheniformis</i><br>(%) 35)<br><i>B. coagulans</i><br>(%) 35) | <i>B. subtilis</i><br>(% 42)<br><i>B. subtilis</i><br>“natto” (%)<br>42)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (%) 42)<br><i>B. stearotherm</i><br><i>ophilus</i> (%)<br>35)<br><i>B. licheniformis</i><br>(%) 35)<br><i>B. coagulans</i><br>(%) 35)<br><i>B. megaterium</i><br>(%) 35) | - | D                                                       | D | D |
| A26 | <i>B. stearother</i><br><i>mophilus</i> | ?                                      | <i>B. licheniformi</i><br><i>s</i> | <i>B. subtilis</i> / <i>B. velezensis</i>                             | -                                                                                              | <i>B. cereus</i><br><i>B. coagulans</i> | <i>B. stearotherm</i><br><i>ophilus</i><br><i>B.</i> | D                                                                                                                          | D                                                                                                                                                                                                                                                                                           | D | <i>B. coagulans</i><br>(% 72)<br><i>B. amyloliquefa</i> | - | - |

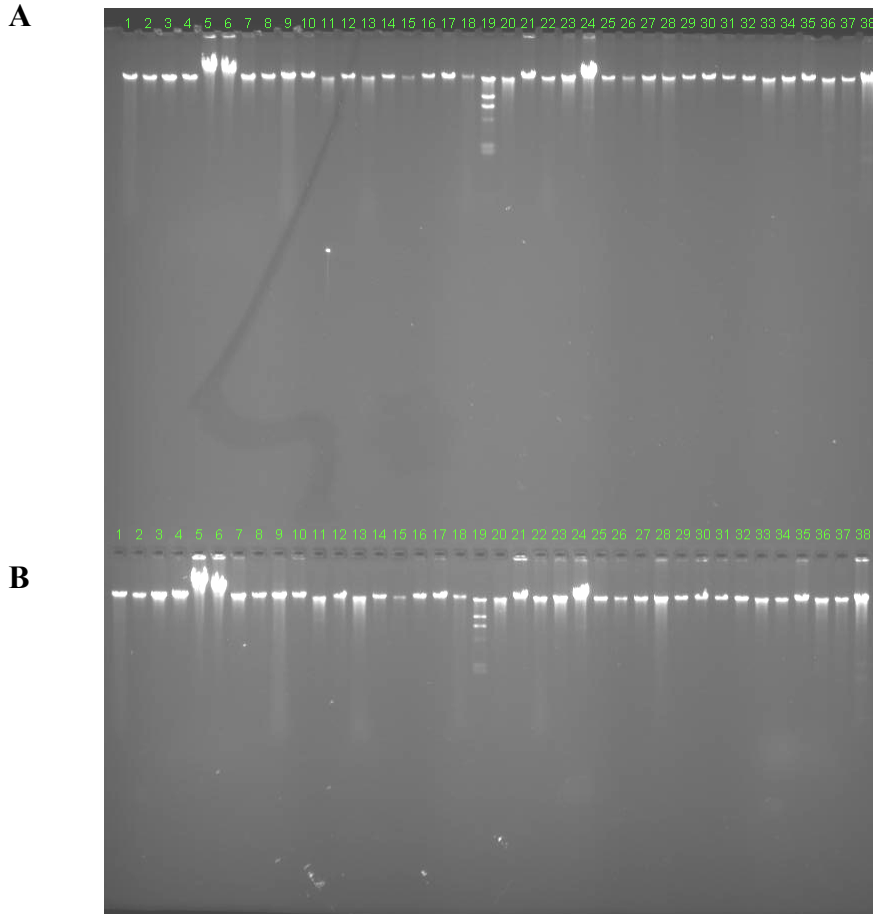
|     |                                               |   |                              |                    |   |                                         |                                                                        |                                                                                                     |                                                        |                                |                                                         |                                                                            |                                                                          |
|-----|-----------------------------------------------|---|------------------------------|--------------------|---|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|     |                                               |   |                              |                    |   |                                         | <i>amyloliquefa</i><br><i>ciens</i>                                    |                                                                                                     |                                                        |                                | <i>ciens</i> (% 62)                                     |                                                                            |                                                                          |
| A28 | <i>B. subtilis</i><br><i>B. licheniformis</i> | ? | <i>B. licheniformis</i><br>? | <i>B. subtilis</i> | - | <i>B. cereus</i><br><i>B. coagulans</i> | <i>B. stearothermophilus</i><br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> | <i>B. stearothermophilus</i> (% 40)<br><i>B. licheniformis</i> (% 35)<br><i>B. coagulans</i> (% 35) | <i>B. sphaericus</i> (% 30)<br><i>B. firmus</i> (% 30) | <i>B. licheniformis</i> (% 30) | <i>B. subtilis</i> (% 90)<br><i>B. megaterium</i> (%40) | <i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (% 82)<br><i>B. subtilis</i> (% 77) | <i>B. subtilis</i> (%62)<br><i>B. amyloliquefa</i><br><i>ciens</i> (%52) |

\*D: Çalışmaya dahil edilmeyen izolatlar.

### 3.5. RIBOTYPING

#### 3.5.1. MİKRODİYALİZ

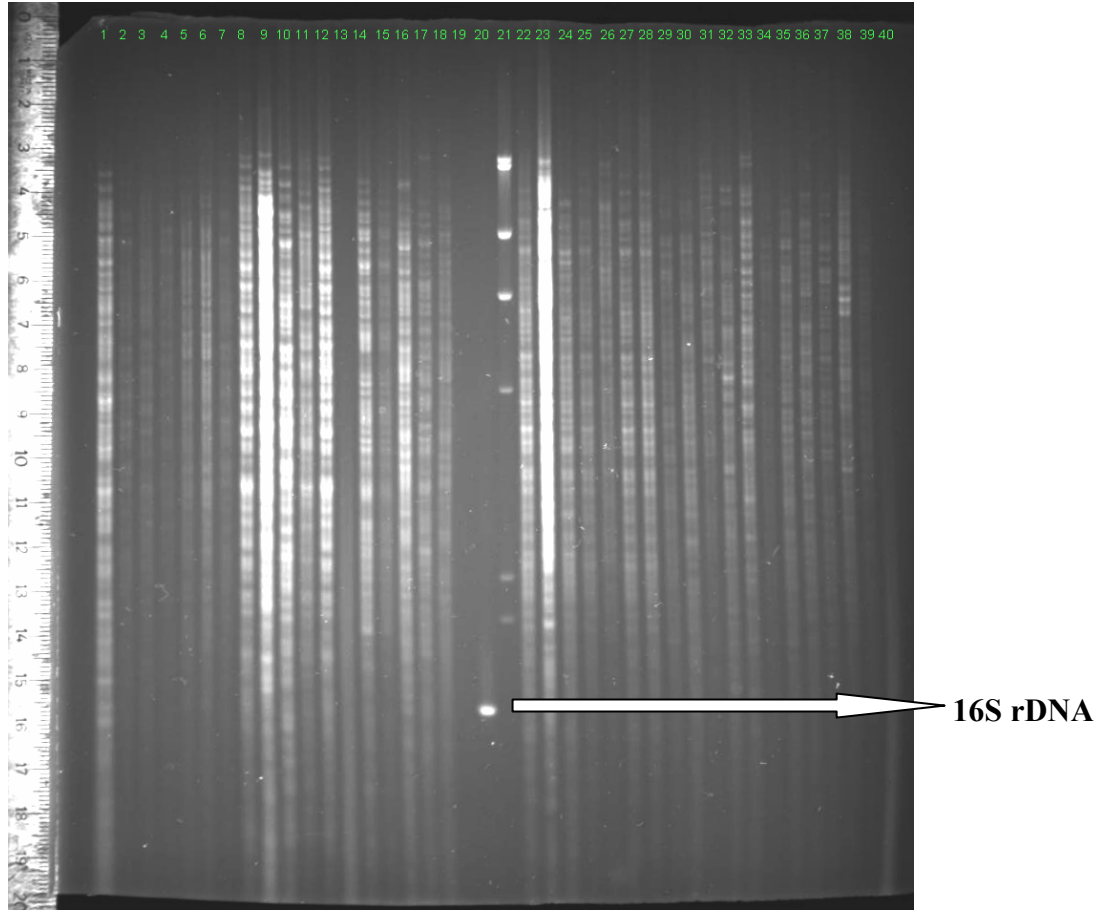
Ribotyping analizine alınmadan önce mikrodializ uygulanan genomik DNA'lar mikrodializ öncesi ve sonrasındaki miktarlarının karşılaştırılması amacıyla % 0,8'lik agaroz jele yüklendi (Şekil 3.52.). Mikrodializ uygulanan genomik DNA'ların miktarları mikrodializ öncesi ile benzer bulundu.



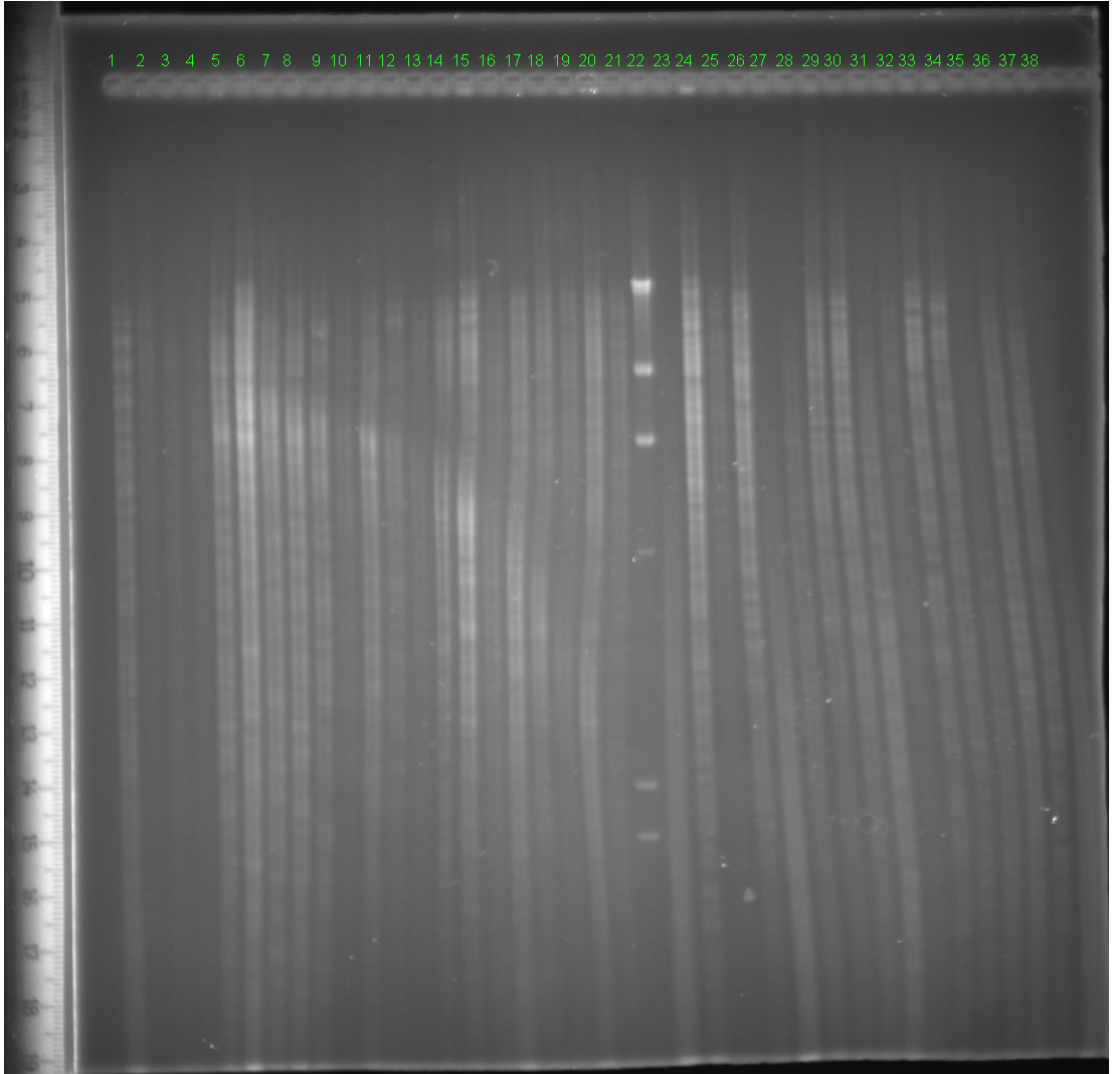
**Şekil 3.52. A: Mikrodializ sonrası genomik DNA'lar.** 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, L10; 7, L13; 8, L14; 9, L15; 10, L16; 11, L21; 12, L22; 13, P17; 14, P19; 15, P20; 16, P21; 17, P22; 18, P24; 19, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 20, A3; 21, A4; 22, A7; 23, A18; 24, A23; 25, A26; 26, A28; 27, 1A1; 28, 5A1; 29, 6A5; 30, 7A36; 31, 8A3; 32, 9A20; 33, 10A5; 34, 13A10; 35, 27E3; 36, 29A1; 37, 61A1; 38, *Xenorhabdus* sp. CIP 105189. **B: Mikrodializ öncesi genomik DNA'lar.** 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, L10; 7, L13; 8, L14; 9, L15; 10, L16; 11, L21; 12, L22; 13, P17; 14, P19; 15, P20; 16, P21; 17, P22; 18, P24; 19, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 20, A3; 21, A4; 22, A7; 23, A18; 24, A23; 25, A26; 26, A28; 27, 1A1; 28, 5A1; 29, 6A5; 30, 7A36; 31, 8A3; 32, 9A20; 33, 10A5; 34, 13A10; 35, 27E3; 36, 29A1; 37, 61A1; 38, *Xenorhabdus* sp. CIP 105189.

### 3.5.2. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE SİNDİRİM

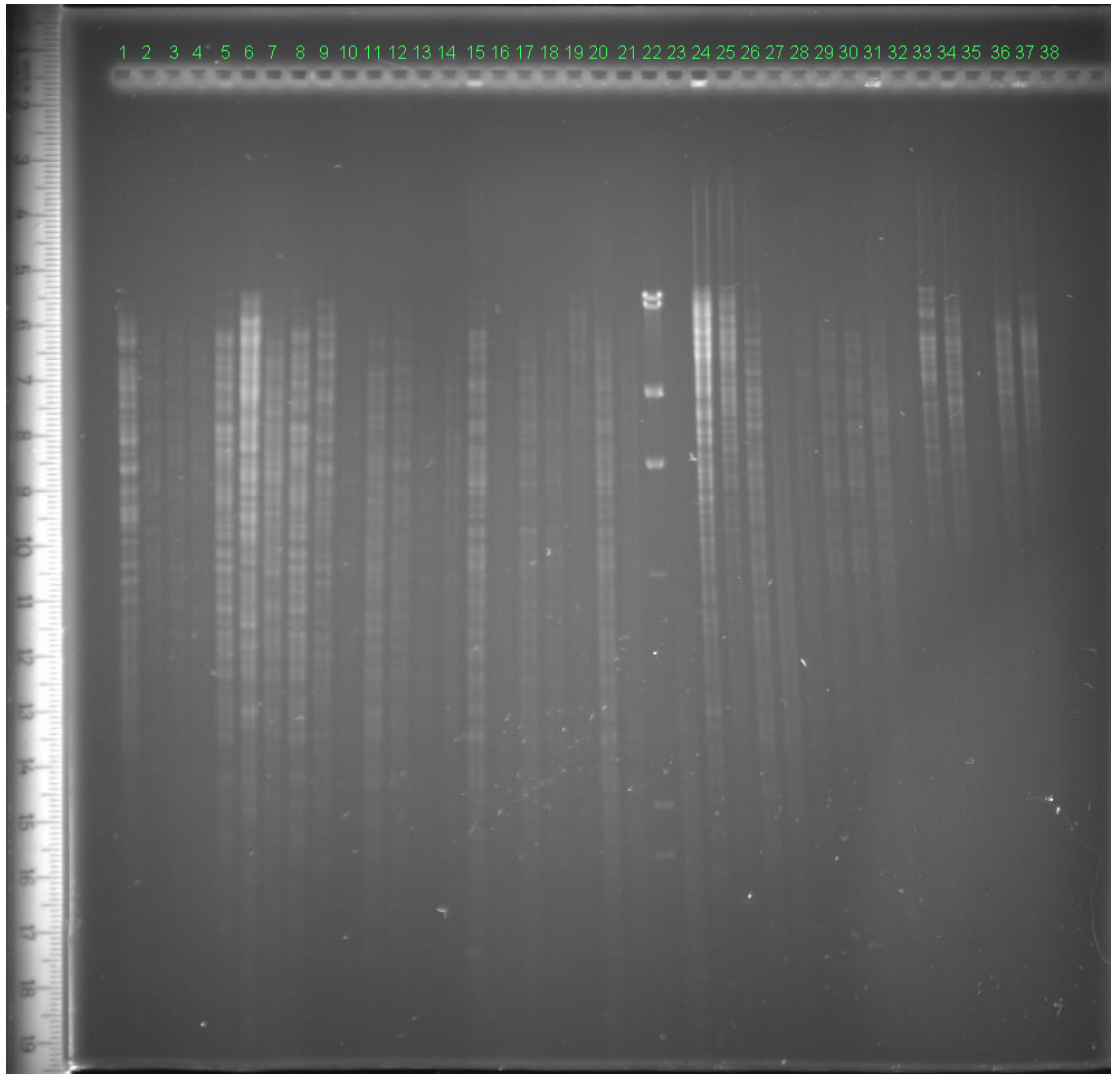
Milrodiyaliz uygulanmış 25 yerel *Bacillus* izolatu, 11 referans *Bacillus* soyu ve *Xenorhabdus sp.* CIP 105189 genomik DNA'ları *Hind*III, *Cla*I ve *Eco*RV enzimleri ile sindirildikten sonra örnekler % 0,7'lik SeaKem agaroz jele yüklendi. Genomik DNA'ların kesim profilleri Şekil 3.53.-3.55.'te görülmektedir.



**Şekil 3.53. *Hind*III restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L8; 6, L10; 7, L13; 8, L14; 9, L15; 10, L16; 11, L21; 12, L22; 13, P17; 14, P19; 15, P20; 16, P21; 17, P22; 18, P24; 19, boş; 20, 16S rDNA; 21, *Hind*III ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 22, A3; 23, A4; 24, A7; 25, A18; 26, A23; 27, A26; 28, A28; 29, 1A1; 30, 5A1; 31, 6A5; 32, 7A36; 33, 8A3; 34, 9A20; 35, 10A5; 36, 13A10; 37, 27E3; 38, 29A1; 39, 61A1; 40, *Xenorhabdus sp.* CIP 105189.**



**Şekil 3.54. *ClaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 8, L22; 9, 8A3; 10, L13; 11, 10A5; 12, 27E3; 13, L8; 14, L10; 15, L16; 16, P20; 17, A7; 18, A18; 19, A23; 20, A3; 21, 1A1; 22, *HindIII* ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 23, P17; 24, A4; 25, 6A5; 26, P19; 27, P21; 28, P24; 29, A28; 30, A26; 31, 5A1; 32, 9A20; 33, P22; 34, 7A36; 35, 61A1; 36, 29A1; 37, 13A10; 38, *Xenorhabdus sp.*CIP 105189.**

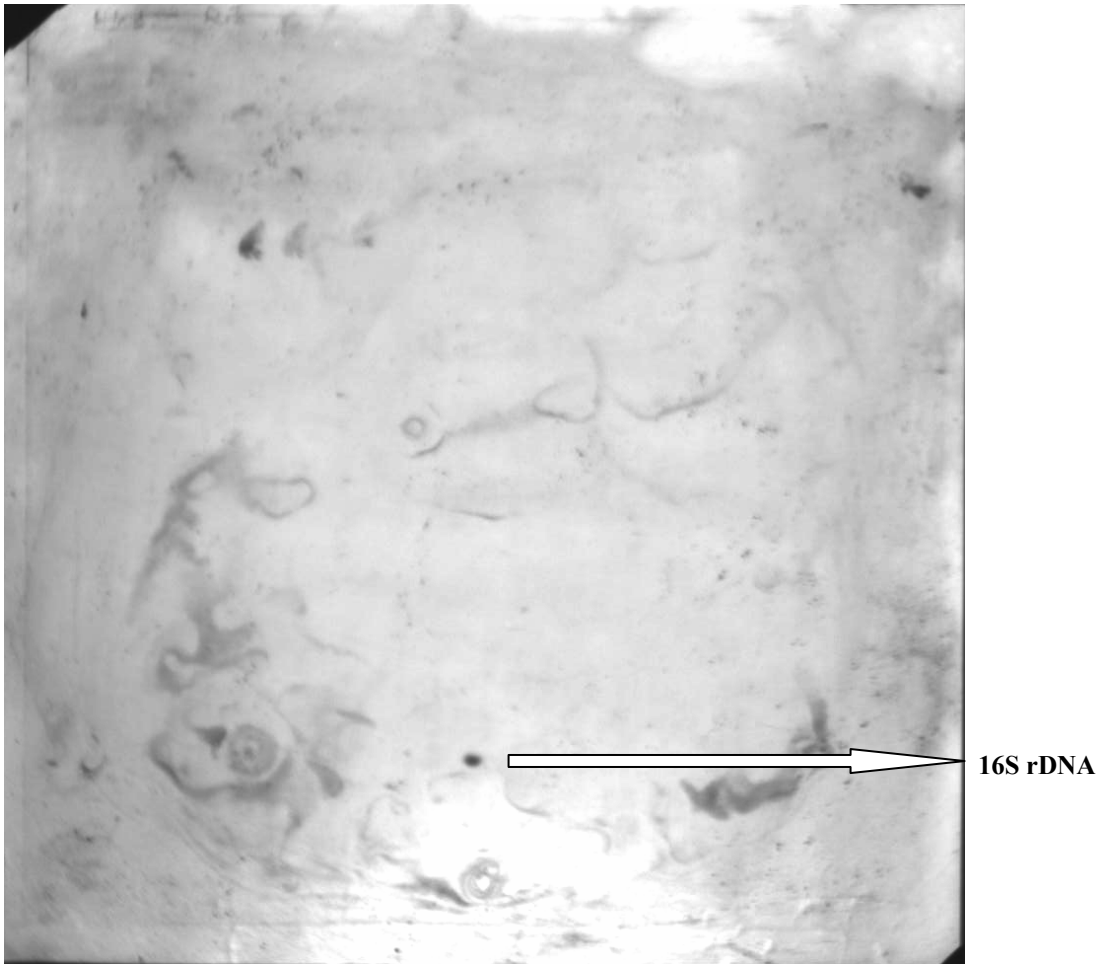


**Şekil 3.55. *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların agaroz jel profili. 1, L1; 2, L3; 3, L5; 4, L6; 5, L14; 6, L15; 7, L21; 8, L22; 9, 8A3; 10, L13; 11, 10A5; 12, 27E3; 13, L8; 14, L10; 15, L16; 16, P20; 17, A7; 18, A18; 19, A23; 20, A3; 21, 1A1; 22, *HindIII* ile kesilmiş  $\lambda$  DNA (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbç); 23, P17; 24, A4; 25, 6A5; 26, P19; 27, P21; 28, P24; 29, A28; 30, A26; 31, 5A1; 32, 9A20; 33, P22; 34, 7A36; 35, 61A1; 36, 29A1; 37, 13A10; 38, *Xenorhabdus sp.*CIP 105189.**

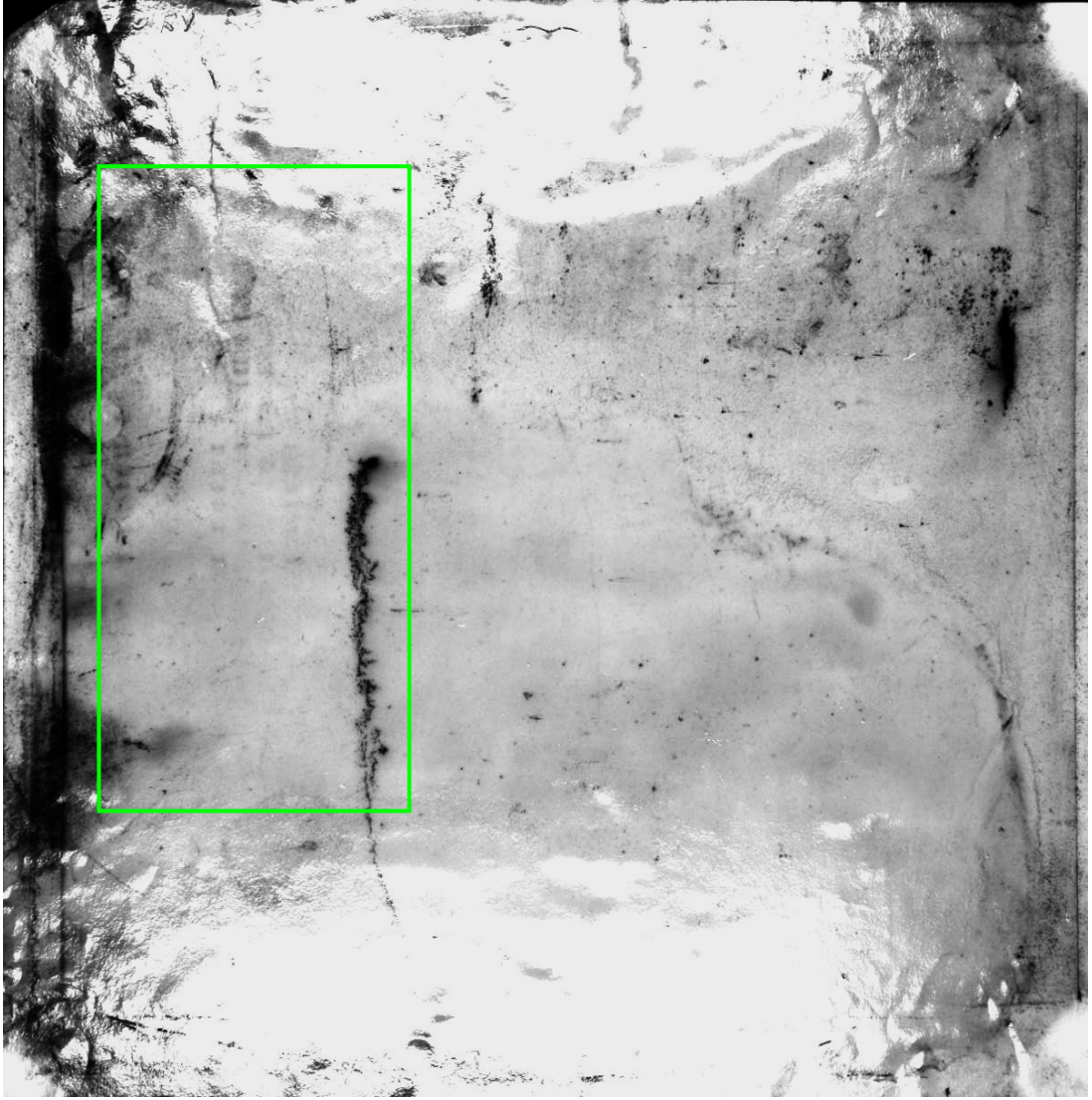
### 3.5.3. HİBRİTLEME

#### 3.5.3.1. DIG işaretli problemlerin kullanıldığı “Ribotyping” denemesi

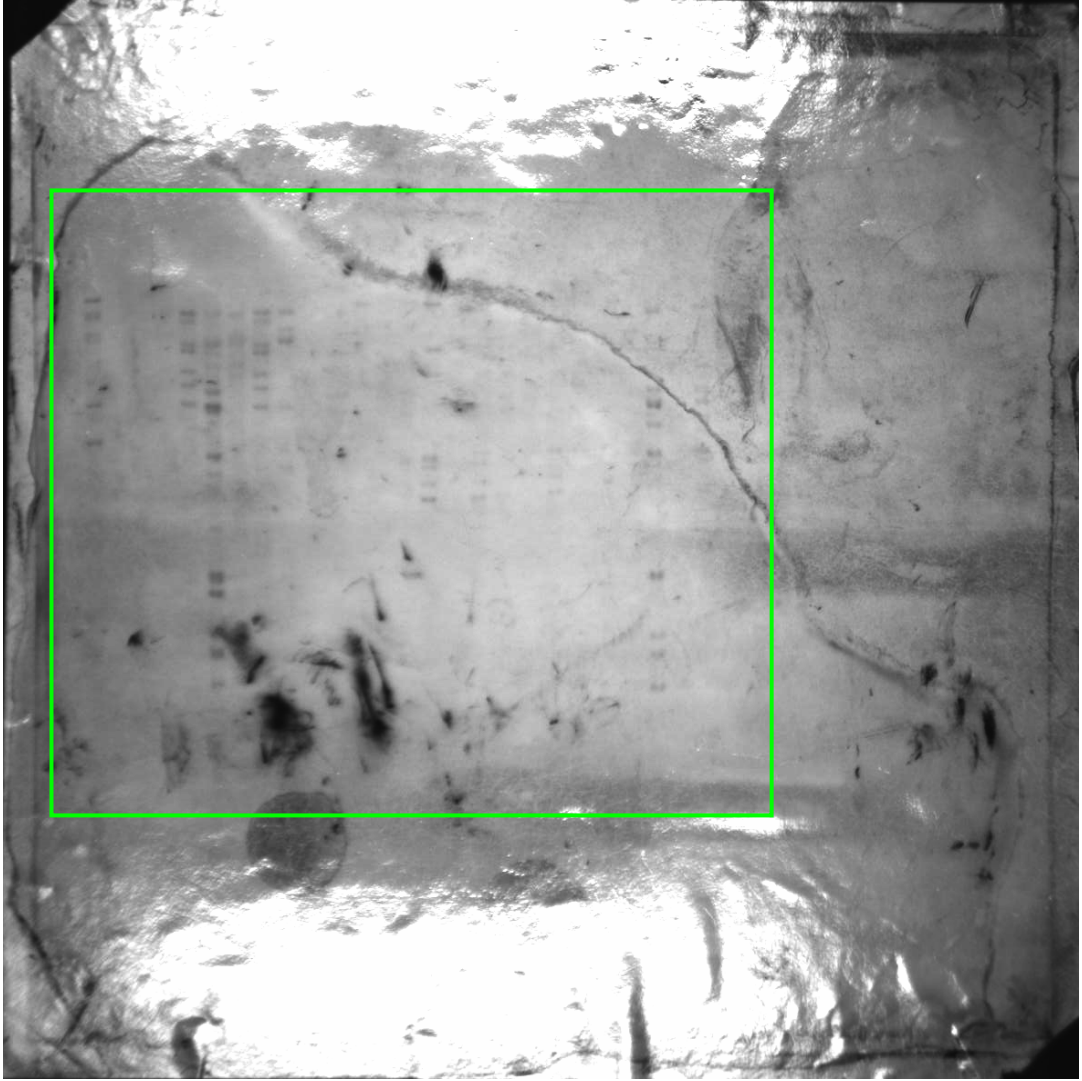
*Hind*III, *Cla*I ve *Eco*RV restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılan genomik DNA’lar naylon membrana aktarıldı ve DIG-dUTP ile işaretlenmiş OligoMiks-5 ile hibritlendi. Hibridizasyon sonrasında AP-konjuge anti-DIG Ab kullanılarak immüno-blot yapılan ve NBT+BCIP ile boyanan naylon membranlar Şekil 3.56.-3.58.’de görülmektedir.



**Şekil 3.56.** *Hind*III restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA’ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre.



**Şekil 3.57.** *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre.

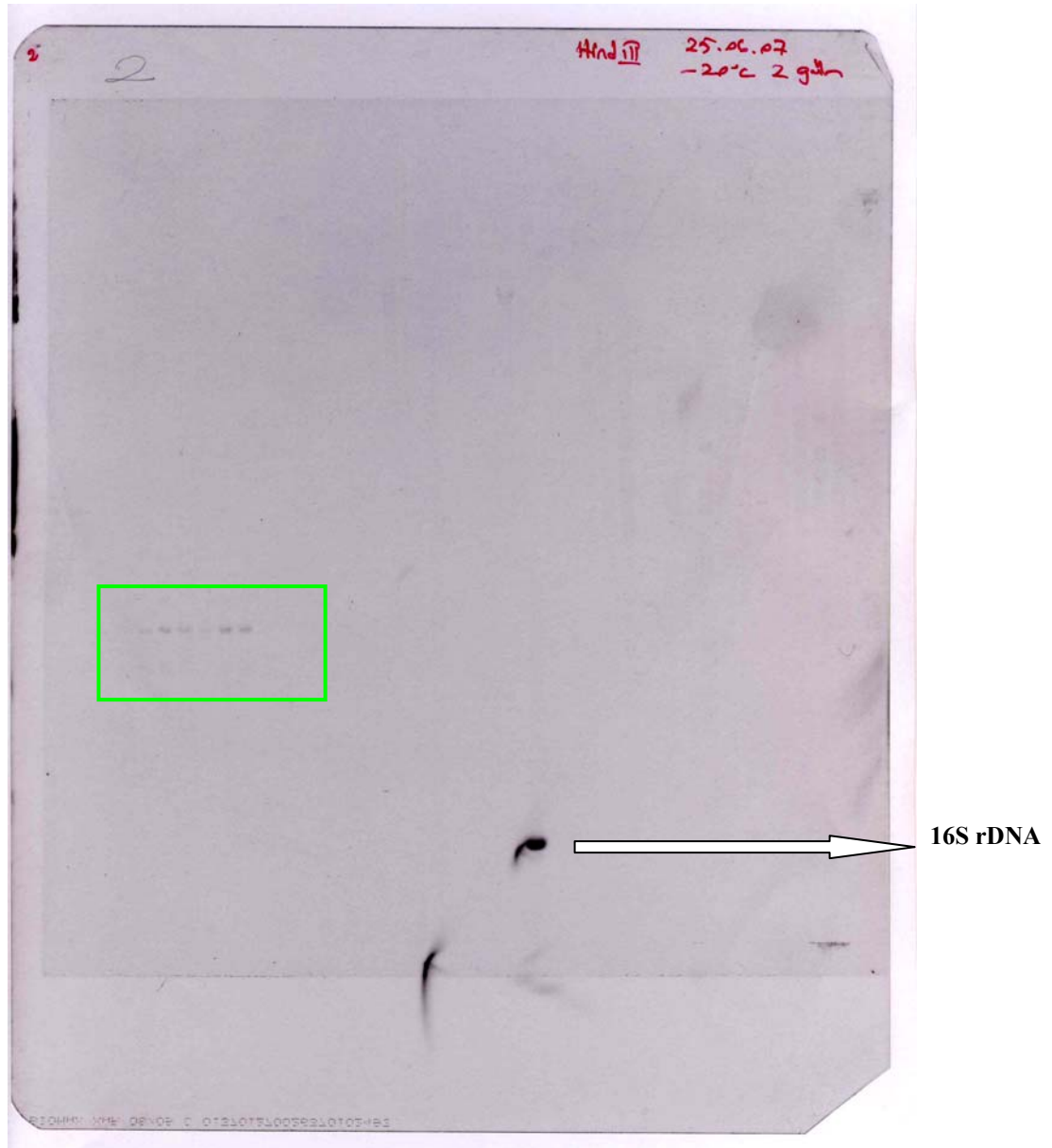


**Şekil 3.58.** *ClaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA’ların transferi sonrasında DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen Naylon Filtre.

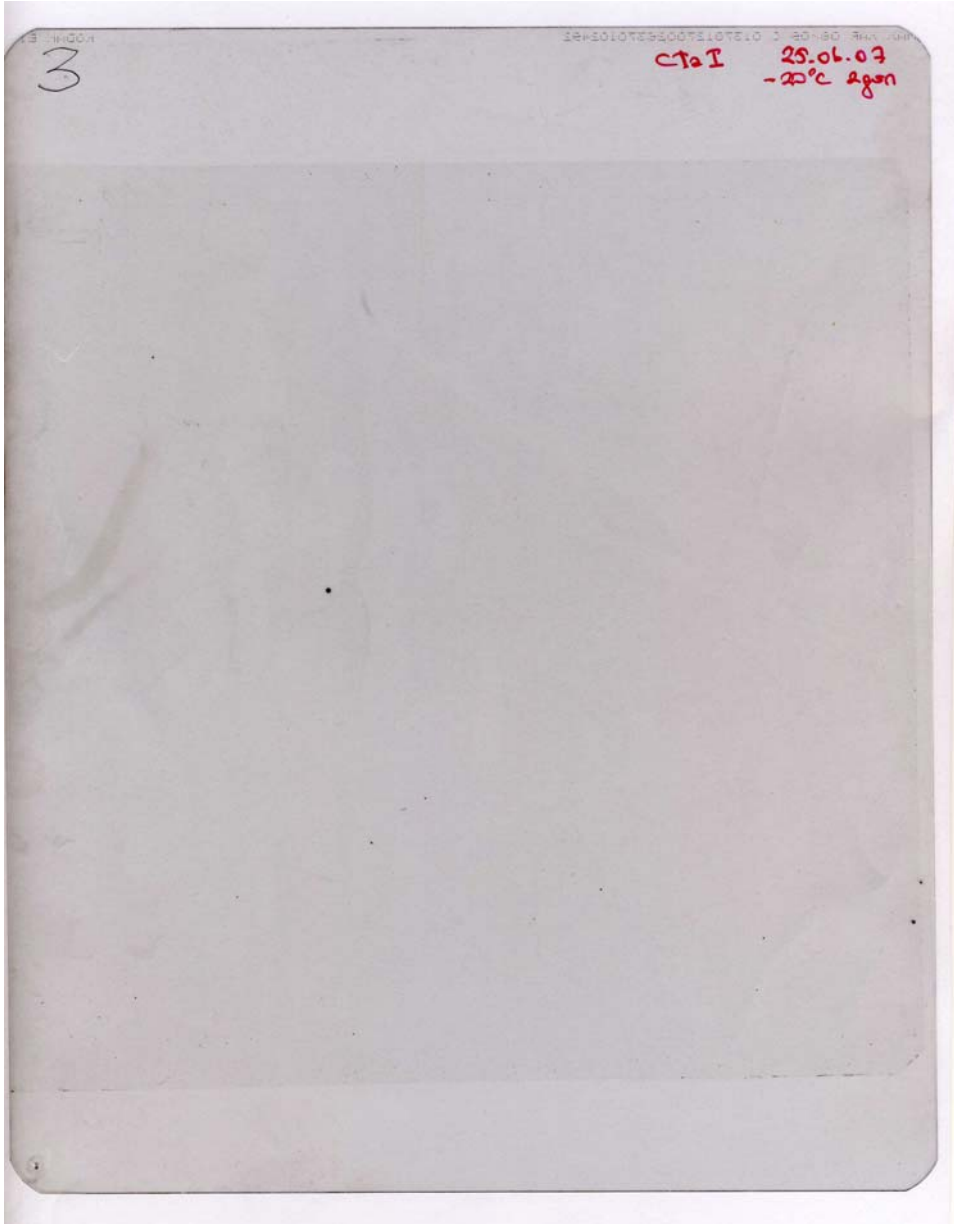
*HindIII* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen filtrede yalnızca, sistemin işlerliğini test etmek amacıyla yüklenmiş olan 16S rDNA’nın işaretlendiği görüldü (Şekil 3.56.). Bunun dışında, hiçbir yerel izolat veya referans soya ait bant gözlenemedi. *EcoRV* filtresinde daha önceki tiplendirme çalışmalarının sonuçlarına göre *B. pumilus* olabilecekleri düşünülen yerel izolatların bulunduğu bölgede birkaç kuyuda, *ClaI* filtresinde ise yine *B. pumilus*’ların olduğu bölge ile birlikte daha geniş bir alanda işaretlenmiş bant profilleri elde edildi (Şekil 3.57. ve 3.58.). Şekil 3.57. ve 3.58.’de verilen filtre görüntülerinde bantlar “ACD Systems, Canvas X” programı kullanılarak güçlendirilmiştir.

### 3.5.3.2. Radyoizotop ile işaretli problemlerin kullanıldığı “Ribotyping” denemesi

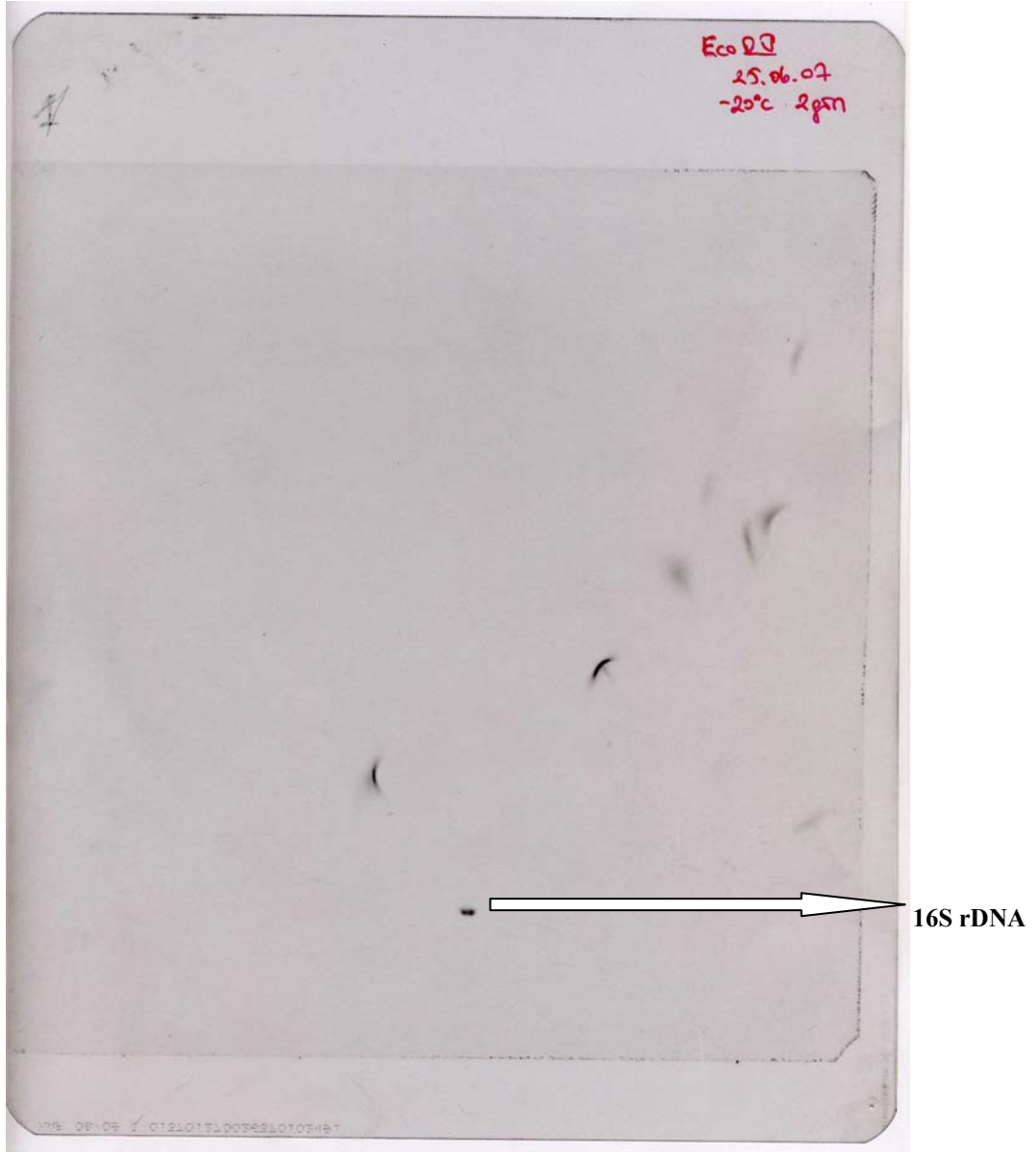
DIG-dUTP ile işaretli OligoMiks-5 ile gerçekleştirilen çalışmada tüm yerel izolatlar için yorumlanabilir ribotipler elde edilemediği için aynı çalışma ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-ATP ile işaretli OligoMiks-5 kullanılarak yinelendi. Yapılan otoradyografi sonucunda yalnızca *EcoRV* ve *HindIII* enzimlerine ait filtrelerde 16S rDNA’da, ayrıca *HindIII* enzimi ile *B. pumilus* soylarında işaret görüldü (Şekil 3.59.-3.61.).



**Şekil 3.59.** *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA’ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi.



**Şekil 3.60.** *Cla*I restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi.



**Şekil 3.61.** *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA'ların transferi sonrasında ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-ATP ile işaretli OligoMiks-5 ile hibritlenen naylon filtrenin otoradyografi filmi.

## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı doğal ortamlardan elde edilen türlerin karakterize edilmesi mikroorganizmaların özgünlüklerinin anlaşılması için önemli bir araçtır. Farklı çevresel koşullardan elde edilen yaban soylar, referans soylardan fenotipik olarak sıklıkla farklı özelliklere sahiptir. Bu nedenle, doğada küçük ya da büyük değişikliklerle genotipleri farklılaşmış biyotipler bulunabilir. Doğal ortamların bakteriyel populasyon analizi, genotipik olarak yakın ilişkili soylar arasındaki fenotipik çeşitliliği değerlendirerek mikrobiyal türlerin daha iyi tanımlanmasını sağladığı ve özgün biyoteknolojik süreçlere daha uygun soyların koleksiyonlara katılmasına fırsat sunduğu için bilimsel ve pratik olarak önem taşımaktadır (Manachini ve ark., 1998).

*Bacillus* cinsi çomak şekilli, aerobik ya da fakültatif anaerobik olabilen, sıcaklığa dayanıklı spor yapabilen bir bakteridir. Bu cins içinde bazı türler eşsiz özelliklere sahip olduğundan biyoteknolojik uygulamalar için ilgi çekicidir. Örneğin; *B. thuringiensis* soyları endotoksin ürettiğinden ticari olarak zararlı böceklerin kontrolü için önemlidirler (Demezas ve Bell, 1995). *Bacillus* cinsi içinde endüstriyel olarak önemli bir diğer tür *Bacillus licheniformis*'tir. Bu tür gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılan amilaz, karbohidraz ve proteaz gibi enzim preparatlarının kaynağıdır. *B. licheniformis* ayrıca rekombinant DNA teknolojisi için de ilgi çekici bir soydur. Literatürde endüstriyel olarak önemli bazı ürünlerin bu *Bacillus* türünde klonlama ve ekspresyonlarının tanımlandığı çeşitli yayınlar bulunmakta, ayrıca vektör ve restriksiyon endonükleazlar için ilgi çekici bir kaynak olarak düşünülmektedir (Manachini ve ark., 1998). Anılan nedenler, yeni bakteri izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasını endüstriyel olarak ve yasal boyutta oldukça cazip kılar. Geçmişte yeni *Bacillus* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması problemli bir süreçti. Fenotipik özellikleri temel alan sayısal taksonomi bakteriyi tanımlamak için genel bir yaklaşım olup, *Bacillus* türlerinin koleksiyonlarına da uygulanmıştır. Bu yaklaşım çok sayıda test uygulanması gerektiği için yorucudur. Aynı zamanda her zaman kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar vermez. Moleküler biyoloji teknikleri bakteri türlerinin tanımlanması için alternatif bir yaklaşımdır. (Demezas ve Bell, 1995).

Bir organizmanın tanımlanabilmesi için, onun evrimsel hikayesi ve diğer organizmalarla ilişkileri hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Klasik Mikrobiyoloji bunu yapma yeterliğinde değildir (Olsen ve Woese, 1993). Bakteriyel morfoloji, fizyoloji ve diğer tüm hücre özellikleri güvenilir filogenetik göstergeler olmak için basit ve değişkendir. Oysa, moleküler diziler zengin bir evrimsel bilgi kaynağıdır. Bu düşünceyi ilk kez açığa kavuşturan Zuckerkandl ve Pauling (1965)'in “evrimsel tarihin belgeleri olarak moleküller” başlıklı makalesinden sonra filogenetik çıkarımlar kaba hücresel ve organizmal özellikler düzeyinden moleküler nitelikler düzeyine kaymıştır (Olsen ve Woese, 1993).

Moleküler filogeni genomun bir bölümünün filogenisidir. Genotipik düzeyde tanımlanabilecek karakter sayısı fenotipik düzeyin çok üzerindedir. Tanımlanabilen her fenotipik işlev için evrimsel olarak bağımsız onlar ya da binlerce rezidüyü kapsayan moleküler dizi/diziler söz konusudur. Bu nedenle, filogenetik gruplar kolayca tanımlanamaz ancak, ıraksaklıkları hesaplanabilir ve farklılaşma süresi ölçülebilir. Hücrede temel, evrensel işleve sahip diziler işlevlerinden çok daha kolay değişikliğe uğrarlar. Bu da, evrimbilimcilere metodolojik öneme sahip genotipik özelliklerine karşın fenotipik düzeye yansımayan özelliklerini kodlayan genler sunar. Bu genler üzerinden bakteriyel evrim kolaylıkla değerlendirilebilir ve organizmalar birbirleriyle karşılaştırılabilir (Olsen ve Woese, 1993). Bir organizmanın filogenisinden söz etmek için, o organizmanın tüm tarihini yansıtabilecek çeşitli genler ya da moleküller aranmalıdır: rRNA'lar, RNA polimerazlar, uzama faktörü G (EF-G), proton-transloke edici ATPazlar, vb. moleküller organizmanın geçmişine ait bilgi vermek için elverişlidir (Olsen ve Woese, 1993).

Her ne kadar organizmanın genlerinden birisinin dizilenmesiyle organizmal filogeninin doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenebileceği belirtilse de, literatürde farklı genlerin farklı filogeniyle sonuçlandıklarına dair çeşitli örnekler de bulunmaktadır (Olsen ve Woese, 1993). Aynı sorun farklı analiz yöntemleri için de geçerlidir. Filogenetik çıkarım için kullanılacak tekniklerden hiçbirisi gerçekte mükemmel değildir. Bir molekölü filogenetik ilişkiler için iyi bir ölçüm aracı yapan şey, onun büyüklüğü ve yapısıdır. 16S rRNA 5S rRNA'dan daha büyük ve ikincil yapısı daha yüksek olduğu için filogenetik analizlerde daha güvenilir sonuçlar verir.

Bu bakış açısıyla 23S rRNA'nın küçük alt birime görece iki kez daha fazla filogenetik bilgi taşıyacağı düşünülebilir. Bu bazı sınırlamalarla doğru kabul edilebilir ancak, dizinin ortalama değişme sıklığı 16S rRNA'dan fazladır. Bu nedenle, yakın ilişkilerin belirlenmesi için büyük alt birim bilgi verici olsa da, daha ıraksak olanlar için değildir. 16S ve 23S rRNAlar işlevsel anlamda bağımsız olmadığından genel olarak her ikisi ile de benzer sonuçlar alınmaktadır (Olsen ve Woese, 1993).

rRNAların korunmuş bölgeleri homolog dizilerin tanımlanması için gereklidir ancak, filogenetik bilgi taşımaz. Az miktarda değişikliğe uğrayan bölgeler daha ıraksak gruplar için ayırt ettirici olup, daha yeni farklılaşmalar için (benzerliği yüksek diziler) daha değişken bölgeler kullanışlıdır. Ancak, bu çok değişken bölgeler ıraksak dizilerin analizinde kullanılırsa sistematik hata oranı artar (Olsen ve Woese, 1993).

“Ribotyping”, oligonükleotit problemler ile hibritleme, PCR-temelli protokoller ve DNA dizi analizleri mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılabilecek moleküler yöntemlerden bazılarıdır (Schlegel, 2003). Bunların arasında restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi analizi bakteriyel tanımlama için genel bir yöntem olarak önerilmektedir. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA (rDNA)'nın restriksiyon analizi (ARDRA) bakteriyel izolatların tür düzeyinde tanımlanması için hızlı ve etkin bir yöntem olarak rapor edilmiştir (Schlegel, 2003). Bu yöntemin *rrn* operonunu (16S rRNA geni, 16S-23S intergenik bölgesi ve 23S rRNA geni) içerecek şekilde geliştirilmiş *Enterobacteriaceae* ailesine ait türler için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Schlegel, 2003). Genotip-temelli moleküler tiplendirme yöntemlerinden bir diğeri olan “ribotyping”, kromozomal genetik çeşitliliğin ve çeşitli bakteriyel türler ve alt türler arasındaki ilişkilerin açıklanması için oldukça etkin bir moleküler taksonomik araç olarak tanımlanmıştır (Grimont ve Grimont, 1986). Bu yöntem DNA-DNA hibritlenmesine dayandığı için fenotipik veri temelli yaklaşımlardan daha kararlı, güvenilir ve güçlü sonuçlar verir.

Bu çalışmada; çeşitli yerel ekosistemlerden alınan su ve toprak örneklerinden izole edilmiş  $\alpha$ -amilaz, alkalen proteaz ve lipaz üreticisi *Bacillus* izolatlarının tür

düzeyinde tanımlanmaları amacıyla kullanılabilecek moleküler temelli yaklaşımlar denenmiştir. Belirtilen bu soylar daha önce Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilen yüksek lisans tezleri (Tuzlakoğlu, 2004; Battal, 2004; Balcı, 2004) kapsamında manuel olarak yapılan biyokimyasal testler ve morfolojik incelemelerin yanı sıra, API 50CHB/E ve API 20E kitleri ile VITEK (BIOMERIEUX) tanılama sisteminin *Bacillus* kiti kullanılarak tanımlanmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda her üç yöntem ile elde edilen sonuçlar genel olarak farklılık göstermiştir (Bulgular Çizelge 3.13). Bazı manuel testlerin yinelenmesi ve sonuçların birlikte değerlendirilmesi sonucunda izolatlara ortak tür isimleri verilebilse de, karar verilemeyen türler de olmuştur. Yerel *Bacillus* izolatlarının tür düzeyinde tanımlamalarının gerçekleştirilmesi amacıyla bu tez çalışmasında, daha güvenilir ve kesin sonuçlar verdiği literatür bilgileri ile kanıtlanmış olan moleküler taksonomik yöntemlerden 16S rDNA analizi, 16S ARDRA, *rrn*-ARDRA ve ribotyping yöntemleri bu tez çalışmasında kullanılan tekniklerdir.

#### 4.1. 16S rDNA Dizi Analizi

25 yerel *Bacillus* izolatının Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi kullanılarak “Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS)” yöntemi ile 16S rDNA dizi analizlerinin yapıldığı çalışmada 16S rRNA genine özgü evrensel primerlerden iki ileri iki geri primer kullanılarak her reaksiyonda yaklaşık 500 - 700 bazlık bir bölümün okunması sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen 16S rDNA dizilimlerinin toplam uzunluğu 1246 ile 1471 baz arasındadır. Tüm izolatlar için elde edilen 16S rDNA dizilimleri NCBI web sitesinde bulunan BLAST hızlı tarama programı kullanılarak nükleotit veri tabanında yer alan DNA dizileri ile karşılaştırılmış ve benzerlik gösterdikleri soylar belirlenmiştir.

Mignard ve Flandrois (2006) 16S rDNA dizi analizinin bazı sınırlamaları olduğunu belirtmişlerdir. Bunlardan birincisi yöntemin bazı cinsler için ayırt ettirici özelliğinin zayıf olması, diğeri ise bir diziyi belirli bir tür veya cinse atamak için gereken benzerlik yüzdesi hakkında evrensel bir uzlaşmanın olmamasıdır. Stackebrandt ve Goebel'e (1994) göre % 97,5 veya altında bir 16S rDNA dizi

homolojisi gösteren iki suş arasındaki DNA benzerliği % 60-70'den az olduğu için bu iki suş aynı türe ait değildir. Diğer bazı durumlarda ise, irdelenen organizmaların dizi homolojisi % 97,5'tan yüksek olduğu halde, dizileri aynı derecede benzer iki veya daha fazla türle akraba olmaları nedeniyle suşlar belirli bir türe atanamamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen 16S rDNA dizilimlerinin BLAST hızlı tarama programı aracılığı ile GenBank veri tabanı ile karşılaştırılması sonucunda dizi benzerliği en az % 97,5 olan türler dikkate alınmıştır. Ancak Forney ve arkadaşları (2004), Stackebrandt ve Goebel'in (1994) bu önerisinden yola çıkan pek çok araştırmacının bulgularını yanlış yorumladığını ve eğer suşlar arasındaki 16S rRNA gen dizisi benzerliği % 97,5'ten büyükse bu suşların aynı türden geldiği sonucuna ulaşılabilceğini savunmuşlardır. Literatürde bu yanlış anlamının örnekleri bulunmakla birlikte, Yassin ve arkadaşları yayınladıkları makalede bu kuralın *Corynebacterium* için yanlış olduğunu, çalışmalarının farklı türleri içermesine karşın bu türlerden elde edilen 16S rDNA dizilimleri arasındaki dizi benzerliklerinin % 97,5'ten büyük olduğunu belirtmiştir (Forney ve ark., 2004).

16S rDNA ırka özgü sınıflandırmada kullanışlıdır; çünkü tüm bakterilerde bulunmaktadır ve daha değişken dizilerle birlikte yüksek derecede korunmuş nükleotit dizileri içermektedir. Belirli bir cinste, farklı türlerin 16S rRNA'ları en azından % 1,5 oranında farklılık göstermektedir. Bu kuralın bir istisnası *Bacillus* cinsinin belirli türlerinde bulunmuştur. Bu *Bacillus* türlerinin, DNA-DNA hibridizasyonu ile açık bir biçimde ayırt edilebilir olmalarına karşın neredeyse aynı 16S rRNA'lara sahip oldukları gösterilmiştir. Bunun olası bir açıklaması bu türlerin evrimsel zaman çizelgesinde yakın zamanda birbirlerinden uzaklaştıkları ve 16S rRNA'larının değişmek için yeterli zamana sahip olmamış olmasıdır (Singleton, 2004).

Tez çalışması kapsamında dizi analizi sonucunda belirlenen tür adları, ön tüplendirme çalışmaları sonucunda karar verilmiş olan tür adları ile büyük ölçüde uyum göstermektedir. L1, L3, L5, L6 ve L21 yerel izolatları için her iki çalışmada da önerilen tür adı *B. pumilus*'tur. L1 izolatu *B. pumilus*'a % 98, L3, L5, L6 ve L21 izolatları ise % 99 benzerlik göstermiştir.

Ön tiplendirme çalışmalarında L14, L15 ve L22 yerel izolatlarının yapılan manuel testler sonucunda *B. pumilus* veya *B. subtilis* olabileceği önerilmiş, VITEK sistemi ise bu üç izolatu tanımlayamamıştır. API kitleri ile *B. pumilus* olabileceği öngörülmeyle birlikte tanımlanmamış bir soy olabileceği de belirtilmiştir. 16S rDNA dizi analizi çalışması ise L14, L15 ve L22 izolatlarının *B. pumilus* olabileceğini göstermektedir. L14 izolatu *B. pumilus*'a % 98, L15 ve L22 izolatları ise % 99 benzerlik göstermiştir.

API kitleri ile *B. stearothermophilus/B. firmus*'a benzer görülen L8 yerel izolatu için ön tiplendirme çalışmalarında önerilmiş olan tür adı *B. subtilis*'tir. Ancak dizi analizi çalışması bu izolatın *B. subtilis* (% 99) ile birlikte, *B. amyloliquefaciens* (% 99), *B. polyfermenticus* (% 99) ve *B. licheniformis*'e (% 99) benzerlik taşıdığını göstermektedir.

Her üç yöntem ile farklı bir türe benzerlik gösteren L10 yerel izolatu için ön tiplendirme çalışmalarında önerilmiş olan tür adı *B. subtilis/B. amyloliquefaciens*'tir. Dizi analizi çalışmasında bu izolatın *B. subtilis* (% 99), *B. amyloliquefaciens* (% 99), *B. polyfermenticus* (% 99) ve *B. licheniformis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

L13 ve L16 yerel izolatları manuel testler ve VITEK sistemi ile *B. subtilis*'e benzer bulunmuştur. L13 API kiti ile *B. pumilus*'a, L16 ise *B. amyloliquefaciens*'a benzetilmiştir. 16S rDNA dizilimleri ile bu izolatlar *B. subtilis* (% 99-98), *B. mojavensis* (% 100-98) ve *B. axarquiensis* (% 100-98) ile benzerlik göstermiştir.

P17 yerel izolatu yapılan manuel testler sonucunda herhangi bir tür ile benzerlik göstermemiş olmakla birlikte, API kitleri ve VITEK sistemi ile *B. cereus* grubuna benzer bulunmuş ve bu sonuç yapılan 16S rDNA dizi analizi çalışmaları ile de doğrulanmıştır. P17, *B. thuringiensis* (% 99), *B. cereus* (% 99) ve *B. anthracis*'e (% 99) benzer bulunmuştur.

Klasik tiplendirme çalışmalarında P19 yerel izolatu *B. licheniformis* veya *B. subtilis*'e benzer bulunmuştur. Dizi analizi çalışmasında bu izolatu *B. subtilis* (% 99), *B. mojavensis* (% 99) ve *B. axarquiensis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

P20 yerel izolatu için ön tiplendirme çalışmalarında önerilen tür adı *B. subtilis* olmakla birlikte, API kitleri ile *B. amyloliquefaciens*'e de benzerlik görülmüştür. Ancak dizi analizi çalışmasında bu izolatu *B. thuringiensis* (% 99), *B. cereus* (% 99) ve *B. anthracis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

P21 ve P24 soyları için her iki çalışmada da önerilen tür adı *B. licheniformis*'tir. Ancak, P21 VITEK sistemi ile tanımlanamamış, P24 ise ayrıca, *B. amyloliquefaciens*'e benzer bulunmuştur. Dizi analizinde her iki izolat için de *B. licheniformis* ile % 99 benzerlik saptanmıştır.

P22 yerel izolatu her üç yöntem ile de farklı bir türle benzer görülmüş, yinelenen bazı manuel testler sonucunda *B. megaterium* olarak önerilmiştir. Yapılan 16S rDNA dizi analizi sonucunda ise bu izolat yine farklı bir türle benzer (*B. flexus* (% 99)) bulunmuş, ancak *B. megaterium* ile de % 98 benzerlik taşıdığı görülmüştür.

A3 yerel izolatu için klasik tiplendirme çalışmalarında önerilmiş olan tür adı *B. subtilis*'tir. Dizi analizi çalışmasında bu izolat *B. subtilis* (% 98), *B. mojavensis* (% 98) ve *B. axarquiensis* (% 98) ile benzer bulunmuştur.

A4 yerel izolatu için ön tiplendirme çalışmalarında önerilen tür adı *B. cereus*'tur. Dizi analizi sonucunda da bu izolatu *B. thuringiensis* (% 99), *B. cereus* (% 99) ve *B. anthracis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

A7 klasik tiplendirme sonucunda *B. subtilis*'e benzer bulunmuştur. Dizi analizi çalışmasında bu izolatu *B. subtilis* (% 99) ve *B. axarquiensis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir. A4 ve A7 yapılan manuel testler sonucunda herhangi bir soy ile benzerlik göstermemiştir.

A18 ve A23 yerel izolatları manuel testler ve VITEK sistemi ile yapılan testler sonucunda *B. subtilis* olarak önerilmiş olmakla birlikte, API kitleri ile her ikisi de *B. amyloliquefaciens*'e benzer bulunmuştur. 16S rDNA dizi analizi sonucunda A18 *B. subtilis* (% 99), *B. mojavensis* (% 99) ve *B. axarquiensis* (% 99) ile benzerlik gösterirken, A23'ün *B. subtilis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir .

A26 yerel izolatu manuel testlerle *B. stearothermophilus*'a, VITEK sistemi ile *B. licheniformis*'e benzer bulunmuş, API kitleri ile ise tanımlanamamıştır. Bu izolatin 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. subtilis* (% 98) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

A28 manuel testlerle *B. subtilis*/*B. licheniformis*, VITEK sistemi ile *B. licheniformis*'e benzer bulunmuş, API kitleri ile ve ayrıca VITEK sistemi ile tanımlanamamış bir tür olabileceği de önerilmiştir. Ancak dizi analizi çalışmasında bu izolatin *B. subtilis* (% 99) ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

Özet olarak; yapılan 16S rDNA dizi analizleri sonucunda toplam 25 yerel izolattan P20, P22, A26 ve A28 yerel izolatları dışında diğer izolatlar daha önce manuel testler ve ticari kitler ile verilen tür adlarına benzer olarak isimlendirilmiştir. P20 *B. cereus* ve P22 ise *B. flexus* gibi klasik tiplendirme sonuçlarında belirlenenlere göreceli oldukça farklı türlerle % 99 oranında benzerlik göstermişlerdir. Klasik tiplendirme sonucunda kesin bir tür adı verilemeyen A26 *B. subtilis* ile % 98, *B. licheniformis* olarak önerilen A28 ise *B. subtilis* ile % 99 oranında benzerlik göstermiştir.

Heyrman ve Swings (2001) duvar resimlerinden elde ettikleri izolatların 16S rDNA dizilimlerini EMBL veri tabanındaki dizilerle karşılaştırmışlar ve inceledikleri suşların *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. macroides* ve *Micrococcus luteus* türleri ile % 99'dan fazla dizi benzerliği taşıdığını görmüşlerdir. 16S rDNA dizi analizinin daha çok cins düzeyinde kesin bir ayırım sağladığını, tür düzeyinde ayırımın ise ayırt ettirici özelliği daha yüksek olan bir moleküler tiplendirme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilebileceğini belirtmişlerdir.

Uzun erimli evrimsel analizler dizi farklılıkları oldukça fazla moleküllerin kullanımını gerektirir. Eğer, 16S rRNAlar arasındaki farklılıklar az ise, böyle diziler filogenetik analizler için elverişli değildir. Bu özellikle *Bacillus*, *Aeromonas* ve *Vibrio* cinsi gibi oldukça yakın ilişkili organizmalar arasındaki filogenetik analizler sırasında belirginleşen bir durumdur (Martinez-Murcia ve ark., 1999).

## 4.2. ARDRA

Bakteriyel soyların tiplendirilmesi için kullanılabilecek bir diğer teknik olan ARDRA kapsamında yapılan çalışmalarda, 25 yerel *Bacillus* izolatı ve 11 referans *Bacillus* soyunun *rrn* operonlarının PCR aracılığı ile çoğaltılması ve *Sau3AI*, *MboII* ve *CfoI* enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezinde oluşan bant profillerinin, daha önce gerçekleştirilmiş olan ön tiplendirme çalışmaları ve 16S rDNA dizi analizleri sonuçları ile birlikte irdelenmesi hedeflenmiştir. Ancak *rrn* operonunun üretiminde karşılaşılan sorunlar gerçekleştirilen çeşitli optimizasyon denemeleri (Bulgular Bölüm 3.2.2) ile aşılamayınca, ARDRA öncelikle 16S rRNA genleri ile uygulanmıştır. Saf olmayan *rrn*-PCR ürünlerinin kullanıldığı ARDRA çalışmalarının sonuçları ile seçilen 10 izolat ve 16S rDNA dizi analizleri ışığında belirlenen referans soyları ile agaroz jelden izole edilen 4,5 kbç büyüklüğündeki saf *rrn* operonlarının kullanıldığı ARDRA analizlerinin sonuçları Bölüm 3.2.3.'de görülmektedir.

### 4.2.1. 16S ARDRA

Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerde çalışmaya dahil edilen soy sayısının çok fazla olması ve çalışmanın yapıldığı dönemde laboratuvarımızda tüm örneklerin aynı anda yüklenebileceği büyüklükte bir elektroforez sisteminin bulunmaması nedeniyle, belirtilen enzimlerle sindirilen izolatlar ve referans soylar buraya kadar yapılan çalışmaların ışığında belirlenen uygun referanslar eşliğinde metafor içeren çeşitli büyüklüklerdeki agaroz jellere yüklenmiştir. Her çalışmada, elektroforez koşulları her ne kadar sabit tutulmaya çalışıldıysa da, farklı büyüklüklerdeki

jellerde yürütölmeleri nedeniyle elektroforez sırasındaki koşullara bağılı olarak bant profillerinde farklılıklar oluşabilmekte, bu da görsel değeriendirme sırasında hatalara neden olmaktadır. Aynı enzim ile kesilen tüm izolatların var olan tüm referans soylar ile aynı jelde görüntülenememesi, Bölümümüze özellikle bu proje kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere sağlanan ve ilk kez bu deneylerde kullanılan görüntüleme sisteminin yazılımından kaynaklanan bir sorun ve bu nedenle henüz çok etkin bir şekilde kullanılamaması nedeniyle, bu çalışma özelinde tüm soyları kapsayan dendogramlar çizilememiştir. Bunun yerine, kesim profilleri her bir izolat ve referans soy için gözle ayrı ayrı irdelenerek not edilmiş ve elde edilen bu profiller tablolaştırılarak Bulgular Bölüm 3.4.1 'de anlatıldığı şekilde birebir karşılaştırılmış ve benzerlikler irdelenmiştir. Ek olarak, elde edilen profillerde örnek miktarının azlığı nedeniyle bazı profillerin silik olması ya da literatürde de belirtildiğı üzere *rrn* operonunun kopyalarındaki olası dizi değışikliklerinden kaynaklanabilecekleri düşünölen silik bantların gözlenmesi, profillerin yorumlanmasını daha da karmaşık hale getirmiştir. 16S ARDRA ile elde edilen sonuçlar yol gösterici olmakla birlikte yeterli değildir.

Viti ve arkadaşları (2005) 16S-ARDRA çalışmasında sadece 100 bç ve üzerindeki bantları değeriendirmiştir. Daha küçük bantlar, iyi ayrıışmadıkları veya çok fazla difüze oldukları için değeriendirmeye alınmaları halinde görsel saptamada hataya yol açacaklardır. Bu bu tez çalışmasında da 100 bç'in altındaki fragmanlar difüzyon nedeniyle silik ve bant karakterinden uzak oldukları için göz ardı edilmiştir.

Acinas ve çalışma arkadaşları (2004), çoğı bakteride çoklu heterojen rRNA operonlarının belirlenmesi nedeniyle yakın zamanda mikrobiyal ekoloji ve evrimin 16S rRNA yoluyla yorumlanmasının giderek karmaşıklaştığını belirtmektedirler. 16S, 23S ve 5S olarak adlandırılan rRNA'lar tipik olarak bir operon içerisinde birbirlerine eklenmiş şekilde bulunmaktadırlar. Bu operon sıklıkla bir "internal transcribed spacer" ve en az bir tRNA içermektedir. Bakteriyel genomların bu şekilde 1 ila 15 arasında operon içerebileceğı ve 16S rRNA dizilerinin operonlar arasında düşük oranda farklılaşabildiğı gösterilmiştir. Smith ve arkadaşlarının (1968) gerçekleştirdiğı DNA-RNA hibridizasyon deneyleri *B. subtilis*'in rRNA genlerinin genomda 7-10 kopya halinde bulunduğunu göstermiştir. 16S rDNA'nın kullanımının

dezavantajı, bir tür içerisindeki çoklu kopyalar arasındaki heterojenliğin elde edilen profillerin yorumlanmasını zorlaştırmasıdır. Özellikle *Bacillus* için 16S rDNA'nın tür düzeyinde ayırıcı olmadığı gösterilmiştir (Dahllöf, 2002). Bu bilgi, bu tez kapsamında yerel *Bacillus* izolatlarının tiplendirilmesi için denenen 16S-ARDRA analizi ile, cinse özgü yüksek derecede korunmuşluğa bağlı olarak yeterli ayırımın sağlanamayabileceğini düşündürmüştür. Referans *Bacillus* soyları ile örtüşmeyen son derece karmaşık ve yorumlanması zor profillerin elde edilmesi başlıca genin çoklu kopyalarının heterojenliğinden kaynaklanabilir.

Rodas ve arkadaşları (2003) 16S-ARDRA'da kullanmak üzere seçtikleri enzimlerin teorik ve deneysel kesim sonuçlarını karşılaştırdıklarında elde edilen profillerdeki bantların sayı ve büyüklüklerinde bazı farklılıklar olduğunu saptamışlardır. Bu farkın deneysel olarak elde edilen 16S dizilerinin GenBank'ta verilenlerden daha uzun olmasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Bu öneriye göre, 16S rDNA'nın 3' ve 5' uçlarına karşılık gelen restriksiyon fragmanları, daima teorik kesim için rapor edilenlerden daha uzundur. Bu çalışmada saptanan diğer farklılıkların da yayımlanmış olan dizilerdeki olası hatalardan kaynaklanabileceği ve bunun da bir veya daha fazla restriksiyon sitinin ortaya çıkışını veya yok oluşunu açıklayabileceği düşünülmüştür (Rodas ve ark., 2003).

16S-ARDRA tekniği hızlı, özgül, basit ve hassas bir yöntem olmasına karşın, 16S rDNA dizisine dayanan tüm tekniklerde olduğu gibi yüksek bir 16S rDNA dizi homolojisi paylaşan türler arasında yeterli bir ayırım yapamamaktadır (Rodas ve ark., 2003).

L1 yerel izolatu için daha önce gerçekleştirilmiş olan manuel testlerde önerilen tür adı, *B. subtilis*/*B. firmus*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. pumilus*'tur. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen 16S rDNA dizi analizi ticari kitlerle elde edilen sonucu desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında yapılan karşılaştırmada L1 izolatının 16S rDNA'sının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* enzimleri ile kesim profillerinin 8A3 *B. pumilus* referans soyunun profiline tam olarak uymadığı gibi, 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto" ve 29A1 *B. firmus* referans soyları da dahil diğer referans soylara ait kesim profilleri ile de benzeşmediği görülmüştür.

L3 yerel izolatu için daha önce gerçekleştirilmiş olan manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. sphaericus*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. pumilus*'tur. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen 16S rDNA dizi analizi ticari kitlerle elde edilen sonucu desteklemektedir. Yapılan karşılaştırmada L3 izolatının 16S rDNA'sının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* enzimleri ile kesim profillerinin, 8A3 *B. pumilus* referans soyunun profiline tam olarak uymadığı gibi, 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto" ve 13A10 *B. sphaericus* referans soyları da dahil diğer referanslara ait kesim profilleri ile de benzeşmediği görülmüştür.

L5 yerel izolatu için daha önce ticari kitler eliyle gerçekleştirilmiş analizlerin sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. pumilus*'tur. 16S rDNA dizi analizi sonuçları ticari kitlerle elde edilen sonucu desteklemektedir. ARDRA'da yapılan karşılaştırmada L5 izolatının 16S rDNA'sının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* enzimleri ile kesim profilleri 8A3 *B. pumilus* referans soyunun profiline tam olarak uymadığı gibi, *Sau3AI* kesim profilinin 61A1 *B. coagulans* referans soyunun kesim profili ile birebir uyum gösterdiği belirlenmiştir.

L6 yerel izolatu için manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. pumilus*'tur. ARDRA'da L6 izolatının 16S rDNA'sının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* enzimleri ile kesim profillerinin 8A3 *B. pumilus* referans soyunun profiline tam olarak uymadığı görüldüğü gibi, *Sau3AI* kesim profilinin 61A1 *B. coagulans* referans soyunun kesim profili ile birebir uyum gösterdiği belirlenmiştir.

L8 yerel izolatu için daha önce gerçekleştirilmiş olan manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. pumilus*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. stearothermophilus*/*B. firmus*/*B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*/*B. polyfermenticus*/*B. licheniformis*'tir. L8'in ARDRA *CfoI* profili, 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto", 9A20 *B. stearothermophilus* referans soylarının, *MboII* profili 27E3 *B. subtilis* "natto" referans soyunun ve *Sau3AI* profili ise 8A3 *B. pumilus* referans soyunun kesim profili ile birebir örtüştüğünü göstermiştir.

L10 yerel izolatu için daha önce gerçekleştirilmiş olan manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. stearothermophilus*/*B. amyloliquefaciens*'tir. 16S rDNA analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*/*B. polyfermenticus*/*B. licheniformis*'tir. ARDRA analizinde L10'un *CfoI* ve *MboII* profillerinin, hiçbir referans soyun kesim profili ile uymamasına karşın, *Sau3AI* profili 8A3 *B. pumilus* referans soyunun kesim profili ile birebir örtüşmüştür.

L13 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. pumilus*/*B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. mojavensis*/*B. axarquiensis*'tir. L13'ün ARDRA'da *CfoI* profilinin 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto" ve 9A20 *B. stearothermophilus* referans soylarının bant profili ile örtüştüğü, *MboII* ve *Sau3AI* enzim profilinin referans soyların hiçbirisinin kesim profiline benzemediği görülmüştür.

L14 yerel izolatu için manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. pumilus*'tur. L14'ün *CfoI* ve *Sau3AI* kesim profilleri 8A3 *B. pumilus* referans soyununki de dahil referans soyların ARDRA profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermezken, *MboII* kesim profilinin 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soyunun profili ile örtüştüğü belirlenmiştir.

L15 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. pumilus*, ticari kitlerin ve 16S rDNA dizi analizinin sonuçlarına göre ise *B. pumilus*'tur. L15'in *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* enzimleri ile kesim profillerinin 8A3 *B. pumilus*, 1A1 *B. subtilis* ve 27E3 *B. subtilis* "natto" referans soylarının profillerine tam olarak uymadığı görülmüştür.

L16 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı, *B. subtilis*, ticari kitlerle önerilen tür isimleri ise *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre L16 izolatu için önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. mojavensis*/*B. axarquiensis*'tir. L16'nın *CfoI* ve *Sau3AI* kesim profilleri 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B.*

*subtilis* “natto” ve 10A5 *B. amyloliquefaciens*’inkiler de dahil referans soyların profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermezken, *MboII* kesim profili 27E3 *B. subtilis* “natto” referans soyununki ile örtüştüğü belirlenmiştir.

L21 yerel izolatu için manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. pumilus*’tur. L21’in *CfoI* ve *MboII* kesim profilleri 8A3 *B. pumilus* referans soyununki de dahil referans soyların profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermezken, *Sau3AI* kesim profili 8A3 *B. pumilus* referans soyununki ile örtüşmüştür.

L22 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis/B. pumilus*, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı ise *B. pumilus*’tur. L22’nin ARDRA *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* kesim profillerinin 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* “natto” ve 8A3 *B. pumilus* referans soylarının kesim profilleri de dahil referans soylara ait kesim profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermediği görülmüştür.

Ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre P17 yerel izolatu *B. cereus* grubuna dahil görünmektedir. P17 izolatu için elde edilen ARDRA *CfoI* kesim profili hiçbir referans soy ile uyum göstermezken, *MboII* profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans* referans soylarının kesim profilleriyle, *Sau3AI* kesim profili ise 6A5 *B. cereus* referans soyunun kesim profili ile uyum göstermiştir.

P19 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı *B. licheniformis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. subtilis/B. amyloliquefaciens*’tir. P19’un 16S rDNA analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis/B. mojavensis/B. axarquiensis*’tir. P19 izolatu için elde edilen ARDRA *CfoI* kesim profili hiçbir referans soy ile uyum göstermezken, *MboII* profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans* referans soylarının kesim profiliyle, *Sau3AI* kesim profili ise 9A20 *B. stearothermophilus* ve 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soylarının kesim profili ile uyum göstermiştir.

P20 yerel izolatu için manuel testlerde önerilen tür adı *B. subtilis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. subtilis/B. amyloliquefaciens*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre ise *B. cereus* grubuna dahil görünmektedir. P20'nin ARDRA *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* kesim profillerinin referans soylara ait kesim profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermediği görülmüştür.

P21 yerel izolatu için manuel testler, ticari kitler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. licheniformis*'tir. P21'in ARDRA *CfoI* kesim profili 13A10 *B. sphaericus* referans soyunun profili ile uyum gösterirken, *MboII* profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans*, *Sau3AI* profili ise 9A20 *B. stearothermophilus* ve 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soylarının kesim profilleri ile uyum göstermiştir.

P22 yerel izolatu için manuel testler sonucunda önerilen tür adı *B. megaterium* iken, ticari kitlerin sonuçlarına göre *B. coagulans/B. cereus*, 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre ise *B. flexus/B. megaterium*'dur. P22'nin ARDRA *MboII* kesim profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans* referans soylarının kesim profilleri ile uyum gösterirken, *CfoI* ve *Sau3AI* kesim profillerinin referans soyların hiçbirisinin profilleri ile örtüşmediği görülmüştür.

P24 yerel izolatu için ticari kitlerin sonucuna göre önerilen tür adı *B. licheniformis/ B. amyloliquefaciens*'tir. Manuel testler ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre ise *B. licheniformis*'tir. P24'ün ARDRA *Sau3AI* kesim profili referans soyların hiçbirisinin profili ile uyum göstermezken, *CfoI* profilinin 13A10 *B. sphaericus*, *MboII* profilinin ise 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans* referans soylarının kesim profilleri ile örtüştüğü belirlenmiştir.

A3 yerel izolatu için manuel testler ve ticari kitlerin sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre ise *B. subtilis/B. mojavensis/B. axarquiensis*'tir. A3'ün ARDRA *CfoI* ve *Sau3AI* kesim profilleri hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *MboII* kesim profilinin 27E3 *B. subtilis* "natto" referans soyunun profili ile örtüştüğü görülmüştür.

A4 yerel izolatu için ticari kitlerin sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. cereus*'tur. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre de A4 izolatu *B. cereus* grubuna dahil görünmektedir. A4 izolatının ARDRA *CfoI* kesim profili hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *MboII* profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans*, *Sau3AI* profili ise 6A5 *B. cereus* referans soyunun kesim profili ile örtüşmüştür.

A7 yerel izolatu için ticari kitlerin sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre ise *B. subtilis/B. axarquiensis*'tir. A7'nin ARDRA *Sau3AI* kesim profili hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *CfoI* profilinin 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto" ve 9A20 *B. stearothermophilus*, *MboII* profilinin ise 27E3 *B. subtilis* "natto" referans soyunun profili ile örtüştüğü belirlenmiştir.

A18 yerel izolatu için manuel testler sonucunda önerilen tür adı *B. subtilis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. amyloliquefaciens/B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre A18 yerel izolatu için önerilen tür adı *B. subtilis/B. mojavensis/B. axarquiensis*'tir. ARDRA'da A18'in *Sau3AI* kesim profili hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *CfoI* profilinin 1A1 *B. subtilis*, 27E3 *B. subtilis* "natto" ve 9A20 *B. stearothermophilus*, *MboII* profilinin ise 27E3 *B. subtilis* "natto" referans soyunun profili ile örtüştüğü görülmüştür.

A23 yerel izolatu için manuel testler sonucunda önerilen tür adı *B. subtilis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre ise *B. amyloliquefaciens/B. subtilis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre A18 yerel izolatu için önerilen tür adı da *B. subtilis*'tir. A23'ün ARDRA *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* kesim profillerinin referans soylara ait kesim profillerinin hiçbirisi ile uyum göstermediği görülmüştür.

A26 yerel izolatu için manuel testler sonucunda önerilen tür adı *B. stearothermophilus*, ticari kitlerin sonuçların göre ise *B. licheniformis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre verilen tür adları *B. subtilis/B. velezensis*'tir. A26'nın ARDRA *CfoI* kesim profili hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *MboII* profili 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans*, *Sau3AI* profili ise 9A20 *B.*

*stearothermophilus* ve 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soylarının profilleri ile örtüşmüştür.

A28 yerel izolatı için manuel testler sonucunda önerilen tür adı *B. subtilis*/*B. licheniformis*, ticari kitlerin sonuçlarına göre de *B. licheniformis*'tir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre önerilen tür adı *B. subtilis*'tir. ARDRA'da A28'in *CfoI* kesim profili hiçbir referans soyun profili ile uyum göstermezken, *MboII* profilinin 6A5 *B. cereus* ve 61A1 *B. coagulans*, *Sau3AI* profilinin ise 9A20 *B. stearothermophilus* ve 10A5 *B. amyloliquefaciens* referans soylarının profilleri ile örtüştüğü belirlenmiştir.

#### 4.2.2. *rrn*-ARDRA

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen 16S-PCR'larda istenilen verim ve saflıkta DNA elde edilirken *rrn*-PCR çalışmalarında özellikle her bir soy için gerçekleştirilen birkaç tüplük toplu üretimlerde bazı soylarda ~1,5 kbç ikinci bir ürünün çoğaldığı görülmüş, ayrıca *rrn*-PCR'da üretimi hedeflenen ~4,5 kbç ürünün verimi bazı soylar için çok düşük bulunmuştur. Yapılan ardışık denemelerde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiş, bu nedenle, *rrn*-PCR'da ürün veriminin ve özgüllüğünün arttırılabilmesi amacıyla çeşitli yaklaşımlar denenmiştir.

Ekman (1999) PCR optimizasyonunun DNA özütleme yöntemi ile başladığını belirtmektedir. İdeal özütleme süreci daha sonra PCR reaksiyonunu inhibe edebilecek maddeleri ortamdan uzaklaştırmalı ve bu tip inhibitörlerin yenilerini ortama eklememelidir. Bazen DNA'nın kendisi de PCR inhibitörü olarak davranabilmektedir; çünkü yüksek derişimlerde genomik DNA denatürasyon basamağında kendi üzerine bağlanabilmekte ve bu da primerlerin bağlanmasını zorlaştırmaktadır (Ekman, 1999).

*rrn*-PCR üretimini hedefleyen optimizasyonlarda farklı genomik DNA özütleme yöntemleri denenmiştir. Ancak, genomik DNA özütlemesi için kullanılan

farklı yöntemlerin hiçbirisi tek başına tüm soylar için istenilen verimin ve saflığın elde edilmesini sağlayamamıştır. Bu nedenle yapılan ilk çalışmalarda, en iyi verimin elde edildiği genomik DNA özütleri yöntem gözetilmeksizin kullanılmıştır.

Genomik DNA özütlemesi için kullanılan yöntemlerden birisi olan CTAB yönteminde özütlenen DNA verimi yüksek olmakla birlikte, preparatlar kirli bulunmuştur. Ayrıca bu yöntemle elde edilmiş olan genomik DNA'lar -20 °C'ta uzun süre saklandığında çökelti oluştuğu gözlenmiştir. Bu kirliliğin PCR çalışmalarını olumsuz etkileyebileceği düşünüldüğü için farklı genomik DNA özütleme yöntemleri denenmiştir. Bu amaçla denenilen iki yöntemden birisi olan hızlı yöntemde elde edilen genomik DNA veriminin TEST yöntemi ile elde edilenden daha yüksek olduğu gözlenmiş, ayrıca hızlı yöntem ile özütlenen genomik DNA'lar daha temiz bulunmuştur. Ancak -20 °C'ta saklandığında hızlı yöntem ile izole edilmiş olan genomik DNA'larda da giderek belirginleşen ve çözilemeyen bir çökelti oluşumu gözlenmiştir. Hızlı yöntem ile alınan verimi daha da arttırabilmek amacıyla daha uzun süreli kültürlerle yapılan çalışmalar DNA veriminde beklenen iyileşmeyi sağlamamıştır.

Kullanılan bu üç yöntem ile de istenilen verimde ve saflıkta genomik DNA elde edilemediği için ticari bir kit bu amaçla kullanılmıştır. Kit ile izolasyonun avantajı kültür süresinin ve protokolün kısa olması, fenol basamağı içermemesi, kit ile sağlanmış olan çözeltilerin kullanımının elde hazırlanan çözeltilerden kaynaklanabilecek hataları (tartım, derişim, sterilizasyon hataları) saf dışı bırakması, 1 ml kültür için elde edilen genomik DNA veriminin diğer yöntemlere göre soyların çoğunda daha yüksek olması ve özütlenen genomik DNA'nın diğer yöntemlerle elde edilenlere göre daha temiz olmasıdır. Zaman ve emekten kazanım sağlamakla birlikte kit kullanımının getirdiği maddi yük de göz ardı edilmemelidir. Bununla birlikte, kit ile elde edilen genomik DNA veriminin yüksek ve saflığının diğer yöntemlerle elde edilenlerden iyi bulunması nedeniyle moleküler tiplendirme amacıyla yapılan çalışmalarda bu yöntem ile elde edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır.

Bir PCR reaksiyonu sonucunda oluşacak ürünleri kontrol etmek, temel olarak başlangıçtaki ısıtma ve ilk birkaç döngü sırasında gerçekleşen olayları kontrol

etmekle olasıdır (Ekman, 1999; Bej ve Mahbubani, 1992). İlk döngüler sırasında ürünler genomik DNA'dan oluşturulurken, daha sonraları temel olarak diğer PCR ürünlerinden oluşturulmaktadır. Bu nedenle, genomik DNA denatürasyonu ve ürün uzatılması ilk döngülerde gereğince tamamlandığında verimli bir çoğalma gerçekleştirilebilmektedir. Örneklerin başlangıçta birkaç santigrat dereceden (buzda +4 °C) denatürasyon sıcaklığına (94-96 °C) ısıtılması sırasında özgün olmayan ürünlerin oluşma riski çok büyüktür; çünkü bu sırada primerler spesifik olmayan bölgelere bağlanabilmekte ve DNA polimeraz enzimi aktif olmaya başlamaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla sıcak-başlangıç teknikleri geliştirilmiştir (Ekman, 1999; Bej ve Mahbubani, 1992). Bu çalışmada da örnekler buzdan alınarak önceden 94°C'a ısıtılmış olan PCR cihazına yerleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ön denatürasyon sonrasında örnekler cihazdan çıkarılarak DNA polimeraz enzimi eklenmiş ve tekrar cihaza yerleştirilerek program kaldığı yerden sürdürülmüştür.

İlk döngülerde reaksiyonun özgülüğünü kontrol etmek amacıyla tasarlanan farklı bir teknik de "touch-down PCR'dır (Ekman, 1999). Bu yöntemde ilk döngülerde yüksek bir bağlanma sıcaklığı kullanılmaktadır; böylece bu döngüler sırasında az sayıda ama özgül ürünler oluşmaktadır. İlerleyen döngülerde bağlanma sıcaklığı kademeli olarak primerlerin optimal bağlanma sıcaklığına düşürülmektedir; bu da çoğunlukla ilk döngülerde oluşan PCR ürünlerinden verimli bir çoğalmanın gerçekleşmesini sağlamaktadır (Ekman, 1999). Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen "touch-down PCR" denemelerinde bazı soylar için ~1,5 kbç PCR ürününün çoğalması engellenememiş, ayrıca ürün verimi tüm soylar için iyileştirilememiştir.

PCR reaksiyonunda  $MgCl_2$  iyon derişiminin arttırılması veya azaltılması, yaklaşık % 50 GC içerikli yüksek  $T_m$  değerine sahip primerlerin kullanımı ve her bir primerin 3' ucunda en az 5-6 bazlık rastgele bir baz dağılımı gibi yöntemler de özgün olmayan DNA ürünlerinin çoğalmasının engellenmesi için kullanılabilmektedir (Bej ve Mahbubani, 1992).

Bu çalışmada kullanılan primerlerin  $T_m$  değerleri standart denklem kullanılarak hesaplanmış ve PCR reaksiyonu için kullanılan bağlanma sıcaklığının değiştirildiği

denemelerde bu değerler göz önünde bulundurulmuştur. Bazı soylar için yüksek bağlanma sıcaklıklarında daha düşük sıcaklıklarda gözlenen ~1,5 kbç PCR ürününün çoğalmadığı görülmekle birlikte, çok yüksek bağlanma sıcaklıkları, hedeflenen ~4,5 kbç ürünün verimini de dramatik şekilde azaltmıştır.

Bir PCR reaksiyonunda magnezyum iyonunun derişiminin arttırılması, bağlanma sıcaklığının düşürülmesi ile aynı etkiyi göstermektedir. Optimum derişim deneysel yollarla bulunmakta, ancak standart olarak kullanılan 1,5 mM genellikle iyi çalışmaktadır (Ekman, 1999). Bu tez çalışması kapsamında farklı DNA polimeraz enzimleri denenmekle birlikte magnezyum iyon derişimi 1,5 mM’da sabit tutulmuştur. İlk çalışmalarda kullanılan *Taq* DNA polimeraz enzimi (Roche) ile elde edilen PCR ürününün verimi yeterli bulunmadığı için farklı *Taq* DNA polimeraz enzimleri (Takara *Taq* ve Promega-Go *Taq*) ile yapılan paralel çalışmada enzimlerin verimleri karşılaştırılmıştır. Go *Taq* DNA polimeraz ile elde edilen PCR ürününün verimi diğer enzimlere göre daha iyi bulunmuş ve sonraki çalışmalarda bu enzim kullanılmıştır. Diğer enzimlerle gerçekleştirilen *rrn*-PCR’larda Go *Taq* DNA polimeraz ile yapılan çalışmalarda görülen yaklaşık 1,5 kbç özgün olmayan ürünün yanı sıra daha büyük ya da daha küçük PCR ürünleri de elde edilmiş aynı zamanda istenen ürünün verimi de düşmüştür.

PCR reaksiyonunda uzama basamağının süresinin uzatılması ürün verimini olumlu bir şekilde etkileyebileceğinden (Ekman, 1999), sentez süresinin uzatıldığı PCR’lar gerçekleştirilmiş, sürenin arttırılmasının ürün verimini arttırdığı gözlenmekle birlikte özgün olmayan PCR ürününün çoğalması engellenememiştir.

PCR’da sorunsuz çalışan primerlerin bazen bilinmeyen nedenlerle çalışmadığı görülmektedir (Ekman, 1999). Bu sorun, primerlerin tekrarlayan dondurup-çözme döngülerine maruz kalması nedeniyle göreceli olarak kararlı ikincil yapıların oluşumundan ya da sentezin kendisinden, primer yıkımından kaynaklanması olasıdır. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ilk *rrn*-PCR reaksiyonlarında verimin düşük olması ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilememesi nedeniyle kullanılan primerler yeniden sentezlettirilerek daha sonraki çalışmalara bu primerlerin eşleniği olan MT3 ve MT4 primerleri ile devam edilmiştir. Ancak, istenen PCR ürünün

veriminde bir artış gözlenmemesinin yanı sıra özgül olmayan PCR ürününün çoğalması da engellenememiştir.

Yerel izolatlar ile referans soyların *rrn* operonlarının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3A1* enzimleriyle kesimi sonucunda elde edilecek bant profillerinin karşılaştırılmasının amaçlandığı ARDRA çalışmalarında kullanılmak üzere yapılan *rrn* PCR'larda, buraya kadarki bölümlerde anlatılan ve yapılan çeşitli optimizasyon çalışmaları ile üstesinden gelinemeyen bir PCR bulaşı ile karşılaşılmasıdır. 4,5 kbç'lik özgül PCR ürünlerinin yanında çok az miktarda da olsa bir diğer ürünün çoğaldığı koşullarda enzim kesimleri sonrasında elde edilen bant profillerinde, 1,5 kbç ürünün tam ya da kesilmiş halde gözlenmesi, referans soyların bant profilleri ile yapılan karşılaştırmalar sırasında yanıltıcı olacağından, ARDRA çalışmaları ayrıca seçilen bazı soyların jelden izole edilen 4,5 kbç özgül PCR ürünleri ile de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler, hem buraya kadar yapılan tiplendirme çalışmalarının verileri hem de izolatların daha önce tamamlanan tezler kapsamında belirlenen yetenekleri gözetilerek seçilmiştir. İlk ARDRA denemelerinde *rrn* PCR ürünü elde edilemediği için A26 soyu çalışmaya alınmamıştır.

Her iki *rrn*-ARDRA denemesinde de gerek gözle gerekse görüntüleme sisteminin yazılımı aracılığı ile net olarak ayırt edilemeyecek kadar silik ve difüze olmuş bantlar gözlenmiştir. Görüntüleme cihazının zayıf bantları saptamadaki yetersizliği ve bu bantların manuel olarak analize dahil edilmesi hataya açık bir süreçtir. Bu bantların değerlendirmeye alınıp alınmaması araştırmacıya ait bir karardır ve bu konuda genel olarak kabul edilmiş bir kriter bulunmamaktadır.

Schlegel ve arkadaşları (2003) *Streptococcus* cinsine ait türlerin tanımlanması amacıyla yaptıkları çalışmada ARDRA yöntemini kullanmışlar ve çalışma sonunda elde ettikleri bant profillerini değerlendirirken bir bant eksikliği veya fazlalığı gibi küçük farkları dikkate almamışlardır. Aynı çalışmada, teorik kesimlerle belirlenen bantlar ile pratikte elde edilen bantlar karşılaştırıldığında bazı ekstra bantların elde edilmiş olduğu görülmüştür. Bu ekstra bantların oldukça silik olmasını, *rrn*

operonunun sadece bir veya birkaç kopyasının DNA dizisinin suş spesifik değişimlerini taşıma olasılığına bağlamışlardır.

L1 yerel izolatu için, özgül olmayan PCR ürününün varlığı dikkate alınmaksızın gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında *Mbo*II enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ve *B. cereus* soyları ile % 40 homoloji saptanırken, jelden izole edilmiş olan özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında *Cfo*I enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* “natto” ile % 90 ve *B. pumilus* ile % 82 benzerlik, *Sau*3A1 enzimine ait dendogramda ise *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* ile % 35 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

*rrn*-PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA’da *Mbo*II enzimine ait dendogramda L3 yerel izolatu için *B. pumilus* ve *B. cereus* soyları ile % 40 homoloji saptanmış olup, bu soy jelden izole *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA çalışmasına dahil edilmemiştir.

Özgül olmayan PCR ürünü varlığında gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA’da *Mbo*II enzimine ait dendogramda L5 yerel izolatu *B. pumilus* ve *B. cereus* soylarına % 40 benzer bulunmuştur. Bu soy saflaştırılan 4,5 kbç PCR ürünü ile yapılan ARDRA’da kullanılmamıştır.

*rrn*-PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA’da *Mbo*II enzimine ait dendogramda L6 yerel izolatu ile *B. pumilus* ve *B. cereus* soyları arasında % 40 homoloji saptanmıştır. L6 izolatu jelden izole *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen çalışmaya alınmamıştır.

L8 yerel izolatu için, özgül olmayan PCR ürünü varlığında gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında *Cfo*I enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 67 ve *B. subtilis* ile % 40 benzerlik saptanırken, *Mbo*II enzimine ait dendogramda *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 42, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* ile % 35 benzerlik

görülmüştür. L8 izolatu jelden izole *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasına dahil edilmemiştir.

L10 yerel izolatu, özgül olmayan PCR ürününün varlığı dikkate alınmaksızın gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 67 ve *B. subtilis* ile % 40, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 42, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* ile % 35, *Sau3A1* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis* “natto” ile % 50, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. pumilus* ile % 30 benzer bulunmuştur. Saflaştırılmış özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. subtilis* ile % 45, *B. megaterium* ile % 38 benzerlik saptanırken, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* ile % 40 benzerlik görülmüştür.

*rrn*- PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA’da L13 izolatu, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 100 benzerlik gösterirken, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. subtilis* ile % 92, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 87 benzerlik göstermiştir. Bu soy jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA çalışmasında kullanılmamıştır.

L14 yerel izolatu, gerçekleştirilen saf olmayan *rrn*-PCR ürününün kullanıldığı ARDRA çalışmasında *MboII* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ve *B. cereus* ile % 40 benzerlik göstermiştir. L14 izolatu saflaştırılmış 4,5 kbç PCR ürünü ile yapılan ARDRA’ya dahil edilmemiştir.

L15 yerel izolatu için, *rrn*-PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA’da *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ve *B. megaterium* ile % 60, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. cereus* ve *B. pumilus* ile % 52 benzerlik saptanmıştır. Jelden izole edilmiş olan özgül *rrn*-PCR ürününü ile yapılan *rrn*-ARDRA çalışmasında ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* “natto” ile % 90, *B. pumilus* ile % 82 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* “natto” ve *B. coagulans* ile % 40

benzerlik ve *Sau3A1* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis* “natto”, *B. megaterium* ve *B. coagulans* ile %52 benzerlik gözlenmiştir.

L16 yerel izolatu, saflaştırılmamış *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA’da *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 70, *B. subtilis* ile % 40 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* “natto” ve *B. subtilis* ile % 42 benzerlik, *Sau3A1* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis* “natto” ile % 60, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* ve *B. subtilis* ile % 30 benzerlik göstermiştir. Bu soy jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA’ya dahil edilmemiştir.

Özgül olmayan 1,5 kbç PCR ürünü varlığında yapılan *rrn*-ARDRA çalışmasında L21 yerel izolatu için, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ile % 58, *B. licheniformis* ve *B. coagulans* ile % 35 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. pumilus* ve *B. cereus* ile % 40 benzerlik gözlenmiştir. Saflaştırılmış olan 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA’da ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* “natto” ile % 90, *B. pumilus* ile % 82 benzerlik saptanırken, *Sau3A1* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ile % 50 benzerlik görülmüştür.

*rrn*-PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA çalışmasında L22 yerel izolatu, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ile % 60, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 50 ve *B. subtilis* ile % 40 benzerlik gösterirken, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ile % 62, *B. cereus* ile % 52 benzerlik bulunmuştur. L22, jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA çalışmasında kullanılmamıştır.

Özgül olmayan PCR ürününün varlığı dikkate alınmaksızın yapılan *rrn*-ARDRA’da P17 yerel izolatu için, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ile % 92, *B. megaterium* ile % 60 benzerlik saptanırken, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ve *B. pumilus* ile % 52 benzerlik saptanmıştır. Jelden izole edilmiş olan özgül *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA’da ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B.*

*firmus* ile % 87 ve *B. cereus* ile % 80 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ile % 82, *B. firmus* ile % 42 benzerlik gözlenirken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. firmus* ile % 80, *B. cereus* ile % 65 benzerlik görülmüştür.

P19 yerel izolatu için, özgül olmayan PCR ürününün varlığı dikkate alınmaksızın gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearrowthermophilus* ile % 40, *B. licheniformis* ve *B. coagulans* ile % 35 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ve *B. cereus* ile % 40 benzerlik saptanırken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. licheniformis* ile % 30 benzerlik saptanmıştır. Jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA çalışmasına P19 izolatu dahil edilmemiştir.

P20 yerel izolatu *rrn*-PCR ürünlerinin doğrudan kullanıldığı ARDRA'da *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 70, *B. subtilis* ile % 40 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto”, *B. amyloliquefaciens* ile % 42, *B. stearrowthermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* ile % 35 benzerlik gösterirken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis* “natto” ile % 60, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* ve *B. pumilus* ile % 30 benzerlik göstermiştir. Ancak jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında P20 için de diğer soylarla aynı miktarda genomik DNA kesilmiş olmasına karşın çok silik bant profilleri elde edilmiştir. Bu nedenle, dendogramların çizimi sırasında *MboII* enzimi ile hiçbir bant seçilemezken, diğer enzimlerin profillerinde seçilebilen birkaç bant doğru bir değerlendirme yapmak için yetersizdir.

P21 yerel izolatu, özgül olmayan PCR ürününün varlığı dikkate alınmadan yapılan *rrn*-ARDRA çalışmasında *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearrowthermophilus* ile % 40, *B. licheniformis* ve *B. coagulans* ile % 35 benzerlik gösterirken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda *B. licheniformis* ile % 30 benzer bulunmuştur. Saflaştırılmış özgül 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA'da ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. firmus* ve *B. cereus* ile % 50 benzerlik belirlenmiştir.

Özgül olmayan 1,5 kbç ürünü de içeren *rrn*-PCR ürünlerinin kullanıldığı ARDRA çalışmasında P22 yerel izolatu için, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. megaterium* ile % 82, *B. cereus* ile % 60 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ve *B. cereus* ile % 40 benzerlik görülürken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda *B. stearrowthermophilus* ile % 40 benzerlik saptanmıştır. Saflaştırılan 4,5 kbç PR ürünü ile yapılan ARDRA'da ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. megaterium* ile % 90 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. stearrowthermophilus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* “natto” ve *B. coagulans* ile % 40 benzerlik bulunurken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda *B. megaterium* ile % 70, *B. subtilis* “natto” ile % 62 ve *B. coagulans* ile % 55 benzerlik belirlenmiştir.

P24 yerel izolatu, saf olmayan *rrn*-PCR ürünlerinin kullanıldığı ARDRA çalışmasında *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. licheniformis* ile % 60, *B. coagulans* ile % 58 benzerlik gösterirken, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. licheniformis* ile % 30 benzer bulunmuştur. P24, jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasına alınmamıştır.

Özgül olmayan PCR ürünü varlığında gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında A3 yerel izolatu, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ile % 70, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 50, *B. subtilis* ile % 35 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ile % 100, *B. subtilis* ve *B. subtilis* “natto” ile % 87 benzer bulunurken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis* ile % 70, *B. amyloliquefaciens* ile % 50 ve *B. subtilis* “natto” ile % 30 benzerlik göstermiştir. Saflaştırılmış 4,5 kbç *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA çalışmasına A3 yerel izolatu dahil edilmemiştir.

A4 yerel izolatu için, saf olmayan *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA'da *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ile % 100, *B. megaterium* ile % 60 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ve *B. pumilus* ile % 52 benzerlik saptanırken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. cereus* ile % 70 ve *B. sphaericus* ile % 30 benzerlik görülmüştür. Jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA'da ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. firmus* ile % 72, *B. cereus* ile % 80 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. cereus* ile % 72, *B.*

*firmus* ile % 42 benzerlik belirlenirken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. firmus* ile % 80 ve *B. cereus* ile % 65 benzerlik gözlenmiştir.

1,5 kbç PCR ürününün varlığına bakılmaksızın yapılan *rrn*-ARDRA'da A7 yerel izolatu, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. pumilus* ile % 82, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* “natto” ile % 50, *B. subtilis* ile % 35 benzerlik gösterirken, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto” ve *B. amyloliquefaciens* ile % 42, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* ile % 35 benzer bulunmuştur. Bu soy jelden izole edilmiş olan özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA'ya dahil edilmemiştir.

Saf olmayan *rrn*-PCR ürünü ile yapılan ARDRA'da A18 yerel izolatu için, *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ile % 58, *B. licheniformis* ve *B. coagulans* ile % 35 benzerlik saptanırken, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto” ve *B. amyloliquefaciens* ile % 42, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* ile % 35 benzerlik bulunmuştur. Saflaştırılmış özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen ARDRA'da A18 yerel izolatu kullanılmamıştır.

A23 yerel izolatu, *rrn*-PCR ürünlerinin doğrudan kullanıldığı ARDRA çalışmasında *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. Stearothermophilus*'e % 58, *B. licheniformis* ve *B. Coagulans*'e % 35 benzerlik gösterirken, *MboII* enzimine ait dendogramda ise *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto” ve *B. Amyloliquefaciens*'e % 42, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. Megaterium*'a % 35 benzer bulunmuştur. A23 izolatu, saflaştırılan 4,5 kbç PCR ürünü ile yapılan ARDRA çalışmasına alınmamıştır.

*rrn*-PCR ürünleri ile doğrudan yapılan ARDRA'da A26 yerel izolatu için, her üç enzime ait dendogramlarda kayda değer bir benzerlik saptanamamıştır. Jelden izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA çalışmasında ise *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. coagulans* ile % 72, *B. amyloliquefaciens* ile % 62 benzerlik bulunmuştur.

A28 yerel izolatu için, saf olmayan *rrn*-PCR ürünleri ile yapılan ARDRA'da *CfoI* enzimine ait dendogramda *B. stearothermophilus* ile % 40, *B. licheniformis* ve *B. coagulans* ile % 35 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. sphaericus* ve *B. firmus* ile % 30 benzerlik saptanırken *Sau3AI* enzimine ait dendogramda ise *B. licheniformis* ile % 30 benzerlik saptanmıştır. Jel izole özgül *rrn*-PCR ürünü ile gerçekleştirilen *rrn*-ARDRA'da *CfoI* dendogramında *B. subtilis* ile % 90, *B. megaterium* ile %40 benzerlik, *MboII* enzimine ait dendogramda *B. amyloliquefaciens* ile % 82, *B. subtilis* ile % 77 benzerlik görülürken, *Sau3AI* enzimine ait dendogramda *B. subtilis* ile % 62, *B. amyloliquefaciens* ile % 52 benzerlik bulunmuştur.

Her iki *rrn*-ARDRA denemesinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde sadece A4 izolatının tüm enzimlerle her iki denemede de *B. cereus* referans soyu ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmüş, diğer izolatların bir veya birkaç enzim profili açısından hiçbir referans soy ile dikkate değer bir benzerlik göstermediği ya da değişen benzerlik yüzdeleri ile birden fazla soy ile benzeştiği belirlenmiştir. 16S rDNA dizi analizleri ile uyum gösteren soylar arasında L10 izolatının *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto” ve *B. amyloliquefaciens* ile, P17 izolatının *B. cereus* ve *B. firmus* ile ve P22'nin *B. megaterium* ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. P20 izolatı için jelden izole edilerek kullanılan özgül PCR ürünü ile gerçekleştirilen denemede her üç enzim profili için herhangi bir soy ile benzerlik bulunamazken, özgül olmayan PCR ürünü dikkate alınmaksızın gerçekleştirilen denemede en yüksek benzerliği *B. subtilis*, *B. subtilis* “natto” ve *B. amyloliquefaciens* ile gösterdiği görülmüştür. Ancak bu sonuç 16S rDNA dizi analizi ile uyumlu bulunmamıştır. P20'nin uygulanan her teknik ile farklı sonuçlar veriyor olması bu izolatın yeni bir soy olma olasılığını güçlendirmekte, ya da elimizde bulunan referansların dışında bir *Bacillus* türü olduğunu düşündürmektedir.

*rrn*-ARDRA ile elde edilen verilerle hazırlanan dendogramlarla tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamamıştır. *rrn*-ARDRA analizinin Laboratuvarımızda rutin olarak uygulanabilmesi için optimizasyon çalışmaları devam etmektedir. Hem ARDRA hem de “ribotyping” profillerinin değerlendirilmesi ve dendogramların hazırlanması aşamasında kullanılmak üzere Fransa Pasteur Enstitüsü

Enterobacteriaceae Ünitesi'nden, Prof. Dr. Patrick Grimont tarafından hazırlanan Taxotron yazılımı sağlanmış olup, yalnızca Machintosh bilgisayarda kullanılabilen bu yazılım, uyumlu bir bilgisayarın alımının ardından yapılacak çalışmalarda denenecektir.

### 4.3. Ribotyping

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen “ribotyping” çalışmasında 25 yerel *Bacillus* izolatu, 11 referans *Bacillus* türünün genomik DNA özütleri ve belirteç olarak kullanım amacıyla *Xenorhabdus* sp. CIP 105189 genomik DNA'sı *Hind*III, *Cla*I ve *Eco*RV enzimleri ile ayrı ayrı sindirildikten sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA bantları vakumlu transfer cihazı kullanılarak naylon filtre üzerine aktarıldıktan sonra DIG-dUTP ile işaretlenmiş OligoMiks-5 kullanılarak hibritlenmiştir. Hibridizasyon sonrasında AP-konjuge anti-DIG Ab kullanılarak immüno-blot gerçekleştirilmiş ve naylon filtreler NBT+BCIP ile boyanmıştır. *Cla*I ve *Eco*RV enzimleri ile yalnızca *B. pumilus* izolatlarının bulunduğu bölgede gözlenen bantlar sistemin işlediğini göstermekle birlikte verilerin analiz edilebilmesi için yeterli değildir. Kullanılan oligonükleotit kuyruklama kitinin süresinin dolmuş olması sistemin beklenen etkinlikte çalışmamasına neden olabileceğinden OligoMiks-5 bir kez de güçlü bant profilleri verdiği bilinen [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP radyoizotopu ile işaretlenerek kullanılmıştır.

Jelde ayırma dayalı tekniklerde sınırlı sayıda bant elde edilmesi, profillerin yorumlanmasında kolaylık sağlamaktadır (Lefresne ve ark., 2004). Bu tanıma uyan “Ribotyping” yönteminde belirli fragmanlar, yorumlanması daha kolay olan daha az karmaşık profiller elde etmek için “prob”larla belirginleştirilmektedir (Satokari ve ark., 2003). “Ribotyping”de kullanılan “prob”lar rRNA genlerinin veya bunların aralayıcı bölgelerinin kısmi dizilerinden tüm rRNA operonuna kadar değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak bu yöntemin bir dezavantajı PCR temelli tiplendirme yöntemlerine oranla daha fazla DNA gerektirmesidir (Wang ve ark., 1999). Ayrıca, “ribotyping” yönteminin taksonomik bir araç olarak kullanılabilmesi için tarif edilmiş bütün türleri ve aynı zamanda aynı türe ait birkaç suş profilini içeren bir veri

tabanı gereklidir. Çünkü bir tür, “çekirdek” olarak adlandırılabilen bir dizi bandı içeren bir veya birkaç farklı profil gösterebilmektedir (Riou ve ark., 1997). Busch ve Nitschko’nun (1999) da belirttiği üzere rRNA genleri bakteriyel kromozomlarda birkaç kopya halinde bulunmakta, bu nedenle rRNA’ya özgü problemlerle hibridizasyon sadece rRNA gen dizilerini içeren kromozomal parçaları açığa çıkarmaktadır. Hibridizasyon bantlarının sayısı bant motiflerinin basit bir şekilde analiz edilebilmesine olanak sağlayacak kadar azdır. Pryce ve çalışma arkadaşlarının (1999) da belirttiği üzere analiz için seçilmiş olan restriksiyon enzimleri, farklı yerlerden izole edilen bakteriyel suşlar arasında ve yakın akraba olan suşlar arasında yeterli ayırım sağlayabilmelidir. Bununla birlikte, tür tanımlaması için seçilmiş olan enzim, suşa özgül bantların sayısını en alt düzeyde sınırlarken, türler arasında ayırım yapabilecek elverişli bantlar da sağlamalıdır. Literatürde “ribotyping” tekniğinin çeşitleri bulunmakta olup, bu farklı uygulamalar genellikle farklı restriksiyon enzimlerinin ve Southern Blot sürecinde alternatif saptama yöntemlerinin (kolorimetrik veya radyoaktif) kullanımını veya ribotip profillerinin analizi ile verilerin yorumlanmasındaki çeşitliliği kapsamaktadır (Scott ve ark. 2002).

Regnault ve arkadaşları (1997) gerçekleştirdikleri çalışmada bakterilerin filogenetik pozisyonlarını gözetmeksizin iyi boyanmış profiller verecek ve 16S rRNA ve 23S rRNA genleri boyunca dağılmış şekilde hibridize olacak oligonükleotit “prob”ları geliştirmişler ve beş oligonükleotitten oluşan OligoMiks-5 olarak adlandırdıkları bir “prob” setinin kullanıldığı bir “ribotyping” sürecini tarif etmişlerdir. Çeşitli “prob” elde etme ve işaretleme denemelerinde en iyi sonuçlar OligoMiks-5’teki beş oligonükleotitin “DIG Oligonükleotit Kuyruklama Kiti (Bohinger, Mannheim, FRG)” kullanılarak 3’ uçlarından DIG-dUTP ile işaretlenmiş olduğu çalışmada elde edilmiştir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen “ribotyping” çalışmasında da öncelikle ticari olarak sentezletilmiş OligoMiks-5 DIG-dUTP ile işaretlenerek kullanılmıştır. *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA’ların DIG-dUTP ile işaretli Oligomiks-5 ile hibritlenen filtresinde yalnızca 16S rDNA’nın işaret aldığı görülmüş ve sistemin çalıştığı sonucuna varılmıştır. *EcoRV* fragmanlarının bulunduğu filtrede *B. pumilus* soylarının bulunduğu bölgede birkaç kuyuda, *ClaI* fragmanlarının bulunduğu filtrede ise yine *B. pumilus*’ların olduğu

bölgede daha geniş bir alanda daha güçlü bant profilleri elde edilmiştir. Ancak elde edilen bantlar verilerin değerlendirilmesi için yeterli değildir.

( $\gamma$ -<sup>33</sup>P)-ATP ile işaretli OligoMiks-5 kullanılarak yinelenen “ribotyping” sonucunda elde edilen otoradyografide *Cla*I fragmanlarının bulunduğu filtrede herhangi bir işaret gözlenmezken, *Eco*RV ve *Hind*III fragmanlarının bulunduğu filtrelerde 16S rDNA’da ve *Hind*III fragmanlarında, ayrıca, *B. pumilus* soylarının bulunduğu bölgede işaret görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar yerel izolatların şu an için bu yöntemle tiplendirilebilmesini olası kılacak derecede açık değildir. Ancak “ribotyping” yönteminin EMG laboratuvarında rutin olarak uygulanabilmesine yönelik optimizasyon çalışmaları sürmektedir.

Pryce ve çalışma arkadaşları (1999), “ribotyping” yöntemlerinin çoğunda radyo-işaretli 16S ve 23S rRNA “prob”larının kullanıldığını bildirmiştir. Radyo-işaretlemenin laboratuvar ortamında rutin olarak kullanıma elverişsiz olması nedeniyle çalışmalarında “ribotyping” için izotopik olmayan, enzim-işaretli DNA “prob”ları kullanmışlardır. Bu çalışmada *E. coli* 16S rRNA geninin 8-820 pozisyonlarına karşılık gelen iki 16S rDNA probu, *E. coli* ve *E. faecalis* DNA örneklerinden PCR ile sentezlenmiş ve sonrasında bir yaban turbu peroksidazı-polietilenamin kompleksi ile doğrudan bağlanarak işaretlenmiştir. Bir HRP (horseradish peroxidase) kompleksine doğrudan bağlamayı izleyen hibridizasyon ve arttırılmış kemilüminesans ile saptama, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ile işaretlemenin hassaslığına yakın, aynı zamanda uygun maliyetli bir alternatif oluşturmakta ve “ribotyping”in laboratuvarında çok daha kolay bir şekilde ve rutin olarak gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Evrensel “prob”lar ile elde edilen silik bantlar veya deneysel hatadan kaynaklanan bantlar “ribotyping” sonuçlarının yorumlanmasını karmaşık hale getirmektedir. Buna ek olarak restriksiyon profillerinin tür içindeki varyasyonları veya tamamlanmamış enzim sindirimi sonucunu elde edilen sonuçlar da yorumlamayı zorlaştırmaktadır (Busch ve Nitschko, 1999).

Waterhouse ve Glover (1993) çalışmalarında, *Bacillus* için gerçekleştirdikleri rDNA hibridizasyon profillerinin kullanılan DNA hazırlama yöntemine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini gözlemlemiştir. CTAB yöntemi ile izole edilen DNA'nın *EcoRI* restriksiyon profilinde prob ile hibridizasyon sonucunda teorik olarak doğru olan iki fragman saptanırken, organik özütleme ile elde edilen DNA'nın profilinde fazladan iki fragmanın rutin olarak elde edildiği gözlenmiştir. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen deneylerin sonucunda Waterhouse ve Glover (1993) otoradyograflarda fazladan bantların varlığının veya yoklunun DNA özütlemesi yöntemi ile ilişkili olabileceğini ve bunun da protein olmayan bir molekülün hala DNA ile ilişkide olduğuna ve belirli restriksiyon enzimi sitlerini sindirimden koruduğuna işaret ettiğini önermişlerdir.

CTAB yöntemi ile DNA özütlemesinde polisakkaritler (örneğin peptidoglikan) uygulanan tuz konsantrasyonları aralığı boyunca çözünür kalır ve bu nedenle özütleme sonucunda polisakkaritten arınmış DNA elde edilmektedir. *B. subtilis*'te ribozomal genler DNA replikasyon orijininin yakınında kümелendiği ve hem orijinin hem de DNA replikasyonunun sonlandığı bölgenin ("terminus") hücre zarı ve/veya hücre duvarı ile ilişkide olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı ribozomal operonlar hücre duvarındaki peptidoglikan ile ilişkide olacaktır. Waterhouse ve Glover (1993) çalışmalarında peptidoglikan olduğunu tahmin ettikleri bir hücre duvarı bileşeninin, deproteinaz olarak fenol/kloroform veya potasyum asetatın kullanımından etkilenmeksizin *B. subtilis* DNA'sı ile birlikte saflaştığını ve bu bileşenin varlığının belirli restriksiyon enzimlerinin DNA'ya ulaşmasını sınırlandırdığını belirtmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, bakteriyel tanımlamada "ribotyping" sonuçlarının yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiği açıktır (Waterhouse ve Glover, 1993).

Machado ve arkadaşları (1998) "ribotyping"de fragman büyüklüklerinin saptanması sırasında, jelde farklı kuyulara yüklenmiş aynı DNA örneği için bile özdeş fragmanların aynı baz çifti büyüklüğüne sahip olma şansının çok düşük olduğunu belirtmiştir. Fragman büyüklüğünün saptanması ile bağlantılı hataların olabileceğinin bilinmesi, iki fragmanın özdeş olup olmadığına karar verilirken önemlidir. Bu tip farklılıklar "kabul edilebilir hatalar" olarak adlandırılmaktadır.

Elde edilen profillerdeki fragmanların hafifçe farklı büyüklüklerdeymiş gibi görünmesi deneysel hatadan kaynaklanabilmektedir (Machado ve ark., 1998). Elektroforetik ayırım sonucunda elde edilen bantların büyüklüklerine dayalı sınıflama yapılırken kullanılan analiz yazılımlarında kabul edilebilir hata payı manuel olarak belirlenebilmekte ve deneysel hatalardan kaynaklanabilecek küçük farklılıklar düzeltilebilmektedir.

*rrn*-operonuna yönelik “prob”ların kullanıldığı “ribotyping” çalışmalarında, operonun farklı kopyalarında meydana gelmiş olabilecek tek bir mutasyon veya insersiyon ve delesyonlar bant profili üzerinde bir ya da daha fazla bantlık değişikliklere neden olabilmektedir. Bu durum profillerin yorumlanmasında karmaşaya neden olmakta ve bu profillerden yola çıkılarak çizilen dendogramlar güvenilir olmamaktadır (Machado ve ark., 1998).

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen “ribotyping” çalışmalarında beklenen sonucun alınamamasının nedenlerinin; “prob”ların işaretlenmesinde kullanılan kitin kullanım süresinin dolmuş olması, kullanılan primerlerin tekrarlayan dondurup-çözme döngülerine (2 veya 3 kez) maruz kalmaları nedeniyle yıkılmış olması olabilir. Öte yandan laboratuvarımızda ilk kez uygulanan bu yöntemle ilgili optimizasyonun sağlanabilmesi için zaman ve deneyime gereksinim olduğu açıktır. GYTE Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında “Seçilmiş Yerel *Bacillus* Soylarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması“ başlıklı TÜBİTAK projesi dahilinde sürdürülecek çalışmalar kapsamında; “ribotyping” yönteminin optimizasyonu için “prob”lar yeniden sentezlettirilecek ve çalışmalar yeni “prob” seti ile sürdürülecektir. Aynı proje kapsamında gerçekleştirilmesi planlanan AFLP analizleri ile yapılması planlanan bir diğer moleküler tiplendirme yöntemi olan ve ayırt ettirici gücü yüksek, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği literatürde de belirtilen DNA-DNA hibridizasyonu için deney alt yapısı henüz tamamlanmış olup, bu bağlamdaki ilk optimizasyon çalışmalarına Ekim ayında başlanacaktır.

## SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında, yerel ekosistemlerden izole edilen ve daha önce manuel testler ve ticari kitler ile ön tiplendirmeleri yapılmış olan  $\alpha$ -amilaz, alkalen proteaz ve lipaz üreticisi 25 yerel *Bacillus* izolatının tür düzeyinde tiplendirilebilmeleri amacıyla, moleküler tiplendirme yöntemlerinden 16S rDNA dizi analizi, ARDRA ve ribotyping yöntemlerinin alt yapıları oluşturulmuştur. Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmalar ve sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

1. Belirtilen yerel *Bacillus* izolatlarının PCR ile çoğaltılan 16S rDNA'larının dizi analizleri CEQ8000 Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter®) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, tüm izolatlar için 16S rRNA geninin tamamına yakın (1246 ile 1471 baz) bir bölümü dizilenmiştir. Elde edilen dizilimler NCBI web sitesinde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bulunan BLAST hızlı tarama programı kullanılarak GenBank veri tabanındaki dizilerle karşılaştırılmış ve yerel *Bacillus* izolatlarının en fazla benzerlik gösterdikleri *Bacillus* türleri belirlenmiştir. Buna göre; 25 yerel izolattan 21'i için manuel ve ticari kitler ile elde edilen sonuçlara göre önerilen olası tür adları ile uyumlu veriler elde edilmiştir. Farklı bulunan izolatlardan P20 *B. cereus* grubu, P22 *B. flexus*, A28 ve A26 ise *B. subtilis* ile benzerlik göstermiştir.
2. *rrn* operonunun PCR ile çoğaltımı sırasında özgül olmayan ikinci bir ürünün de çoğaldığı gözlenmiş ve yapılan çeşitli optimizasyonlara karşın, bu ürünün çoğalması engellenememiştir. 4,5 kbç büyüklüğündeki *rrn* operonunun en iyi verimle çoğaltılabilmesi ve 1,5 kbç büyüklüğündeki ikinci ürünün en aza indirgenebilmesi için standart PCR'a ek olarak denenen "touch-down" PCR yaklaşımlarının yanı sıra farklı primer tutunma sıcaklıkları, çeşitli kalınlık ve büyüklüklerde PCR tüpleri, farklı *Taq* DNA polimerazlar, farklı termal döngü cihazları ve kalıp olarak kullanılacak genomik DNA'nın özütleme yöntemi gibi değişkenler irdelenmiştir.
3. 16S rDNA ARDRA çalışmaları kapsamında; 16S rDNA PCR ürünleri *Sau*3AI, *Mbo*II ve *Cfo*I enzimleri ile sindirildikten sonra metafor içeren agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılmış ve bant profilleri irdelenmiştir.

Buna göre; L1, L3, L15, L22, P20 ve A23 izolatlarının *CfoI*, *MboII* ve *Sau3AI* kesim profilleri, referans soyların hiçbirisi ile uyum göstermezken, diğer izolatlar içinde de her üç enzimle birden aynı referans soy ile benzerlik tanımlanamamıştır. Bu çalışmanın yapıldığı sırada laboratuvar altyapısının teknik yetersizliği nedeniyle sonuçların yorumlanmasında “jel görüntüleme sisteminin yetersizliği, elektroforez sisteminin yeterince büyük olmaması” gibi güçlükler yaşanmıştır.

4. Saf olmayan *rrn*-PCR ürünleri ile tüm izolatlar için, tiplendirme sonuçları ve enzim üretkenlikleri açısından öne çıkan izolatlardan seçilenler için ise, jelden izole edilen *rrn* operonunun kullanıldığı ARDRA analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece iki *rrn*-ARDRA çalışması karşılaştırılarak özgün olmayan PCR ürününün ARDRA profillerine etkisi de irdelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; A4 izolatı tüm enzimlerle her iki denemede de *B. cereus* referans soyu ile yüksek düzeyde benzerlik göstermiştir. L10, P17 ve P22 izolatları 16S rDNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar vermiştir. P20 izolatı için uygulanan her teknikte farklı sonuçlar elde edilmiş, bu nedenle bu izolatın çalışmalarda kullanılan referans soylar dışında bir tür ya da yeni bir soy olabileceği düşünülmüştür.
5. “Ribotyping” çalışmalarında tüm izolat ve referans soyların genomik DNA’ları *EcoRV*, *ClaI* ve *HindIII* enzimleri ile sindirildikten sonra elde edilen fragmanlar Seakem agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılmış ve vakumlu transfer cihazıyla naylon filtreler üzerine aktarılmıştır. *rrn* operonu üzerinde 5 farklı bölgenin tamamlayıcısı dizilimlerde olan toplam 5 oligonükleotit (OligoMiks-5) DIG-dUTP ile işaretlendikten sonra filtrelere aktarılan genomik DNA fragmanları bu prob ile hibritlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 16S rDNA ile ve filtre üzerindeki belirli bir bölgede alınan spotlar, oligonükleotitlerin etkin şekilde işaretlendiğine ve özgün olarak 16S rDNA dizilerine tutunduğuna işaret etmiştir.
6. Buraya dek denenen yöntemlerle elde edilen bulgular, P20 ve P22 soyları için daha önce önerilen tür isimlerinden bütünüyle farklı türlere işaret etmektedir. Daha da ötesi alfa amilaz ve alkalen proteaz üreticisi olarak seçilen P22 soyu için, klasik manuel tiplendirme, API, VITEK ve 16S rDNA dizi analizi çalışmaları sonucu önerilen tür isimlerinin tamamı birbirinden farklıdır. Diğer

moleküler temelli analizler sonucu elde edilecek veriler özellikle bu iki izolat için ayrıca önem taşımaktadır.

7. OligoMiks-5'in [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ] ile işaretlendiği bir diğer "ribotyping" çalışmasında elde edilen otoradyografi sonucunda yine 16S rDNA ile filtre üzerinde aynı bölgede spotlar görülmüştür. Her iki çalışmada da kullanılan DNA miktarı yeterli ve transfer başarılı olduğu için elde edilen bu sonuç ancak, jelin bu bölgesinde yer alan bakteriyel soyların prob olarak kullanılan oligonükleotitler ile daha güçlü reaksiyon vermesiyle açıklanabilir.
8. Ribotyping yöntemini optimize etmeye yönelik çalışmalar sürdürülecektir. Bu amaçla; OligoMiks5 karışımında kullanılan oligonükleotitler yeniden sentezlettirilmiş ve süresi dolan "Oligonucleotide Tailing Kit" (Roche) yeniden sağlanmıştır. OligoMiks-5 ile birlikte 16S+23S rRNA'nın tümünün prob olarak kullanılacağı bir deneme de, ilgili ürünün sağlanmasının ardından gerçekleştirilecektir.
9. Buraya dek denenen moleküler tiplendirme yöntemlerine ek olarak, alt yapı hazırlıkları henüz tamamlanan AFLP yönteminin kullanılacağı bir çalışma da gerçekleştirilecektir. Yanı sıra DNA-DNA hibridizasyon yönteminin alt yapısı da tamamlanmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılan yöntemlerin yanı sıra GYTE Biyoloji Bölümü Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında kurulması ve moleküler tiplendirme çalışmaları için rutin olarak kullanılması sağlanması öngörülen yöntemler çok yakın bir evrede kullanıma girecektir.
10. G+C içeriğinin belirlenmesi, PFGE ve RFLP gibi ayırt ettirici gücü yüksek yöntemlerin alt yapılarının kurulması, mevcut yöntemler için farklı restriksiyon enzimlerinin denenmesi de bu yerel *Bacillus* izolatlarının tiplendirilmesine katkı sağlayacaktır.
11. ARDRA çalışmasında jel profillerinin irdelenmesi ve verilerin değerlendirilmesi sırasında karşılaşılan sorunların Fransa Pasteur Enstitüsü Enterobacteriaceae Ünitesinden Prof. Dr. Patrick Grimont tarafından Grubumuza hediye edilen Taxotron yazılımının kullanıma alınması ile bir ölçüde giderileceği düşünülmektedir. Yalnızca Machintosh bilgisayarda kullanılabilen bu yazılım için uygun bir bilgisayarın sağlanmasının ardından ARDRA çalışmaları yinelenenecektir.
12. Bu tez çalışması kısmen "Seçilmiş Yerel *Bacillus* Soylarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması" başlıklı ve 105T188 nolu

TÜBİTAK projesi ve GYTE BAPK prjesi desteği ile gerçekleştirilmiştir. Alt yapısının oluşturulması oldukça pahalı olan bu çalışma kapsamında karşılaşılan en temel sorunlardan birisi, sarf malzemesinin pahalı olması nedeniyle özellikle ARDRA çalışmalarında kullanılan enzim sayısının sınırlı tutulması ve deneylerin yeterince yinelenememesidir.

## KAYNAKLAR

1. Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F.; **Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons**; Journal of Bacteriology, May (2004) 2629-2635.
2. Bej A.K., Mahbubani M.H.; **Applications of the Polymerase Chain Reaction in Environmental Microbiology**; PCR Methods Appl. (1992) 151-159.
3. Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M.; **Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift**; Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (2000) 573–606.
4. Busch U., Nitschko H.; **Methods for the differentiation of microorganisms**; Journal of Chromatography B, 722 (1999) 263-278.
5. Chèneby D., Philippot L., Hartmann A., Hénault C., Germon J.-C.; **16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils**; FEMS Microbiology Ecology 34 (2000) 121-128.
6. Cooper G.M.; **The Cell-A Molecular Approach**; Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc. ; c2000
7. Dahllöf I.; **Molecular community analysis of microbial diversity**; Current Opinion in Biotechnology 13 (2002) 213-217.
8. Demezas D.H., Bell J.; **Evaluation of Low Molecular Weight RNA Profiles and Ribotyping to Differentiate some *Bacillus* Species**; System. Appl. Microbiol. 18 (1995) 582-589.
9. Dubey S.K., Tripathi A.K., Upadhyay S.N.; **Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource**; Bioresource Technology 97 (2006) 2217-2224.
10. Ekman S.; **PCR optimization and troubleshooting, with special reference to the amplification of ribosomal DNA in lichenized fungi**; Lichenologist 31 (1999) 517-531.
11. Forney L.J., Zhou X., Brown C.J.; **Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king**; Current Opinion in Microbiology 7 (2004) 210-220.

12. Grif K., Dierich M.P., Much P., Hofer E., Allerberger F.; **Identifying and subtyping species of dangerous pathogens by automated ribotyping**; Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 47 (2003) 313-320.
13. Grimont F., Grimont P.A.D.; **Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Restriction Patterns As Potential Taxonomic Tools**; Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (1986) 165-175.
14. Heyrman J., Swings J.; **16S rDNA Sequence Analysis of Bacterial Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain)**; System. Appl. Microbiol. 24 (2001) 417-422.
15. Hugenholtz P., Goebel B.M., PACE N.R.; **Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity**; Journal of Bacteriology 180 (1998) 4765-4774.
16. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglou P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.; **Methods of studying soil microbial diversity**; Journal of Microbiological Methods 58 (2004) 169-188.
17. Lagac   L., Pitre M., Jacques M., Roy D.; **Identification of the Bacterial Community of Maple Sap by Using Amplified Ribosomal DNA (rDNA) Restriction Analysis and rDNA Sequencing**; Applied and Environmental Microbiology Apr. (2004) 2052-2060.
18. Lefresne G., Latrille E., Irlinger F., Grimont P.A.D.; **Repeatability and reproducibility of ribotyping and its computer interpretation**; Research in Microbiology 155 (2004) 154-161.
19. Liu Z.J., Cordes J.F.; **DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics**; Aquaculture 238 (2004) 1-37.
20. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E.; **Molecular Cell Biology**; New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.
21. Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D.; **Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns**; Res. Microbiol. 149 (1998) 119-135.
22. Manachini P.L., Fortina M.G., Levati L., Parini C.; **Contribution to Phenotypic and Genotypic Characterization of new Genomovars**; System. Appl. Microbiol. 21 (1998) 520-529.

23. Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G.; ***Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique**; International Journal of Food Microbiology 81 (2003) 249-254.
24. Marsh, T.L.; **Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products**; Current Opinion in Microbiology (1999) 323-327.
25. Martinez-Murcia A.J., Antón A.I., Rodriguez-Valera F.; **Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli***; International Journal of Systematic Bacteriology (1999) 601-610.
26. Meays C.L., Broersma K., Nordin R., Mazumder A.; **Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods**; Journal of Environmental Management 73 (2004) 71-79.
27. Mignard S., Flandrois J.P.; **16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment**; Journal of Microbiological Methods (2006) 574-581.
28. Moffet B.F., Walsh K.A., Harris J.A., Hill T.C.J.; **Analysis of Bacterial Community Structure using 16S rDNA Analysis**; Anaerobe 6 (2000) 129-131.
29. Morris C.E., Bardin M., Berge O., Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., Guinebretière M.H., Lebaron P., Thiéry J.M., Troussellier M.; **Microbial Biodiversity: Approaches to Experimental Design and Hypothesis Testing in Primary Scientific Literature from 1975 to 1999**; Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 (2002) 592–616.
30. Olive D.M., Bean P.; **Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms**; Journal of Clinical Microbiology 37 (1999) 1661-1669.
31. Olsen G.J., Woese C.R.; **Ribosomal RNA: a key to phylogeny**; FASEB J. (1993) 113-123.
32. Pryce T.M., Wilson R.D., Kulski J.K.; **Identification of enterococci by ribotyping with horseradish-peroxidase-labelled 16S rDNA probes**; Journal of Microbiological 36 (1999) 147-155.

33. Pukall R., Brambilla E., Stackebrandt E.; **Automated fragment length analysis of fluorescently-labeled 16S rDNA after digestion with 4-base cutting restriction enzymes**; Journal of Microbiological Methods 32 (1998) 55–63.
34. Ranjard L., Poly F., Nazaret S.; **Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment**; Res. Microbiol. 151 (2000) 167–177.
35. Regnault B., Grimont F., Grimont P.A.D.; **Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture**; Research in Microbiology 148 (1997) 649-659.
36. Riou C., Meugnier H., Bes M., Brun Y., Fiedler F., Lanse Y., Etienne J., Freney J.; **Identification of atypical strains of *Staphylococcus epidermidis* by use of molecular tools**; Res. Microbiol. (1997) 715-724.
37. Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I.; **16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine**; System. Appl. Microbiol. 26 (2003) 412-422.
38. Rondon M.R., Goodman R.M., Handelsman J.; **The Earth's Bounty: assessing and accessing soil microbial diversity**; TIBTECH October 1999 (Vol 17).
39. Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Mättö J., Vos W.M.; **Molecular Approaches for the Detection and Identification of Bifidobacteria and Lactobacilli in the Human Gastrointestinal Tract**; System. Appl. Microbiol. 26 (2003) 572-584.
40. Schlegel L., Grimont F., Grimont P.A.D., Bouvet A.; **Identification of Major Streptococcal Species by *rrn*-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis**; Journal of Clinical Microbiology, Feb. (2003) 657-666.
41. Scott T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J.; **Microbial Source Tracking: Current methodology and Future Directions**; Applied and Environmental Microbiology, Dec. (2002) 5796-5803.
42. Singleton P.; **Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine**, 6th Edition; John Wiley & Sons Ltd, 2004.

43. Smith I., Dubnau D., Morrell P., Marmur J.; Chromosomal location of DNA base sequences complementary to transfer RNA and to 5s, 16s, and 23s ribosomal RNA in *Bacillus subtilis*; J. Mol. Biol. 33 (1968) 123-140.
44. Stackebrandt E., Goebel B.M.; **Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology**; Int. J. Syst. Bacteriol. 44 (1994) 846-849.
45. Strachan T., Read A.P.; **Human Molecular Genetics 2**; New York and London: Garland Science; c1999.
46. Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A., Øvreås L.; **Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments**; Journal of Biotechnology 64 (1998) 53–62.
47. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J.; Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics; Microbiological Reviews, June (1996) 407-438.
48. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.; Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes; Nucleic Acids Res. (1991) 6823-6831.
49. Viti C., Giovannetti L.; **Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches**; Applied Soil Ecology 28 (2005) 101-112.
50. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I, Dankert J.; **Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications**; Clinical Microbiology Reviews, Oct. (1999) 633-653.
51. Wartell R.M., Hosseini S., Powell S., Zhu J.; **Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods**; Journal of Chromatography A, 806 (1998) 169-185.
52. Waterhouse R.N., Glover L.A.; Differences in the Hybridization Pattern of *Bacillus subtilis* Genes Coding for rRNA Depend on the Method of DNA Preparation; Applied and Environmental Microbiology, Mar. (1993), 919-921.
53. Weidner S., Arnold W., Pühler A.; **Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Seagrass *Halophila stipulacea* Estimated by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of**

- PCR-Amplified 16S rRNA Genes;** Applied and Environmental Microbiology, Mar. (1996) 766-771.
- 54. Wu X.-Y., Walker M.J., Hornitzky M., Chin J.; Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance;** Journal of Microbiological Methods 64 (2006) 107-119.
- 55. Ziemer C.J., Cotta M.A., Whitehead T.R.; Application of group specific amplified rDNA restriction analysis to characterize swine fecal and manure storage pit samples;** Anaerobe 10 (2004) 217-227.
- 56. Zuckerkandl E., Pauling L.; Molecules as documents of evolutionary history;** J. Theor. Biol. (1965) 357-366.

## ÖZGEÇMİŞ

24 Eylül 1982’de Sakarya’da doğdu. 2000 yılında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde burslu olarak lisans eğitimine başladı. 2004 yılında lisans eğitimini başarı sıralamasında birinci olarak bitirerek Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmekte ve Enstitü’de araştırma görevlisi olarak çalışmakta olup "Seçilmiş Yerel *Bacillus* Soylarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması" isimli TÜBİTAK destekli proje (TBAG-105T-188) kapsamındaki çalışmalara katılmaktadır.