

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAHİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT
BAKTERİLERDE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEME SAHİP BAZI ENZİMLERİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Gökhan DOĞAN
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

VAN-2020

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAHİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT
BAKTERİLERDE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEME SAHİP BAZI ENZİMLERİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Gökhan DOĞAN

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2018-7557
No'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN danışmanlığında, Gökhan DOĞAN tarafından sunulan "Tahıl Bitkilerinden İzole Edilmiş Olan Endofit Bakterilerde Biyoteknolojik Öneme Sahip Bazı Enzimlerin Belirlenmesi" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 05/03/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ

İmza:



Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hilal AY

İmza:



Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.03.2020 tarih ve 2020/16 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza: 
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



(İmza)

Gökhan DOĞAN

ÖZET

TAHİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT BAKTERİLERDE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEME SAHİP BAZI ENZİMLERİN BELİRLENMESİ

DOĞAN, Gökhan

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Mart 2020, 71 sayfa

Endofit bakteriler sağlıklı bitkilerin dokuları içinde hiçbir belirgin hastalık belirtisine neden olmadan, yaşam döngüsünün tamamını veya bir kısmını geçiren mikroorganizmalardır. Endofitik bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özellikleri ile ilgili pek çok araştırma mevcut olmasına rağmen biyoteknolojik öneme sahip ekstraselüler enzimler gibi biyoaktif bileşikler açısından değerlendirilmelerine yönelik çalışmalar nispeten daha sınırlı ve yenidir. Bu çalışmada daha önce bazı kültür ve yabancıl tahıl bitkilerinin (Poaceae familyası) sağlıklı kök, gövde ve yaprak örneklerinden izolasyonu gerçekleştirilen 128 adet endofit bakteri izolatu öncelikle proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz ve selüloz enzimlerini üretebilme yetenekleri açısından nitel olarak incelenmişlerdir. Test edilen 128 suşdan 84'ünün proteaz, 41'nin selüloz, 28'inin pektinaz, 95'inin lipaz, 10'unun ksilanaz, 71'inde lipaz ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların içerisinde 6 enzimi üreten 1, 5 enzimi üreten 8, 4 enzimi üreten 16, 3 enzimi üreten 37, 2 enzimi üreten 41, 1 enzimi üreten 19 ve hiç enzim üretmeyen 8 tane suş olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzim indekslerine göre seçilen belirli sayıda izolatu 16S rRNA dizilemesi yolu ile moleküler tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonucunda, 17 adet izolata ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi 2 adet *Pseudomonas sp.*, 1 adet *Micrococcus sp.*, 5 adet *Paenibacillus sp.*, 1 adet *Streptococcus sp.*, 2 adet *Curtobacterium sp.*, 1 adet *Chryseobacterium sp.* ve 4 adet *Bacillus sp.* cinslerine ait sonuç vermiştir. Ayrıca *Streptococcus thermophilus* ile %90.93 benzerlik oranı ile örtüşen bir izolat potansiyel yeni bir tür olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA, Endofit bakteriler, Ekstraselüler enzimler, Mikrobiyal biyoteknoloji, Poaceae familyası



ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOTECHNOLOGICALLY IMPORTANT ENZYMES IN ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM CEREAL PLANTS

DOĞAN, Gökhan

M. Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Bilgin TAŞKIN

March 2020, 71 pages

Endophyte bacteria are the microorganisms that live the whole or part of their life cycle in the tissues of healthy plants without causing any obvious signs of disease. Although there is a lot of research on the plant growth promoting properties of endophytic bacteria, studies about bioactive compounds such as extracellular enzymes of biotechnological importance are relatively limited and new. In this study, the ability of 128 endophyte bacterial isolates, which were previously isolated from healthy root, stem and leaf samples using a surface sterilization technique from some culture and wild grain plants (Poaceae family), were investigated in terms of producing protease, lipase, amylase, pectinase, xylanase, and cellulase enzymes. Of the 128 strains tested, 84 were found to produce protease, 41 to cellulase, 28 to produce pectinase, 95 to lipase, 10 to xylanase and 71 to produce lipase. It was determined that there are 1 isolates that produce 6 enzymes, 8 isolates for 5 enzymes, 16 isolates for 4 enzymes, 37 isolates for 3 enzymes, 41 isolates for 2 enzymes and 19 isolates for 1 enzyme. 8 isolates produced none of these enzymes. In addition, molecular identification of a certain number of isolates selected according to enzyme indexes was performed by 16S rRNA sequencing. As a result of the sequence analysis, 16S rRNA gene region sequences of 17 isolates yielded certain strains belonging to 2 *Pseudomonas* sp., 1 *Micrococcus* sp., 5 *Paenibacillus* sp., 1 *Streptococcus* sp., 2 *Curtobacterium* sp., 1 *Chryseobacterium* sp., and 4 *Bacillus* sp. genera. Also, an isolate coinciding with *Streptococcus thermophilus* with a similarity rate of 90.93% was evaluated as a potential new species.

Keywords: 16S rRNA, Endophytic bacteria, Extracellular enzymes, Microbial biotechnology, Poaceae family



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın her aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ'ye teşekkür ederim. Tez verilerimin istatistiksel analizinde destek sağlayan sayın Doç. Dr. Gazel SER hocama teşekkürlerimi sunarım. Gerek lisans gerekse yüksek lisans eğitimim süresince gösterdikleri ilgi ve destek için tüm Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyesi ve araştırma görevlisi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Çalışma sürecinde gösterdikleri sabır, anlayış ve destekleri için tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmaya FYL-2018-7557 nolu proje ile destek veren Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

2020

Gökhan DOĞAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Endofit Bakteriler	3
2.2. Endofit Bakterilerin Çeşitliliği	3
2.3. Endofit Bakterilerin Bitkide Kolonizasyonu	4
2.4. Endofit Bakterilerin Önemi ve Biyoteknoloji	5
2.5. Endofitik Bakteriler Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitler.....	6
2.6. Ekstraselüler (Hücre dışı) Enzimler	7
2.6.1. Endofitik bakteriler tarafından üretilen hücre dışı enzimler.....	8
2.6.2. Proteaz enzimi ve kullanım alanları	10
2.6.3. Amilaz enzimi ve kullanım alanları.....	10
2.6.4. Lipaz enzimi ve kullanım alanları	11
2.6.5. Selülaz enzimi ve kullanım alanları.....	12
2.6.6. Pektinaz enzimi ve kullanım alanları.....	13
2.6.7. Ksilanaz enzimi ve kullanım alanları	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Bakteri İzolatları	17
3.2. İzolatların Geliştirilmesi	21
3.3. Enzim Aktivitelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi	22
3.3.1. Proteaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.3.2. Amilaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi	22
3.3.3. Lipaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi.....	23

	Sayfa
3.3.4. Selülaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi	24
3.3.5. Ksilanaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi.....	24
3.3.6. Pektinaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi	25
3.4. İzolatların Enzimatik İndekslerinin Belirlenmesi	26
3.5. Bakterilerin Kısmi 16S rRNA Dizi Analizi ile Moleküler Tanımlanmasının Yapılması.....	27
3.6. Verilerin Analizi	29
3.7. İstatistik Analiz.....	29
4. BULGULAR	31
4.1. Enzim Aktivitelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi	31
4.2. İzolatların Enzimatik İndeks Sonuçları	33
4.3. Moleküler Tanımlama İçin İzolat Seçim Sonuçları.....	33
4.5. Seçilen İzolatların Moleküler Tanımlanması.....	43
4.6. Dizi Analizi Sonuçları	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	59
ÖZ GEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı endofitik bakteriler ve biyolojik aktiviteleri	7
Çizelge 2.2. Endofit bakterilerin ürettiği hücre dışı enzimler	9
Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar	17-21
Çizelge 3.2. İzolatların geliştirilmesi için kullanılan Nutrient Agar besiyerinin bileşimi.....	21
Çizelge 3.3. İzolatların proteaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	22
Çizelge 3.4. İzolatların amilaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	23
Çizelge 3.5. İzolatların lipaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	23
Çizelge 3.6. İzolatların selülaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	24
Çizelge 3.7. İzolatların ksilanaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	25
Çizelge 3.8. İzolatların pektinaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi.....	26
Çizelge 3.9. 16s rRNA bölgelerinin çoğaltılması PZR koşulları	28
Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz, amilaz, selülaz, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri	34-41
Çizelge 4.2. 16S rRNA dizi analizi için seçilmiş 20 adet izolatın proteaz, lipaz, amilaz, selülaz, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri	41-42
Çizelge 4.3. EzBioCloud veri tabanı kullanılarak yapılan dizi analizi sonuçlarına göre izolatların tanısı ve GenBank erişim numaraları	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan izolatların enzim indekslerinin (EI) hesaplanması	26
Şekil 4.1. Endofit bakteri izolatlarının enzim üretim yüzdeleri	31
Şekil 4.2. Bazı izolatların ayırtedici besiyerlerindeki enzim aktivitelerini gösteren örnek fotoğraflar	32
Şekil 4.3. Seçilen izolatlardan bazılarına ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri	43
Şekil 4.4. Seçilen izolatlardan bazılarına ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri	43
Şekil 4.5. Seçilen izolatlardan bazılarına ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri	44
Şekil 4.6. G117Y1T izolatının 16S rRNA gen bölgesine göre oluşturulmuş filogenetik ağaç.....	46
Şekil 4.7. Dizi sonuçları alınmış izolatların mikroskop altındaki koloni görünüşleri	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

%	yüzde
°C	santigrat
µl.	mikrolitre
bp.	baz çifti
cfu	colony forming unit
dk.	dakika
g.	gram
L.	litre
ml.	mililitre
ng.	nanogram
Ph	asit-baz ölçü birimi
α	alfa
β	beta

Kısaltmalar

Açıklama

CMC	karboksimetilselüloz
DNA	deoksiribo nükleik asit
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dNTP	deoksinükleozit trifosfat
EI	enzim indexi
GLM	genel doğrusal model
IAA	indol asetik asit
PUFA	çoklu doymamış yağ asiti

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Açıklama

PZR

polimeraz zincir reaksiyonu

RNA

ribo nükleik asit

rRNA

ribozomal ribo nükleik asit

Std.

standart

TAE

tris asetat

UV

ultraviole



1. GİRİŞ

Bakteriler çok önemli enzim kaynaklarıdır. Çünkü kısa sürede büyük miktarlarda kültürlenebilirler ve enzim üretimini arttırmak için bakteriyel hücreler üzerinde genetik manipölasyonlar yapılabilmesi mümkündür. Bununla birlikte mikrobiyal enzimlerin hayvansal ve bitkisel enzimlerden daha aktif ve stabil oluşu mikrobiyal enzimlere dikkati daha çok çekmiştir (Anbu ve ark., 2013; Gopinath ve ark., 2013).

Mikroorganizma kaynaklı enzimler, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fermantasyon yöntemleri ile fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle endüstrinin her alanında kullanılmaktadır (Wiseman, 1987). Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin üretiminde ve geliştirilmesinde mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981). Özellikle son yıllarda rekombinant DNA teknolojisiinden yararlanılarak, enzim teknolojisi giderek gelişmiş ve enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmıştır (Gessese, 1998).

Endofit bakteriler sağlıklı bitkilerin dokuları içinde hiçbir belirgin hastalık belirtisine neden olmadan, yaşam döngüsünün tamamını veya bir kısmını geçiren mikroorganizmalardır (Hallman ve ark., 1997). Literatürde, çeşitli endofitik bakterilerin, fosfat ve diğer besleyiciler gibi besin ve mineral döngülerini iyileştirme yolu ile bitki büyümesini teşvik yeteneklerini ortaya koyan pek çok araştırma mevcuttur (Costa ve Loper, 1994; Verma ve ark., 2001; Lee ve ark., 2004; Wakelin ve ark., 2004). Bitki gelişimini artıran endofitik bakterilerin en çok çalışılmış özelliklerinin başında azot fiksasyonu gelmektedir (Hurek ve ark., 1991; Boddey ve ark., 1995; Barraquio ve ark., 1997; Webster ve ark., 1997; Yanni ve ark., 1997). Biyolojik N₂ fiksasyonuna aktif olarak katılan endofitik diazotrofik bakteriler, Graminea familyasına bağlı çok sayıda konukçu bitkiden izole edilmiştir. Bakteriler nitrogenaz enzimi yardımıyla havadaki serbest azotu bitkinin kullanabileceği formlara dönüştürür (Özdemir, 2002). Azot fiksasyonu yapan bakterilerin çeşitlilik ve topluluk yapısı üzerine yapılan çalışmalar, bu bakterilerin nitrogenaz enzimi üretme yeteneğine sahip türleri içeren her şubede yaygın bir şekilde bulunduğunu göstermiştir (Hardoim, 2011).

Endofitik mikroorganizmaların bitki hastalıklarına karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılması da ilgi çekici araştırma konularından biridir (Narisawa ve ark., 1998). Örneğin, endofitik bakterilerin, fungal gelişimi baskılama yeteneğine sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Çeltik tohumlarından izole edilen bazı endofitik bakterilerin, *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumannomyces graminis* ve *Heterobasidium annosum*'a karşı güçlü bir antifungal etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Mukhopadhyay ve ark., 1996). Bitki hastalıklarının baskılanmasında endofitik bakteriler; yer ve besin rekabeti mekanizmalarını kullanarak patojene karşı doğrudan etki gösterirken, aynı zamanda bitkide dayanıklılık sistemlerini uyararak patojenlere karşıda dolaylı etki gösterebilmektedir (Sturz ve ark., 1998, Puentea ve ark., 2009). Ayrıca hidrojen siyanid (HCN) ve antibiyotikler gibi antimikrobiyal maddelerin endofitik bakteriler tarafından üretimi, fitopatojenler ile biyolojik mücadelede endofitik bakterilerin kullandığı önemli mekanizmalardandır (Blumer ve Haas, 2000).

Diğer taraftan endofitik bakterilerin, biyoteknolojik öneme sahip ekstraselüler enzimler açısından incelenmesini içeren çalışmalar daha sınırlıdır (Carrim ve ark., 2006). Bu nedenle endofitik bakteriler, farklı potansiyellere sahip enzim ya da enzimler elde etmek için yeni bir kaynağın temsilcisi olabilirler.

Bu çalışmanın amacı, Van ili içerisinde, daha önce çeşitli kültür ve yabanıl tahıl bitkilerinden izolasyonu yapılan endofit bakterilerin öncelikle katı besiyerinde endüstriyel açıdan önem taşıyan proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, ksilanaz ve pektinaz enzimlerini üretme potansiyelleri yönünden nitel olarak incelenmesi ve bir sonraki aşamada; enzim aktivitesi yönünden yüksek olan suşların 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tanısının yapılmasıdır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Endofit Bakteriler

En geniş anlamda endofitler, yüksek bitkilerin intra/interselüler dokularında yaşayan ancak konukçusunda herhangi bir hastalık belirtisine neden olmayan, bitkilerin kök, gövde ve yaprak gibi dokularında kolonize olan, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bu bitki dokularından veya bitkinin iç kısımlarından izole edilebilen, yaşamlarının bir kısmını veya tamamını bitki içerisinde geçiren bakteriyel ve fungal mikroorganizmalardır (Petrini ve ark., 1989; Hallmann ve ark., 1997; Ryan ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014).

Perotti (1926), bitkilerin kök dokusunda patojen olmayan bakterilerin varlığını ortaya döken ilk araştırmacıdır. Hennig ve Villforth (1940) hiçbir zararlı etkiye maruz kalmamış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında bakteri varlığını tespit etmişlerdir. 1940'lardan bu yana bitkilerin çeşitli organlarında endofitik bakterilerin varlığına dair çok sayıda rapor bulunmaktadır (Hallmann ve ark., 1997).

Endofitik bakteriler, obligat veya fakültatif olarak sınıflandırılabilir. Obligat endofitik bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için konukçu bir bitkiye ihtiyaç duyarlar ve gelişebilmeleri, hayata tutunabilmeleri için bu çok önemlidir. Fakültatif endofitlerin ise konukçu bitki dışında yaşamını sürdürdüğü bir zaman dilimi vardır (Hardoim ve ark., 2008).

2.2. Endofit Bakterilerin Çeşitliliği

Genel olarak endofitik bakteriler, rizosferik veya patojen bakterilere göre düşük popülasyonlarda bulunur (Hallmann ve ark., 1997; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2004). Endofitlerin popülasyon yoğunluğu, esas olarak bakteri türüne ve konakçı genotipine, konakçının hangi gelişim aşamasında olduğuna ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Pillay ve Nowak 1997).

Acidobacteria, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobiae*

şubelerine ait kültüre alınabilen ve kültüre alınamayan 200'den fazla endofit bakteri cinsi olduğu rapor edilmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sessitsch ve ark., 2012; Sun ve Guo 2012; Malfonova ve ark., 2013). Bununla birlikte, en önemli endofitler, üç ana şubeye ayrılmışlardır. Bunlar *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* şubeleridir. Bu şubelerin içerisinde *Azoarcus*, *Acetobacter* (*Gluconobacter* olarak yeniden adlandırılmış), *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* ve *Streptomyces* türleri vardır (Malfonova ve ark., 2013). Bununla birlikte tanımlanan endofitlerin sayısı çok daha azdır.

Endofitik bakteri türleri çok sayıda bitki türünden elde edilmiş olsalarda yoğunlukta, bezelye (*P. sativum*), domates (*Lycopersicum esculentum*), mısır (*Zea mays*), buğday (*Triticum aestivum*), yulaf (*Avena sativa*), kanola (*Brassica napus*), arpa (*Hordeum vulgare*), turp (*Raphanus sativus*) soya fasulyesi (*Glycine max*), patates (*Solanum tuberosum*), marul (*Lactuca serriola*) ve salatalık (*Cucumis sativa*) gibi çeşitli kültür bitkilerinde izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bununla birlikte, ekonomik olarak önemli bazı farmasötik bitkilerden de çeşitli bakteri suşları izole edilmiştir. *Arthrobacter*, *Actinobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, ve *Serratia* türleri bunlara örnek olarak gösterilebilir (Gray ve Smith, 2005).

2.3. Endofit Bakterilerin Bitkide Kolonizasyonu

Birçok bitki, tohum ve embriyo dahil olmak üzere bulundurdıkları endofitik bakteri açısından çeşitlilik içermektedir. Bu sayede endofitik bakteriler yeni bitkilerde varlıklarını garantiye almış olur (Truyens ve ark., 2015; Nelson, 2017). Endofitler muhtemelen çimlenme ve erken fide büyümesi sırasında, gelişmekte olan fidelerde harekete geçip büyürler. Bitkinin büyümesi ile beraber, fideler ortaya çıktıkça, kökler ile toprak mikrobiyomu arasındaki etkileşimler başlar. Bitkinin büyümesi ile birlikte rizosferde bakteriyel aktivite artmaya başlar ve böylelikle bakterilerin kök yoluyla bitkinin içine girmesi kolaylaşır. Ve son aşamada bazı endofitler köklerin de ötesinde bitki endosferinde (gövde ve yapraklar gibi) kolonize olmaya başlar. Bazı bakteriyel

endofitler de çiçekleri ve tohumları kolonize ederler ve büyük olasılıkla ana endofit topluluktan döllere dikey olarak aktarılırlar (Truyens ve ark., 2015; Mitter ve ark., 2017).

2.4. Endofit Bakterilerin Önemi ve Biyoteknoloji

Bitkiler büyüme ve gelişme için C, H, N, O ve P gibi 16 temel elemente ihtiyaç duyarlar. Bitkiler bu elementleri topraktan, atmosferden, su ve organik maddelerden kimyasal formda elde edip kullanılırlar. Endofit bakterilerin ise bu besin elementlerinin alımında rolü oldukça büyüktür (Arachevaleta ve ark., 1989).

Endofitik bakteriler bazı patojenik organizmaların zararlı etkilerini azaltıp önleyebilir. Endofit bakterilerin konakçıya sağladığı faydalar rizosferik bakteriler için kullanılan mekanizmalara benzer yollarla tespit edilmektedir (Kloepper ve ark., 1999; Gray ve Smith, 2005). Fungal, bakteriyel, viral kaynaklı ve bazı özel durumlarda böcekler ve nematodlardan kaynaklı zararlar bitkilerin, endofitik bakteriler ile aşılmasıyla azaltılabilmektedir (Kerry, 2000; Sturz ve ark, 2000; Ping ve Boland, 2004; Berg ve Hallmann, 2006).

Birçok endofit bakteri (*Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* ve *Bacillus sp.* gibi) rizosferik bakteriler ile ortak cinslere sahiptir (Lodewyckx ve ark., 2002). Bu cinsler antibiyotikler, antikanser bileşikler, uçucu organik bileşikler, antifungal, antiviral, böcek öldürücü ve immünosupresif ajanlar dahil olmak üzere çeşitli sekonder metabolitlerin üreticisidir. Biyolojik olarak birçok aktif bileşik endofitik organizmalardan izole edilmiş olmakla birlikte, potansiyelinin çok altında kullanılan yeni ve doğal bir ürün kaynaklarıdır (Joseph ve Mini Priya, 2011).

Endofitik bakteriler ayrıca fitoremediasyonda kullanılabilmektedir. Ksenobiyotikler ile kirlenmiş toprakta yetişen bitkilerin, gerekli atık parçalayıcı genlere sahip olan endofit bakterileri bitki içerisine aldığı gözlemlenmiştir. Nitekim, nitro-aromatiklerle kirlenmiş tarla alanlarında, bu bileşiklerin parçalanmasını sağlayan enzimleri kodlayan genlerin endofitik suşlarda oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir (Siciliano ve ark., 2001). Ayrıca yapılan bir araştırmada Melez Kavak ağaçlarından (*Populus deltoids x nigra*) izole edilmiş bir fito-simbiyotik endofitik türün, 2,4,6-trinitrotoluen gibi sayısız nitro-aromatik bileşiği biyolojik olarak parçalayabildiği gösterilmiştir (Van Aken ve ark., 2004).

Yapılan diğerk bir çalışmada ise, genetik olarak modifiye edilmiş endofitler ile enfekte edilen bitkilerde nikel birikiminin ve toleransının arttığı gözlemlenmiştir. (Lodewyckx ve ark., 2001)

2.5. Endofitik Bakteriler Tarafından retilen Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler mikroorganizmaların büyümesinde, gelişmesinde ve çoğalmasında, kısacası yaşamını sürdürebilmesinde doğrudan etkisi olmayan fakat mikroorganizmaların savunma sistemlerinde önemli rol oynayan organik bileşikler olarak tanımlanabilir (Stamp, 2003). Mikrobiyal gelişim için zorunlu olmasa da, sekonder metabolitler toplumun sağlığı, beslenmesi ve ekonomisi için çok önemli bir konumdadır (Berdı, 2005).

Endofit bakterilerin bir dizi biyoaktif metabolit ürettikleri bildirilmektedir; bunlar, zorlu hastalıklara karşı tedavi için ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisi gibi potansiyel uygulamalar için mükemmel bir hammadde kaynağıdır (Strobel ve Daisy, 2003; Goodtime ve ark., 2014). Endofitik bakteriler antimikrobiyal bileşikleri, fitohormonları veya öncüllerini, B12 ve B1 gibi vitaminleri, biyo koruyucuları içeren düşük molekül ağırlıklı sekonder metabolitleri üretirler (Trotsenko ve Khmelenina, 2002; Mercado ve Bakker, 2007). Bununla birlikte alkaloidler, steroidler, terpenoidler, peptitler, poliketonlar, flavonoidler, kinoller ve fenoller gibi anti-kanser, antioksidan, antimikrobiyal, antibiyotik, anti-inflamatuvar, immünosüpresif özellikleri olan terapötik ajanlar da üretmektedirler (Korkina, 2007). Bazı endofitik bakteriler ve ürettikleri sekonder metabolitler izelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı endofitik bakteriler ve biyolojik aktiviteleri (Singh ve ark., 2017)

Enzim	Endofit Bakteri	Biyolojik Aktivite
Basilisin	<i>B. subtilis</i> 168	Anti-fungal
Nistatin	<i>Streptomyces noursei</i>	Anti-fungal
KB425796-A	<i>Paenibacillus</i> sp. 530603	Anti-fungal
Bakillomisin	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Anti-fungal, Hemolytic
Munumbisin	<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	Antibakteriyel
Harmaomycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibakteriyel
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>	Antibakteriyel
Tetrasiklin	<i>Streptomyces remosus</i> and <i>S. aureofaciens</i>	Antibakteriyel
Bakteriyosin	<i>B. subtilis</i>	Antibakteriyel
Amicoumacin	<i>B. subtilis</i>	Antibakteriyel, anti-inflammatory
Artemisinin	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Anti-malarialsıtma
Coronamycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-malarialsıtma
Spektinomisin	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Anti-tüberküloz
Treponemycin	<i>Streptomyces</i> Strain MS-6-6	Anti-tüberküloz
Androprostamines	<i>Streptomyces</i> sp. MK932-CF8	Anti-prostat kanseri
Camptothecine	<i>Lysinibacillus</i> sp. and <i>B. cereus</i>	Anti-kanser
Indolokarbazol	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-kanser
Doksorubusin	<i>Streptomyces</i> sp.	Meme kanseri ve tümörleri tedavisi
Antrasiklin	<i>Streptomyces</i> sp. YIM66403	Antitümör
Daptomisin	<i>Streptomyces roseoporous</i>	Bakteriyel deri enfeksiyonları
Monensin	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	Koksidiyoz Önleyici
Mitomisin	<i>Streptomyces caespitosus</i> and <i>S. lavendulae</i>	Kemoterapötik Ajan
Saadamycin	<i>Streptomyces</i> sp. Hedaya48,	Antidermatofit
Streptavidin	<i>Streptomyces albus</i> DSM 40763	İmmüno terapi

2.6. Ekstraselüler (Hücre dışı) Enzimler

Enzimler, reaksiyon hızını arttıran ve reaksiyon sırasında tüketilmeyen proteinler olarak tanımlanmaktadır. Katalizör olarak işlev gösterirler, bu yüzden temel kimyasal

reaksiyonları hatırı sayılır derece hızlandıran yeni yollar oluşturlar (Bender ve ark., 1984). Mikrobiyal hücre dışı enzimler, sitoplazmik membrana bağlı ribozomlar tarafından üretilir ve membran yolu ile hücrenin dışına taşınırlar (Priest, 1984). Ya çevreye salınabilir ya da bakteri hücresinin dış yüzeyine bağlı kalabilirler. Yüzeye bağlı enzimler bakterilere serbest salınımlı enzimlere göre daha çok avantaj sağlarlar. Çünkü yüzeye bağlı olanlar, bakteri hücresi için katalize ettikleri reaksiyonları koruyarak ürün alımını kolaylaştırır (Hoffman ve Decho, 1999). Bununla birlikte, hücreye bağlı olmayan enzimler, substratı mikrobiyal büyüme taleplerinin üzerinde hidrolize edebildiklerinden, beslenme avantajları sağlayabilir (Vetter ve ark., 1998).

2.6.1. Endofitik bakteriler tarafından üretilen hücre dışı enzimler

Bakteriyel endofitlerin, selüloz, ksilanaz, proteaz, amilaz, pektinaz, esteraz, lipaz, proteaz, asparaginaz vb. enzimler ürettikleri de rapor edilmektedir (Sturz ve Nowak, 2000; Carrim ve ark., 2006). Bu enzimleri üretebilen endofitik bakterilerin bitkinin farklı yerlerinden izole edildiğini gösteren çok sayıda kaynak çalışması bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Bu tür keşif çalışmaları agar plaka tespit yöntemlerine dayanmaktadır. Fransız lavantasında (*Lavandula dentate*) yapılan çalışmalarda, bu bitkinin 30'dan fazla endofitik bakteri suşuna sahip olduğu tespit edilmiştir. *Nocardiopsis* bakteri türlerinin bitkinin farklı büyüme aşamalarında yüksek miktarda α -amilaz hücre dışı enzimini salgıladığı tespit edilmiştir (Stamford ve ark., 2001).

Tıbbi açıdan önemli bitkilerden de α -amilaz, proteaz ve selüloz üreten endofitik bakteriler izole edilmiştir (Vijayalakshmi ve ark., 2016). Yapılan çeşitli çalışmalarda endofitik bakterilerin (*Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacia* ve *Enterobacter hormaechei*) çok yıllık bitkilerde α -amilaz, proteaz ve selüloz açısından hiper enzimatik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Leo ve ark., 2016).

Çizelge 2.2. Endofit bakterilerin ürettiği hücre dışı enzimler(Khan ve ark., 2017)

Tür	Enzim
<i>Actinomyces pyogenes</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Amilaz, esteraz, lipaz, proteaz
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Asparaginaz
<i>Pseudomonas sp.</i>	Exo-b-agaraz
<i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Selülaz, Ksilanaz, Pektinaz
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Pektinliyz
<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i>	Selülaz, Ksilanaz, Lignin
<i>Bacillus sp.</i>	L-asparaginaz
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fitaz
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Fibrinolitik enzim
<i>Rhizobium</i> , <i>Massilia</i> , <i>Kosakonia sp.</i> , <i>Pseudorhodoferax sp.</i> , <i>Caulobacter sp.</i> , <i>Pantoea sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Methylobacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Curtobacterium sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Mucilaginibacter sp.</i> , <i>Chitinophaga sp.</i>	ACC deaminaz, Endoglukanaz, Proteaz
<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>	ACC deaminaz, Selülaz, Proteaz, Amilaz, Pektinaz
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pseudomycoides</i> , <i>Paenibacillus senitriiformis</i>	L-asparaginaz
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> , <i>Macroccoccus sp.</i> ,	Selülaz, Ksilanaz, Pektinaz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Antrasen
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ekzopolisakkaritler
<i>Bacillus subtilis</i>	YbdN protein
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus methylotrophicus</i> , <i>Bacillus siamensis</i>	L-asparaginaz

2.6.2. Proteaz enzimi ve kullanım alanları

Proteazlar, proteinlerde ve polipeptitlerde bulunan peptit bağlarının hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Deterjan ve eczacılıkta yaygın olarak kullanılırlar, bunu gıda endüstrileri takip eder. Piyasadaki endüstriyel enzimlerin % 60'ını temsil ederler (Singh ve ark., 2016).

Proteazlar gıda endüstrisinde unlu mamullerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler karıştırma süresini azaltmak, hamur kıvamını ve homojenliği azaltmak, ekmekteki glüten kuvvetini düzenlemek, doku ve lezzetini geliştirmek için kullanılır (Tucker ve Woods, 1995, Miguel ve ark., 2013). Proteazların bir diğer önemli uygulaması süt endüstrisi ile ilişkilidir. Doğal olarak oluşan proteazlar peynirin lezzet özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunur. Peynir olgunlaşmasının hızlanması, fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi ve süt ürünlerinin alerjenik özelliklerinin azaltılması için kullanılırlar (Thomas ve Mills, 1981).

Keratinazlar proteaz sınıfına ait enzimlerdir. Bu enzimler keratin yapıdaki maddelerin geri dönüşümünde kullanılabilmektedir (Câlin ve ark., 2017). İnsanların günlük olarak çevreye bıraktığı yeşil ve hayvansal atıklar çok sayıda keratin barındırır. Proteaz sınıfına ait olan keratinaz enzimi bu atıkların geri dönüşümünde büyük önem taşımaktadır (Cavello ve ark., 2015; Hossain ve ark., 2017).

Enzim teknolojisinde, deterjan endüstrisi tarafından üretilen ürünler proteaz enziminin kullanımıyla etkinliği artırılarak çamaşırların daha iyi temizlenmesini sağlarlar. Ayrıca bu enzimler protezlerin ve kontak lenslerin temizlenmesinde de başarıyla kullanılmaktadır (Jacobson ve ark., 1985).

Konvansiyonel deri işleme yöntemlerinde kullanılan kireç ve sülfat yüksek toksik etkiye ve kirliliğe sebep olmaktadır. Bunların yerine kullanılan proteaz enzimi kirliliği ve toksiteyi azaltmaktadır (Thanikaivelan ve ark., 2004).

2.6.3. Amilaz enzimi ve kullanım alanları

Amilazlar, polisakkaritlerde dahili alfa 1-4 glikozidik bağların hidrolizini katalize eden nişasta bozunduruç enzimlerdir (Takata ve ark., 1992).

Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir ve tüm sıvı deterjanların % 90'ı bu enzimleri içerir (Gupta ve ark., 2003; Mitidieri ve ark., 2006; Hmidet ve ark., 2009). Amilazlar patates, sos, krema ve çikolata gibi nişastalı artıkların dekstrinlere ve diğer oligisakkaritlere indirgenmesini sağlayarak uzaklaştırılmasında yardımcı olurlar. Amilazlar ayrıca çamaşır beyazlatmada, ürünün temizleyicilik özelliğinin artırılmasında ve renklere kararma olmadan beyazlatmanın artırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Borchet ve ark., 1995; Tanaka ve Hoshino, 1999).

Amilazlar unlu mamullerinde, hamurun çeşitli özelliklerinin artırılması amacıyla da kullanılmaktadır. Amilazların hamura eklenmesi, mayalanma oranının artırılması ve hamurun viskozitesinin azaltılmasıyla sonuçlanarak ürünün hacminde ve dokusunda iyileşmelere neden olur. Ayrıca hamurda ekmeğin lezzetini, kabuk rengini ve kızartma kalitesini artıran ek şekerler de üretir. Fermente edilebilir bileşiklerin üretilmesinin yanı sıra, amilazlar ayrıca ekmek pişirme işleminde kıvrılma önleyici bir etkiye sahiptir ve fırınlanmış ürünlerin yumuşaklıklarını koruyarak bu ürünlerin raf ömrünü arttırmaktadır (Maarel ve ark., 2002; Gupta ve ark., 2003). Amilazlar nişasta ile birlikte içecek endüstrisinde glukoz ve fruktoz şurubu üretmek için de kullanılmaktadır (Maarel ve ark., 2002).

Amilazlar tekstil endüstrisinde çözgü ipinin güçlendirilmesi için kullanılan nişasta tabakasının kumaş üzerinden uzaklaştırılmasında (haşıl sökme) kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2003; Drauz ve ark., 2010).

Kağıt üretimi endüstrisinde yazma kalitesini arttırmak ve kağıt yüzeyinin pürüzsüz ve güçlü olması amacıyla nişasta kaplaması kullanılır. Bu uygulamada nişastanın viskozitesi kağıt boyutlandırma için çok yüksektir. Bu dezavantaj amilazlar kullanılarak aşılabilmektedir (Bruinenberg ve ark., 1996).

2.6.4. Lipaz enzimi ve kullanım alanları

Lipazlar, lipidlerin yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalize eder. Bu reaksiyonun tersine çevrilmesi, düşük su içeriğine sahip bir ortamda veya daha ziyade organik çözücülerin varlığında gerçekleşir. Bu tür reaksiyonlar esterleştirme, transesterifikasyon ve interesterifikasyon içerir. İnteresterifikasyon terimi, literatür

boyunca daha geniş bir anlama sahiptir ve bir ester ve bir asit (asitoliz), bir ester ve bir alkol (alkoliz) veya iki ester (transesterifikasyon) arasındaki asil radikallerinin değişimini ifade eder. Tüm bu reaksiyonlar, lipidlerin fiziksel özelliklerini değiştirmeye ve yeni esterler üretmeyi sağlar (Ghazali ve ark., 1995).

Son zamanlarda, deterjan endüstrisinde, çamaşır, bulaşık makinelerinde yağ kalıntılarının giderilmesinde ve tıkanmış boruların temizlenmesindeki işlevsel önemlerinden dolayı, mikrobiyal hidrolitik lipazlar bu alandaki en büyük pazarlardan biri haline gelmiştir. Deterjan formülasyonlarına lipaz eklenmesi deterjanların performansını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda daha iyi bir ekolojik çevreye katkı sunabilmektedir. (Nerurkar ve ark., 2013).

Gıda endüstrisinden ucuz yağların kaliteli yağlara çevrilmesi büyük önem taşımaktadır. Daha ucuz yağların lipaz katalizli transesterifikasyonu, örneğin palmiye orta fraksiyonundan kakao yağı üretmek için kullanılabilir (Hasan ve ark., 2006). Ayrıca lipazlar ürünlerde insan sütü yağı yerine kullanılabilecek betapol sentezinde kullanılabilmektedir (Nakajima ve ark., 2000).

Lipazlar, bitkisel ve hayvansal PUFA'ları (çoklu doymamış yağ asiti) zenginleştirerek çeşitli balık yağlarının (ton balığı yağı, ringa balığı yağı) ve hodan yağı gibi çeşitli bitki yağlarının eldesinde kullanılır. Serbest PUFA'lar ve bunların mono ve diaçilgliseritleri daha sonra çeşitli farmasötikler üretmek için kullanılır (Sharma ve ark., 2001).

2.6.5. Selülaz enzimi ve kullanım alanları

Selülazlar, selüloz zincirinin β -1,4-glukozit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir (Nishida ve ark., 2007). Selülazlar bitki hücrelerinin yapısında bulunmakla beraber bazı bakteriler ve hayvanlar tarafından da üretilmektedir.

Selülazlar, tekstil endüstrisinde kumaşların biyolojik olarak parlatılması ve kotlarda taşlanmış bir görünüm elde edilmesinin yanı sıra tekstil boyalarının renklendirilmesinde ve parçalanmasında kullanılabilmektedir (McMullan ve ark., 2001). Deterjan endüstrisinde pamuklu kumaşların yumuşaklığını ve parlaklığını arttırmak için ev tipi çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır (Cherry ve Fidantsef, 2003; Adrio ve Demain, 2014).

Genel itibariyle hemiselülozlar ve pektinazlar ile kombine halde kullanılan selülozlar gıda işleme, hayvan yemi üretimi, meyve ve sebze sularının üretimi, şarap ve bira üretiminde bitki hücre duvarlarının parçalanması amacı ile kullanılmaktadır (Menendez ve ark., 2015). Yağ verimini arttırmak, yüksek seviyede antioksidan ve E vitamini içeriğini korumak için zeytin yağı ekstrasyonu sırasında selüloz, hemiselüloz ve pektinazların bir kombinasyonu kullanılmıştır (Galante ve ark., 1998). Ayrıca yağ macununun viskozitesini azaltmak ve polifenolik maddelerin zeytin meyvelerinden ekstraksiyonu için bu karışım kullanılmaktadır (Ranalli ve ark., 2003).

Geviş getiren hayvanların yem bileşimi selüloz, hemiselüloz, pektin ve lignin bakımından zengin olması sebebiyle oldukça karmaşıktır. Bu yüzden yemin sindirilebilirliğini arttırmak amacıyla selüloz preparatları kullanılmaktadır (Vasco ve ark., 2016).

Selülozların kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinde kullanımı çoğunlukla kâğıdın mürekkepten arındırılmasına dayanmaktadır, ancak yeni ortaya çıkan bir uygulamadır. Liflerin parçalanması ve vizkozite kaybı olasılıklarının olması nedeni ile kâğıt endüstrisinde selülozların bulunması istenmez. Fakat çeşitli çalışmalarda özellikle alkali selülozların atık kâğıtlardan mürekkebin arındırılması, liflerin modifikasyonu ve kâğıdın geri dönüşümü için kullanıldığı belirtilmektedir (Eriksson, 1990; Bajpai, 1999).

Doğal olarak oluşan nişasta ve selüloz, alternatif biyoyakıtların potansiyel kaynağı olarak kabul edilmiştir (Sing ve ark., 2016; Sreedharan ve ark., 2016). Lignoselülozik biyokütle, tarım, ormancılık ve evsel atıklar da dahil olmak üzere farklı endüstrilerden gelen atıklar içerisinde bol miktarda bulunmaktadır (Li ve ark., 2009; Cherebuni, 2016; Isikgor ve ark., 2016). Selülozlar bu atıkların geri dönüşümünde kullanılabilir.

2.6.6. Pektinaz enzimi ve kullanım alanları

Pektinazlar depolimerizasyon ve deesterifikasyon reaksiyonları ile pektik maddelerin parçalanmasını sağlayan enzimler grubudur (Petroli ve ark., 2009). Pektinaz ayrıca meyve suyunun arıtılması sırasında ticari enzim formülasyonu için iyi bilinen bir enzimdir. Bu enzim glikozidik bağları açarak poligalakturonik asidi mono-galakturonik aside ayırır (Oyewole ve ark., 2011).

Genel olarak içecek endüstrisinde meyvelerin işlenmesi enzim preparatları ile yapılmaktadır (Khan ve ark., 2013). Pektinazlar viskoziteyi azaltmada, meyve posasının sıvılaştırılmasıyla meyve suyunun verimini ve homojenliğini arttırmada ve meyve kabuklarının uzaklaştırılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Kareem ve Adebawale, 2007; Chaudhri ve Suneetha, 2012; Makky ve Yusoff, 2015). Pektinazlar şarap üretiminde, özütleme işlemine desteklemek, meyve suyu verimini maksimuma çıkarmak, filtrelemeyi kolaylaştırmak, lezzet ve renk arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Chaudhri ve Suneetha, 2012). Pektinazlar ay yapraklarının hücre duvarlarında bulunan pektini parçalayarak çay fermentasyonunu hızlandırır ve çayın köpük oluştırma özelliklerini ortadan kaldırır. Ayrıca fermentasyon sırasında çayın rengindeki değişimi ve karakteristik aromanın oluşmasını sağlar (Carr, 1985; Praveen ve Suneetha, 2015).

Tekstil rnlerinin temizleme işlemi ağır kimyasalların kullanımını gerektirmektedir. Pektinaz gibi enzimlerin keşfedilmesi ile beraber sektör yavaşça evre dostu enzimatik temizleme işlemlerine yönelmeye başlamıştır. Biyo-ovalama adı verilen, selülozik olmayan kirlilikleri tekstil ipliklerinden uzaklaştırmaya yarayan yöntem pektinaz gibi spesifik enzimlerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir (Praveen ve Suneetha, 2014).

Geviş getiren hayvanlar için yem üretiminde pektinaz kullanımı yem viskozitesini azaltmakta ve besin maddelerinin ruminantlar tarafından emilimini arttırmaktadır. Bununla birlikte besin maddelerini enzimatik etki ile serbest bırakmakta ve dışkı miktarını ise azaltmaktadır (Praveen ve Suneetha, 2014).

Kağıtların geri dönüşümünde mevcut yöntemler çevreye zarar veren kimyasalların kullanılması ile sağlanmaktadır. Enzimler kullanılarak yapılan geri dönüşüm daha az kirletici, daha verimli ve enerji tasarrufludur. Bu işlemlerde pektinazlar ile beraber hemisellazlar, selülazlar ve lignolitik enzimler kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2009; Pathak ve ark., 2010; Xu ve ark., 2011).

2.6.7. Ksilanaz enzimi ve kullanım alanları

Ksilanazların substratı olan ksilan, bitki hücrelerinde önemli bir yapısal polisakkarittir ve dünyadaki tüm yenilenebilir organik karbonun yaklaşık üçte birini

oluşturan, doğada en bol bulunan ikinci polisakkarittir. Ksilanazlar, ksilandaki 1,4- β -D-ksilozidik bağlarının endo-hidrolizini katalize eden glikozidazlardır (Prade, 1995).

Çeşitli meyvelerden elde edilen meyve suları nişasta, pektin, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi polisakkaritlerin varlığından dolayı bulanık ve viskoz bir haldedir (Lee ve ark., 2006). Meyve sularının bu özellikleri ticari olarak istenmemekte ve toplum tarafından tercih edilmemektedir. Bu nedenle meyve sularının bulanıklığını ve viskozitesini ortadan kaldırmak amacıyla ksilanaz ve diğer farklı enzimler kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2014). Ksilanaz, meyve ve sebzelerden elde edilen suyun veriminin artırılmasına yardımcı olur. Ayrıca meyve sularının filtrelenebilirliğini arttırmaktan dolayı meyve suyunun viskozitesini azaltır (Biely, 1985). Ksilanazlar bira üretiminde mayadan elde edilen şekerlerin ekstraksiyon işlemini artırarak lezzette ve verimde artışa sebep olurlar (Garg ve ark., 2010).

Tahıl tanelerinin endosperm hücre duvarları arabinoksilanlar ile karışık formda bulunan, b-glukanlar, selülozlar, mannanlar ve galaktanlar gibi polisakkaritleri çok miktarda içerir. Bunların büyük çoğunluğunu arabinoksilanlar ve beta-glukanlar oluşturmaktadır (Longland ve ark., 1995). Yemlerin ksilanaz tedavisi, ruminantlar tarafından bitki hücre duvarı sindirimine yardımcı olan kaliteli silajlar üretilmesine olanak sağlamaktadır. Ksilanaz tedavisi, hayvan yemindeki besleyici şeker içeriğini artırarak inek ve diğer ruminantlarda sindirime yardımcı olur (Garg ve ark., 2010).

Ksilanaz ile ön ağartma teknolojisi endüstride ticari olarak kullanılmaktadır (Bajpai, 1999). Enzim destekli kağıt hamuru ağartma işleminde esas olarak kullanılanlar endo- β -ksilanazlardır (Viikari ve ark., 1994). Ksilanazlar, kağıt hamurunun lifleri üzerinde yeniden çökeltilmiş ksilanı hidrolize eder. Liflerin geçirgenliği, ligninin liflerden daha kolay çıkarılmasını sağlayan ksilanaz işlemi ile artar. Ksilanazın kullanımı ile klorlu ağartıcıların kullanımı azaltılarak çevre kirliliğinin önüne geçilir (Kantelinen ve ark., 1993).

Ksilanazlar tarımsal ve diğer lignoselülozik atıkların geri dönüştürülerek katma değerli ürünler üretilmesinde kullanılmaktadır. Bu işlem lignoselülozların delignifikasyonu, serbest şekerler üretmek için karbonhidrat polimerlerinin depolimerizasyonu ve son olarak etanol üretmek için basit şekerlerin fermentasyonu aşamalarından oluşmaktadır (Beg ve ark., 2001). Ksilanın, selülozu enzimlerin hidrolitik

etkilerinden koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle ksilanazın kullanımı ile selülozların hidrolitik potansiyeli arttırılarak parçalanması kolaylaştırılmaktadır (Hu ve ark., 2011).

Unlu mamüller endüstrisinden hamurun yumuşak ve hacimli olması üreticiler ve tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Ksilanaz uygulaması suda çözünürlüğü az olan hemiselülozun çözünürlüğünü arttırarak hamurun hacimli ve yumuşak olmasını sağlar (Rouau, 1993; Laurikainen ve ark., 1998; Jiang ve ark., 2005). Çeşitli üretim işlemlerinde ksilanazların kullanılması bromatlar gibi kimyasal katkı maddelerinin kullanımını azaltacak seviyededir (Kulkarni ve ark., 1999). Buğday nişastası ve glutenin endüstriyel olarak ayrılmasında ksilanazlar kullanılmaktadır (Biely, 2003).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Bu çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bakterioloji laboratuvarında stoklarında bulunan, Van ili ve civarında, bazı kültür ve yabancı tahıl bitkilerinden (Poaceae familyası) izole edilmiş endofit bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar

	İzolat	Konukçu	İzole Organ
1	G99Y1	Yabani Arpa	Yaprak
2	G99K3	Yabani Arpa	Kök
3	G99K1	Yabani Arpa	Kök
4	G96Y3	Buğday	Yaprak
5	G96Y2	Buğday	Yaprak
6	G96Y1	Buğday	Yaprak
7	G95Y2	Brom	Yaprak
8	G95Y1	Brom	Yaprak
9	G95S1	Brom	Sürgün
10	G93Y1	Brom	Yaprak
11	G92S2	Brom	Sürgün
12	G91Y2	Buğday	Yaprak
13	G91S3	Buğday	Sürgün
14	G91S2	Buğday	Sürgün
15	G91S1	Buğday	Sürgün
16	G105S1	Domuz Ayrığı	Sürgün
17	G101Y2	Kelt Kuyruğu	Yaprak
18	G90Y2	Yabani Buğday	Yaprak
19	G90Y1	Yabani Buğday	Yaprak
20	G90S1	Yabani Buğday	Sürgün

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar(devam)

	İzolat	Konukçu	İzole Organ
21	G88Y1	Tir Buğday	Yaprak
22	G88S1	Tir Buğday	Sürgün
23	G88K2	Tir Buğday	Kök
24	G88K1	Tir Buğday	Kök
25	G85K3	Buğday Anası	Kök
26	G85K2	Buğday Anası	Kök
27	G84Y1	Yabani Arpa	Yaprak
28	G83K1	Buğday	Kök
29	G83K1	Yabani Arpa	Kök
30	G83S3	Buğday	Sürgün
31	G83S2	Buğday	Sürgün
32	G83S1	Buğday	Sürgün
33	G82Y1	Gramine	Yaprak
34	G82S2	Gramine	Sürgün
35	G82S1	Gramine	Sürgün
36	G82K2	Gramine	Kök
37	G81Y1	Yabani Çavdar	Yaprak
38	G81K2	Yabani Çavdar	Kök
39	G81K1	Yabani Çavdar	Kök
40	G80S1	Yabani Çavdar	Sürgün
41	G80K3	Yabani Çavdar	Kök
42	G80K1	Yabani Çavdar	Kök
43	G79Y4	İki Sıralı Arpa	Yaprak
44	G79Y3	İki Sıralı Arpa	Yaprak
45	G79Y2	İki Sıralı Arpa	Yaprak
46	G79Y1	İki Sıralı Arpa	Yaprak
47	G79S1	İki Sıralı Arpa	Sürgün
48	G79K3	İki Sıralı Arpa	Kök
49	G79K1	İki Sıralı Arpa	Kök
50	G75K2	Arpa	Kök

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar(devam)

	İzolat	Konukçu	İzole Organ
51	G75K1	Arpa	Kök
52	G72S1	Buğdayanası	Sürgün
53	G71K1	Arpa	Kök
54	G70K2	Arpa	Kök
55	G69S2	Gramine	Sürgün
56	G69S1	Gramine	Sürgün
57	G68K3	Poa	Kök
58	G68K2	Poa	Kök
59	G42K2	Buğday	Kök
60	G120S3	Hanım Tarağı	Sürgün
61	G120S2	Hanım Tarağı	Sürgün
62	G120S1	Hanım Tarağı	Sürgün
63	G119Y2T	Çipil	Yaprak
64	G119Y1T	Çipil	Yaprak
65	G119S1	Çipil	Sürgün
66	G118Y1T	Acem Salkımı	Yaprak
67	G118S2T	Acem Salkımı	Sürgün
68	G118S1	Acem Salkımı	Sürgün
69	G118K1T	Acem Salkımı	Kök
70	G118K1	Acem Salkımı	Kök
71	G117Y1T	Çipil	Yaprak
72	G117K1	Çipil	Kök
73	G116S2T	Dere Salkımı	Sürgün
74	G116S2	Dere Salkımı	Sürgün
75	G116S1T	Dere Salkımı	Sürgün
76	G116K1T	Dere Salkımı	Kök
77	G115K1T	Acem Salkımı	Kök
78	G114Y3	Yabani Çavdar	Yaprak
79	G114Y1	Yabani Çavdar	Yaprak
80	G114S1T	Yabani Çavdar	Sürgün

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar(devam)

	İzolat	Konukçu	İzole Organ
81	G113Y3	Buğday	Yaprak
82	G113Y2	Buğday	Yaprak
83	G113S2	Buğday	Sürgün
84	G113S2T	Buğday	Sürgün
85	G113S1	Buğday	Sürgün
86	G113K2	Buğday	Kök
87	G113K1	Buğday	Kök
88	G112K3	Yabani Çavdar	Kök
89	G111S1	Kelt Kuyruğu	Sürgün
90	G111K3	Kelt Kuyruğu	Kök
91	G111K2	Kelt Kuyruğu	Kök
92	G108S2	Yabani Arpa	Sürgün
93	G107Y2	Buğday	Yaprak
94	G107Y1	Buğday	Yaprak
95	G107S2	Buğday	Sürgün
96	G107S1	Buğday	Sürgün
97	G106Y1	Buğday	Yaprak
98	G106S2	Buğday	Sürgün
99	G106S1	Buğday	Sürgün
100	G106K1	Buğday	Kök
101	G105Y1	Domuz Ayrığı	Yaprak
102	G105K3	Domuz Ayrığı	Kök
103	G105K2	Domuz Ayrığı	Kök
104	G102K4	Çayır Arpası	Kök
105	G102K3	Çayır Arpası	Kök
106	G102K2	Çayır Arpası	Kök
107	G102K1	Çayır Arpası	Kök
108	G101Y4	Kelt Kuyruğu	Yaprak
109	G101Y3	Kelt Kuyruğu	Yaprak

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar(devam)

	İzolat	Konukçu	İzole Organ
110	G101Y1	Kelt Kuyruğu	Yaprak
111	G101K1	Kelt Kuyruğu	Kök
112	G100Y3	Çayır Yumağı	Yaprak
113	G100Y2	Çayır Yumağı	Yaprak
114	G100Y1	Çayır Yumağı	Yaprak
115	G100S1	Çayır Yumağı	Sürgün
116	G100K1	Çayır Yumağı	Kök
117	G99Y2	Yabani Arpa	Yaprak
118	G99K2	Yabani Arpa	Kök
119	G92S1	Brom	Sürgün
120	G91Y1	Buğday	Yaprak
121	G91K1	Buğday	Kök
122	G79K2	İki Sıralı Arpa	Kök
123	G118S1T	Acem Salkımı	Sürgün
124	G116S1	Dere Salkımı	Sürgün
125	G114Y2T	Yabani Çavdar	Yaprak
126	G114Y2	Yabani Çavdar	Yaprak
127	G111K1	Kelt Kuyruğu	Kök
128	G107K1	Buğday	Kök

3.2. İzolatların Geliştirilmesi

%20 gliserol içeren Nutrient sıvı besiyerinde -80°C’de saklanan saf kültürlerin geliştirilmesi için kullanılan Nutrient Agar besiyerinin Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların geliştirilmesi için kullanılan Nutrient Agar besiyerinin bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Nutrient Agar	Tripton	10 g
	Maya Özütü	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	15 g

3.3. Enzim Aktivitelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi

3.3.1. Proteaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Carrim ve ark. (1988)'nın bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. İzolatların tümüne proteaz enzimi üretimi için %1 (g/l) yağsız süt tozu içeren Nutrient Agar hazırlanmıştır. Bunun için süt tozu dışındaki besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Süt tozu (10 g/100 ml) ayrıca 110°C'de 5 dakika 2 defa sterilize edilerek ve 45°C'ye kadar soğutulup, temel besiyerlerine aseptik koşullarda ilave edilerek iyice karıştırılmıştır (Çizelge 3.3). Daha sonra eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Çözünabilir süt tozu içeren proteaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen izolatlar, 25 °C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.1 M HCl solüsyonundan 2 ml petrilere yüzeyine dökülerek, koloniler etrafında şeffaf zon oluşumu değerlendirilmiştir. Proteaz aktivitesine sahip izolatlarda şeffaf bir zon oluşumu meydana gelmiş ve bunlar proteaz aktivitesine sahip pozitif suşlar olarak seçilmişlerdir (Carrim ve ark., 2006).

Çizelge 3.3. İzolatların proteaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L)
	Nutrient Broth	8 g
Proteaz Ortamı	Skim Milk	10 g
	Agar	15 g

3.3.2. Amilaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Amilaz aktivitesi Hankin ve Anagnostakis (1975)'in bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. İzolatların tümüne Amilaz enzimi üretimi için %1 çözünabilir nişasta içeren Nutrient Agar hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Çözünabilir nişasta içeren amilaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen suşlar 25 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petriye lügol çözeltisi (%1'lik iyot çözeltisi) dökülerek

boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Amilaz aktivitesine sahip suşlarda koyu mavi zemin üzerinde koloni çevresinde şeffaf bir zon oluşumu meydana gelmiş ve bu suşlar amilaz aktivitesine sahip pozitif suşlar olarak seçilmişlerdir.

Çizelge 3.4. İzolatların amilaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L)
Amilaz Ortamı	Nutrient Broth	8 g
	Çözünebilir Nişasta	10 g
	Agar	15 g

3.3.3. Lipaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Lipaz aktivitesi Hankin ve Anagnostakis (1975)'in bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla lipaz ortamı hazırlanmıştır. Lipaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): Nutrient Broth 8 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, agar 15 g, pH 6.0 ve 20 ml Tween 20 (Çizelge 3.5). Lipaz ortamı 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra besiyeri içeriklerinden ayrı olarak sterilize edilen Tween 20 lipaz ortamlarına ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu besiyerleri petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. İzolasyonu gerçekleştirilen suşların lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla lipaz ortamlarına nokta ekimi yapılmış ve suşlar gelişme sıcaklıklarında 2-3 gün inkübe edilerek koloni çevresinde açık renkte opak zon oluşumu meydana gelen suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.5. İzolatların lipaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 6.0)
Lipaz Ortamı	Nutrient Broth	10 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g
	Agar	15 g
	Tween 20	20 ml

3.3.4. Selülaaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Selülaaz aktivitesi Amore ve ark. (2015)'nın bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle selülaaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla selülaaz ortamı hazırlanmıştır. Selülaaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 1 g, MgSO_4 0.5 g, yeast extract 0.5 g, glucose 1 g, Karboksimetilselüloz (CMC) 5 g, Agar 15 g (Çizelge 3.6). Selülaaz ortamında yer alan bileşenlerin distile suda tamamen çözülmesinden sonra ortam 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra hazırlanan besiyerleri eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülmüştür. İzole edilen suşların selülaaz aktivitesinin belirlenebilmesi için selülaaz ortamına nokta ekimi yapılmış ve 25°C 'de 5-8 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda petrilere önce %0.2'lik (w/v) Kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra ise petrilere 5 M NaCl çözeltisi ilave edilerek yıkanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Kırmızı zemin üzerinde, koloni çevresinde açık sarı renk zon oluşan koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirilmişlerdir.

Çizelge 3.6. İzolatların selülaaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L)
Selülaaz Ortamı	NaNO_3	1 g
	KH_2PO_4	1 g
	KCl	1 g
	MgSO_4	0.5 g
	Maya Özütü	0.5 g
	Glikoz	1 g
	Karboksimetilselüloz (CMC)	5 g
	Agar	15 g

3.3.5. Ksilanaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Ksilanaz aktivitesi Amore ve ark. (2015)'nın bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ksilanaz ortamı hazırlanmıştır. Ksilanaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l):

NaNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 1 g, MgSO₄ 0.5 g, yeast extract 0.5 g, glucose 1 g, agar 15 g, Ksilan 5 g (Çizelge 3.7). Ksilanaz ortamının bileşenleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra aseptik koşullarda steril petrilere 20’şer ml dökülerek katılaşması beklenmiştir. İzolatlar ksilan içeren besiyerine ekildikten sonra 2-4 gün 25°C’de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda petriye %0.1’lik (w/v) kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika süreyle boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için petriye 5 M NaCl çözeltisi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kırmızı zemin üzerinde koloni çevresinde açık renkte zon oluşan suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.7. İzolatların ksilanaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L)
Ksilanaz Ortamı	NaNO ₃	1 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	KCl	1 g
	MgSO ₄	0.5 g
	Maya Özütü	0.5 g
	Glikoz	1 g
	Ksilan	5 g
	Agar	15 g

3.3.6. Pektinaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Pektinaz aktivitesi Kobayashi ve ark. (1999)’nın bildirmiş olduğu yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle pektinaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla pektinaz ortamı hazırlanmıştır. Pektinaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): Maya ekstraktı 2 g, Amonyumsülfat 2 g, Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3g, Pektin 5 g, Agar 15 g (Çizelge 3.8). Pektinaz ortamının içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril besiyeri aseptik koşullarda petrilere 20’şer ml dökülerek katılaşması beklenmiştir. İzolatların nokta ekimleri yapıldıktan sonra 25°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Petriye %1’lik setiltrimetil amonyum bromit (CTAB) çözeltisi eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmişlerdir. Süre

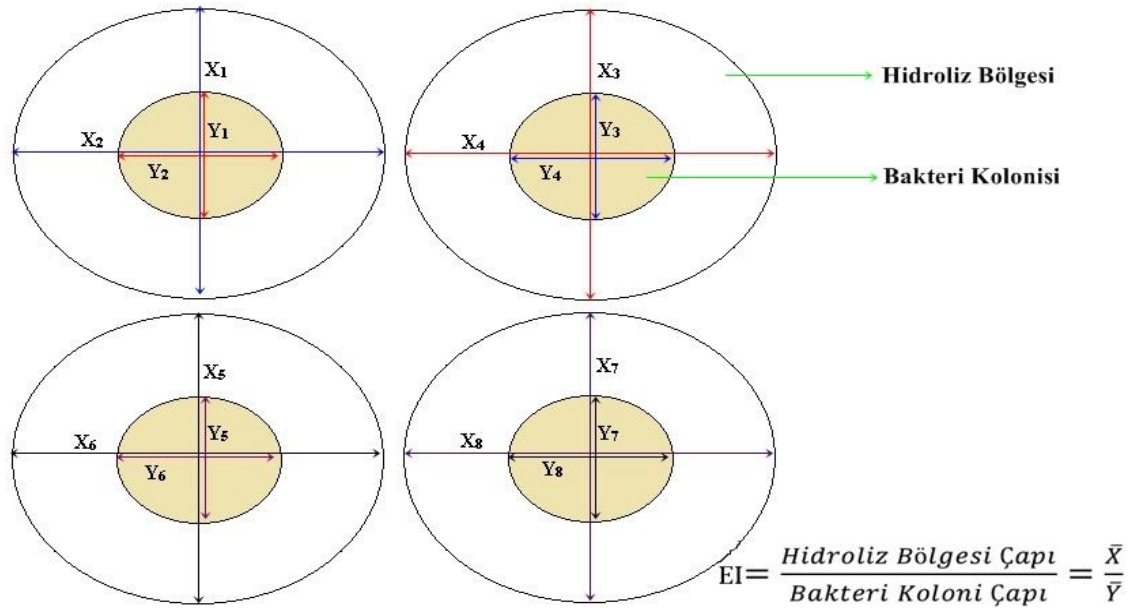
sonunda koloni çevresinde şeffaf zon oluşumu meydana gelen suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.8. İzolatların pektinaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan besiyeri bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L)
Pektinaz Ortamı	Maya Özütü	2 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
	Na ₂ HPO ₄	6 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	Pektin	5 g
	Agar	15 g

3.4. İzolatların Enzimatik İndekslerinin Belirlenmesi

İzolatlar için, her bir enzim aktivitesinin Enzim İndeksi (EI) bölüm 3.2.2’ de belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda alınan ölçümler kullanılarak hesaplanmıştır. Enzim İndeksleri, ilgili testte ölçülen ortalama şeffaf zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak ifade edilmiştir (Castro ve ark., 2006; Jena ve Rath., 2013; Castro ve ark., 2014).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan izolatların enzim indekslerinin (EI) hesaplanması

3.5. Bakterilerin Kısmi 16S rRNA Dizi Analizi ile Moleküler Tanımlanmasının Yapılması

İzolatların katı seçici besiyerlerinde enzim aktivitelerinin belirlenmesinden sonra farklı zon çapları veren, 17 adet izolat tanı işlemleri için seçilmiştir. Kısmi 16S rRNA baz dizisinin belirlenmesi yöntemi ile bakterilerin tanısı; DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması, PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve bu sıranın veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmuştur.

3.5.1. DNA izolasyonu

PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak için, ilgili izolatlardan total DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bunun için yaklaşık 10^7 CFU/mL yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 2 ml alınarak 10 dk kaynatılmış ve santrifüjlenerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır (Newton, 1995). Total DNA içeren supernatant temiz bir tüpe transfer edilerek, PZR reaksiyonlarında kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonlarında 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1492r (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') evrensel primer çifti kullanılmıştır (Lane ve ark., 1991). İzole edilen DNA'daki 16S rRNA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması amacıyla, her bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki PZR karışım hazırlanmış ve reaksiyonlar çizelge 3.9'da verildiği gibi gerçekleştirilmiştir;

PZR karışımı;

- 7.5 µl kalıp DNA
- 5 µl PZR Tamponu (10X)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2.5 µl Taq DNA polimeraz

- 4 µl dNTP karışımı (0.3 mM)
- 5 µl 27f primerinden (20 pmol)
- 5 µl 1492r primerinden (20 pmol)
- 20 µl steril distile su

Çizelge 3.9. 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95°C	5 dk	1
94°C	1 dk	
55°C	1 dk	30
72°C	2 dk	
72°C	10 dk	1

3.5.3. PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

5 µL PZR ürününe 1 µL jel yükleme tamponu eklenip, 1X TAE ile hazırlanmış %1'lik agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. PZR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için agaroz jeldeki ilk kuyucuğa 100bp DNA marker yüklenmiştir. Jel 100 voltta 1 saat yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanarak UV ışığı altında incelenmiştir.

3.5.4. PZR ürünlerinin sekans analizi

PZR ürünleri Yeni Nesil Dizileme (New Generation Sequencing) tekniği kullanılarak Sentebiolab Biyoteknoloji (Ankara) şirketine hizmet alımı yolu ile yaptırılmıştır. Bu dizileme işlemi Miseq (İllumina) yeni nesil dizileme platformu ve Nextera XT kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıralama sonuçları ise Kit v2 300cy kullanılarak yine firma tarafından düzenlenmiştir. Elde edilen diziler “<https://www.ezbiocloud.net/>” adlı internet sayfasında yer alan veri tabanı ile karşılaştırılmış ve sonrasında diziler GenBank sitesine girişleri yapılarak “SRA accession” erişim numaraları alınmıştır. Filogenetik ağaçlar tekli genlere uyarlanmış DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) filogenomik veri hattı kullanılarak <http://ggdc.dsmz.de/> adresinde bulunan GGDC web sunucusu

tarafından oluşturulmuştur (Meier-Kolthoff ve ark., 2013a; Meier-Kolthoff ve ark., 2014). Çoklu dizi hizalaması “MUSCLE” ile yapılmış (Edgar, 2004) ve filogenetik ağaç Maximum Likelihood yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Stamatakis, 2014).

3.6. Verilerin Analizi

Tüm nitel enzim ölçüm deneyleri dörder tekrarlı ve her bir petri ölçümü ikişer tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır.

3.7. İstatistik Analiz

Çalışmada elde edilen enzimatik indeks verilerinin istatistik analizinde, SAS 9.4 (SAS, 2014) paket programı kullanılmıştır. Gruplara ait ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde genel doğrusal model (GLM) analizi yapılarak, gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.



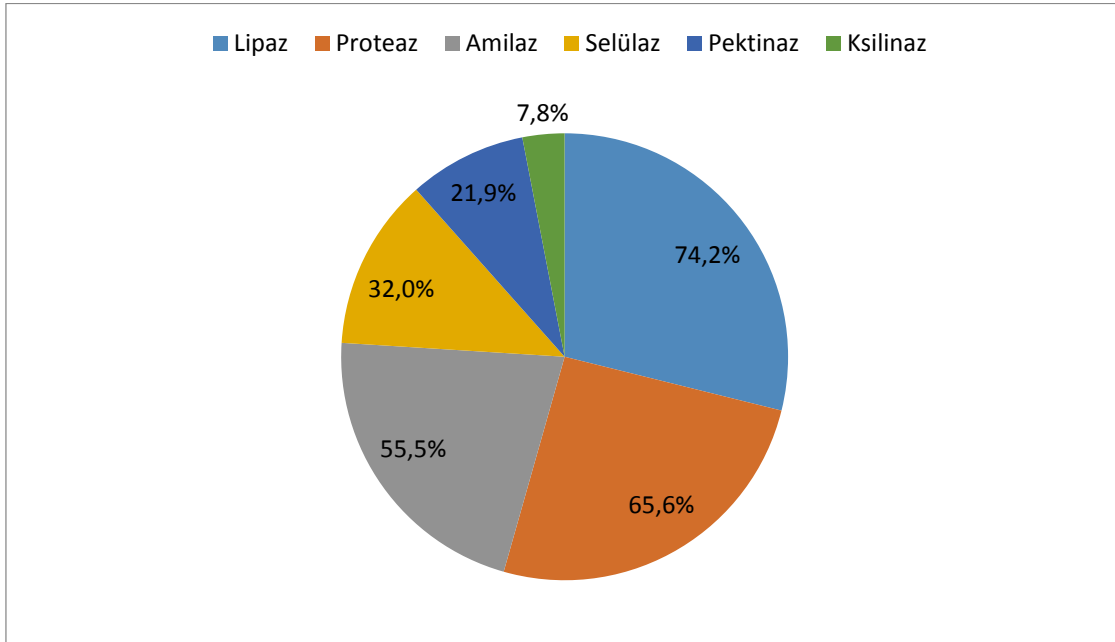
4. BULGULAR

4.1. Enzim Aktivitelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi

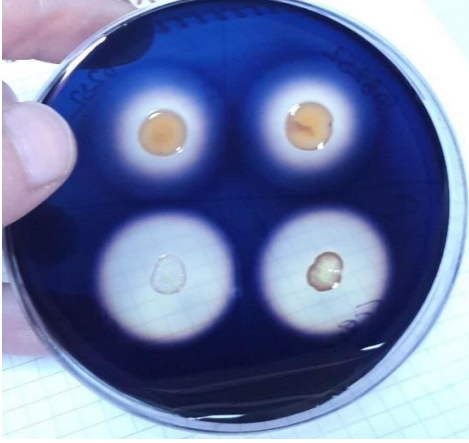
Bu çalışmada, Van gölü havzası içerisinde, farklı bölgelerden, çeşitli kültür ve yabancı tahlil bitkilerinin sağlıklı kök, sürgün ve yaprak bölgelerinden daha önce izolasyonu yapılan toplam 128 endofit bakteri izolatı kullanılmıştır.

25°C’de gelişebilen toplam 128 adet izolat 3.2.2.’de belirtildiği gibi katı besiyerinde proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, ksilanaz ve pektinaz enzimlerini üretme yetenekleri açısından incelenmiştir. Şekil 4.2’de bu enzimleri ürettiği belirlenen bazı izolatların agarlı besiyerinde enzimatik aktivitelerine ait fotoğraflar verilmiştir.

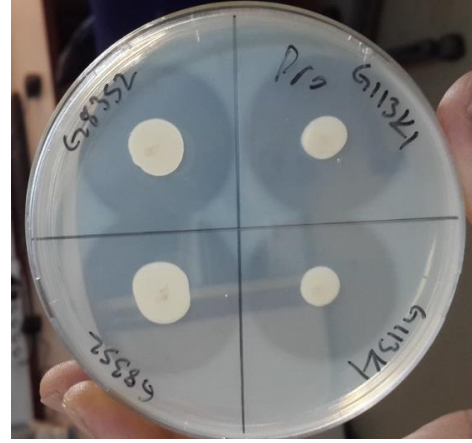
Test edilen 128 suşdan 95’inin lipaz, 84’ünün proteaz, 71’inin amilaz, 41’nin selüloz, 28’inin pektinaz, 10’ununda ksilanaz, ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların içerisinde 6 enzimi üreten 1, 5 enzimi üreten 8, 4 enzimi üreten 16, 3 enzimi üreten 37, 2 enzimi üreten 41, 1 enzimi üreten 19 ve hiç enzim üretmeyen 8 tane suş olduğu belirlenmiştir.



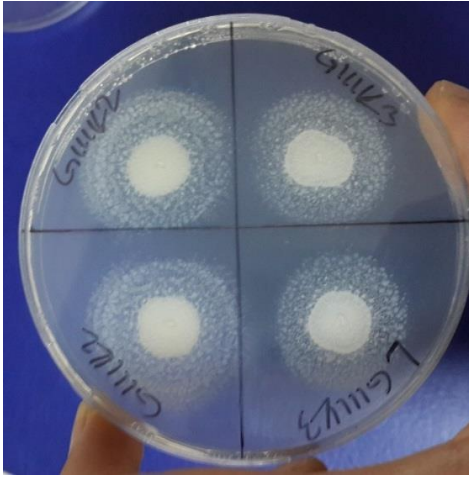
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan 128 endofit bakteri izolatının enzim üretim yüzdeleri.



A



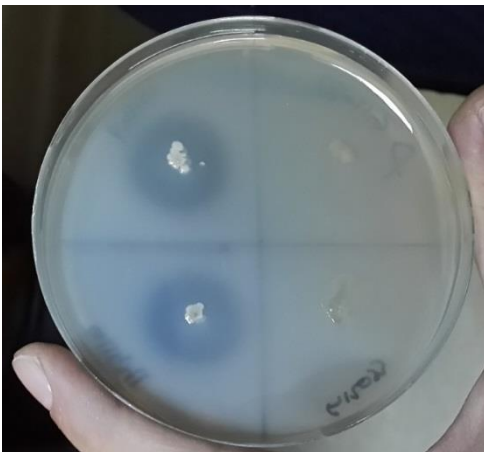
B



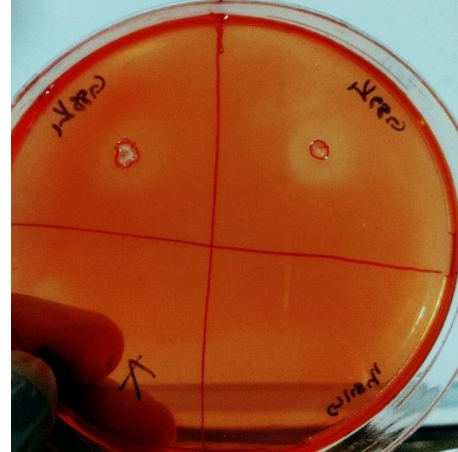
C



D



E



F

Şekil 4.2. Bazı izolatların ayırteci besiyerlerindeki enzim aktivitelelerini gösteren örnek fotoğraflar. (A: Amilaz, B: Proteaz, C: Lipaz, D: Selölaz, E: Pektinaz, F: Ksilanaz)

4.2. İzolatların Enzimatik İndeks Sonuçları

İzolatlar için, her bir enzim aktivitesinin Enzim İndeksi (EI) çizelge 4.1’de verilmiştir.

4.3. Moleküler Tanımlama İçin İzolat Seçim Sonuçları

Enzim indekslerinin belirlenmesinden sonra, enzimlerden en az bir tanesi için gelecek vaat eden 19 izolat ile bu enzimlerin hiçbirini üretmeyen 1 izolat 16S rRNA sekanslama yöntemi yolu ile tanı işlemleri için seçilmiştir (Çizelge 4.2).



Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri

Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)						
İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G100K1	2.92±0.11 ^{abcqrstuvwxyz}	-	-	-	-	-
G100S1	2.40±0.03 ^{abcdefghxyz}	1.65±0.17 ^{abuvwxyz}	1.36±0.04 ^{abxyz}	-	-	-
G100Y1	3.40±0.12 ^{ijklmnopqrstuv}	6.96±0.54 ^b	2.18±0.08 ^{lmnopq}	7.02±0.46 ^{def}	-	-
G100Y2	3.02±0.32 ^{opqrstuvwxy}	1.84±0.07 ^{abstvwxyz}	1.36±0.08 ^{abxyz}	-	-	-
G100Y3	2.81±0.03 ^{abcderstvwxyz}	3.02±0.25 ^{ijklmnopqrstu}	1.61±0.05 ^{tuvwxyz}	-	-	-
G101K1	1.88±0.12 ^{ghijk}	2.42±0.18 ^{abmnopqrstvwxyz}	3.17±0.21 ^{de}	4.55±0.95 ^{ghij}	-	-
G101Y1	2.86±0.08 ^{abcdqrstvwxyz}	3.44±0.29 ^{ghijklmno}	1.67±0.12 ^{stvwxy}	-	-	-
G101Y2	-	5.63±0.38 ^{cd}	-	-	-	-
G101Y3	1.95±0.07 ^{ghijk}	1.90±0.05 ^{abstvwxyz}	-	-	-	-
G101Y4	3.25±0.12 ^{klmnopqrstuv}	2.05±0.05 ^{abqrstvwxyz}	-	-	-	-
G102K1	1.62±0.03 ^{ijk}	-	-	-	-	-
G102K2	2.26±0.08 ^{abcdefghijz}	7.00±0.68 ^b	-	-	-	-
G102K3	4.07±0.37 ^{defghi}	-	-	-	3.39±0.15 ^{cd}	-
G102K4	2.22±0.09 ^{abcdeghk}	3.46±0.21 ^{ghijklmno}	1.41±0.02 ^{abwxyz}	-	-	1.67±0.01 ^{ab}
G105K2	-	2.00±0.11 ^{abqrstvwxyz}	1.43±0.08 ^{abvwxyz}	2.42±0.11 ^{klm}	1.79±0.15 ^{ghi}	-
G105K3	3.51±0.48 ^{ghijklmnopqrs}	-	-	4.46±0.20 ^{ghij}	3.92±0.34 ^{abc}	-
G105S1	-	-	-	-	-	-
G105Y1	7.29±0.71 ^a	1.87±0.34 ^{abstvwxyz}	3.03±0.29 ^{def}	12.75±1.38 ^a	3.81±0.38 ^{abcd}	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)			
			AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G106K1	2.68±0.06 ^{abcdefvwxyz}	-	2.50±0.13 ^{hijklmn}	-	-	-
G106S1	3.16±0.04 ^{lmnopqrstuvw}	1.67±0.08 ^{abuvwxyz}	-	-	-	-
G106S2	3.72±0.29 ^{fghijklmno}	2.72±0.18 ^{lmnopqrstuvwxyz}	1.96±0.07 ^{pqrstu}	-	-	-
G106Y1	3.81±0.16 ^{efghijklm}	-	-	4.89±0.20 ^{ghı}	2.24±0.11 ^{fgh}	-
G107K1	-	2.41±0.14 ^{abmnopqrstuvwxyz}	-	-	-	-
G107S1	-	2.80±0.28 ^{klmnopqrstuvwxy}	-	2.70±0.71 ^{jklm}	-	1.64±0.32 ^{ab}
G107S2	3.08±0.03 ^{mnopqrstuvw}	1.94±0.05 ^{abrstuvwxyz}	1.19±0.03 ^{abz}	-	-	-
G107Y1	2.20±0.18 ^{cdefghijk}	2.92±0.38 ^{jklmnopqrstuvw}	1.44±0.08 ^{abvwxyz}	-	-	2.88±0.13 ^a
G107Y2	3.26±0.09 ^{klmnopqrstuv}	7.33±0.67 ^b	2.68±0.27 ^{fghijk}	4.95±0.30 ^{ghı}	-	-
G108S2	-	2.56±0.38 ^{ablmnopqrstuvwxyz}	2.27±0.13 ^{klmnopq}	-	1.46±0.10 ^{ghı}	-
G111K1	-	3.63±0.10 ^{fghijklmn}	-	-	-	-
G111K2	3.10±0.14 ^{mnopqrstuvw}	2.35±0.06 ^{abmnopqrstuvwxyz}	1.11±0.01 ^b	-	-	-
G111K3	3.09±0.04 ^{mnopqrstuvw}	2.32±0.06 ^{abmnopqrstuvwxyz}	1.47±0.05 ^{abvwxyz}	-	-	-
G111S1	-	2.56±0.07 ^{ablmnopqrstuvwxyz}	2.32±0.16 ^{jklmnopq}	4.05±0.25 ^{hijk}	-	-
G112K3	2.87±0.16 ^{abcdqrstuvwxyz}	1.26±0.02 ^{ab}	-	-	-	-
G113K1	3.17±0.28 ^{lmnopqrstuvw}	2.12±0.03 ^{abopqrstuvwxyz}	1.36±0.02 ^{abxyz}	-	-	-
G113K2	2.13±0.02 ^{efghijk}	1.60±0.05 ^{abvwxyz}	-	-	-	-
G113S1	4.02±0.20 ^{defghij}	2.96±0.56 ^{jklmnopqrstuvw}	2.42±0.09 ^{jklmnop}	-	-	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)						
İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G113S2	3.27±0.08 ^{klmnopqrstuv}	2.23±0.14 ^{abopqrstuvwxyz}	2.54±0.09 ^{ghijklmn}	-	-	-
G113S2T	-	1.99±0.25 ^{abrstuvwxyz}	-	-	-	-
G113Y2	3.33±0.15 ^{jklmnopqrstuv}	2.49±0.17 ^{abmnopqrstuvwxyz}	1.54±0.10 ^{abuvwxyz}	-	-	-
G113Y3	5.12±0.07 ^b	3.15±0.13 ^{hijklmnopqrs}	4.70±0.17 ^{ab}	9.77±0.42 ^{bc}	3.48±0.29 ^{bcd}	1.75±0.25 ^{ab}
G114S1T	3.78±0.17 ^{efghijklmn}	-	-	9.53±0.64 ^{bc}	3.46±0.38 ^{bcd}	-
G114Y1	4.41±0.37 ^{cdef}	2.71±0.28 ^{lmnopqrstuvwxyz}	-	10.00±0.68 ^{bc}	3.78±0.22 ^{abcd}	-
G114Y2	-	-	-	-	-	-
G114Y2T	-	-	-	-	-	-
G114Y3	-	-	-	6.15±1.35 ^{efg}	2.94±0.11 ^{def}	-
G115K1T	2.19±0.67 ^{defghijk}	2.64±0.12 ^{lmnopqrstuvwxyz}	-	-	-	-
G116K1T	4.68±0.25 ^{bcd}	1.91±0.18 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	-
G116S1	-	-	-	-	-	-
G116S1T	1.51±0.13 ^k	1.36±0.10 ^{abz}	-	-	-	-
G116S2	3.97±0.22 ^{defghijk}	-	-	-	3.48±0.13 ^{bcd}	-
G116S2T	4.15±0.22 ^{cdefgh}	-	-	8.29±0.26 ^{cd}	3.07±0.14 ^{cde}	-
G117K1	-	2.67±0.28 ^{lmnopqrstuvwxyz}	1.86±0.12 ^{qrstuvw}	-	-	-
G117Y1T	3.22±0.13 ^{lmnopqrstuvw}	6.32±1.78 ^{cb}	2.81±0.01 ^{defghi}	2.46±0.12 ^{klm}	-	1.90±0.27 ^{ab}
G118K1	3.46±0.11 ^{hijklmnopqrstu}	2.68±0.08 ^{lmnopqrstuvwxyz}	1.85±0.06 ^{qrstuvw}	-	1.41±0.01 ^{hi}	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

Ortalama $\pm$ Std. Hata Mean $\pm$ Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)						
İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G118K1T	-	1.82 $\pm$ 0.12 ^{abstuvwxyz}	1.59 $\pm$ 0.25 ^{atuvwxyz}	8.48 $\pm$ 0.62 ^{cd}	-	-
G118S1	4.38 $\pm$ 0.40 ^{cdef}	3.86 $\pm$ 0.65 ^{efghijkl}	2.87 $\pm$ 0.34 ^{defghi}	-	-	-
G118S1T	-	-	-	-	-	-
G118S2T	4.22 $\pm$ 0.16 ^{cdefg}	4.46 $\pm$ 0.22 ^{defg}	1.69 $\pm$ 0.08 ^{rstuvw}	3.46 $\pm$ 0.19 ^{ijkl}	-	2.65 $\pm$ 0.41 ^{ab}
G118Y1T	1.94 $\pm$ 0.13 ^{ghijk}	2.62 $\pm$ 0.22 ^{almnopqrstuvwxyz}	1.16 $\pm$ 0.02 ^{abz}	4.01 $\pm$ 0.54 ^{hijk}	-	-
G119S1	2.06 $\pm$ 0.23 ^{fghijk}	1.35 $\pm$ 0.07 ^{abz}	-	-	-	-
G119Y1T	-	4.37 $\pm$ 0.15 ^{efgh}	1.29 $\pm$ 0.04 ^{abxyz}	7.50 $\pm$ 0.00 ^{de}	-	-
G119Y2T	-	4.37 $\pm$ 0.15 ^{efgh}	2.59 $\pm$ 0.25 ^{ghijklm}	2.08 $\pm$ 0.21 ^{lm}	-	-
G120S1	2.50 $\pm$ 0.12 ^{abcdefgwx}	-	1.60 $\pm$ 0.04 ^{tuvwxyz}	-	-	-
G120S2	-	-	-	4.20 $\pm$ 0.34 ^{hijk}	3.07 $\pm$ 0.14 ^{cde}	-
G120S3	2.93 $\pm$ 0.11 ^{abqstuvw}	1.53 $\pm$ 0.16 ^{abxyz}	-	-	-	-
G42K2	3.57 $\pm$ 0.20 ^{gijklmnop}	4.89 $\pm$ 0.22 ^{def}	2.68 $\pm$ 0.09 ^{fghijk}	2.66 $\pm$ 0.04 ^{ijklm}	1.76 $\pm$ 0.14 ^{ghi}	-
G68K2	-	3.61 $\pm$ 0.94 ^{fghijklm}	5.00 $\pm$ 0.00 ^a	-	-	-
G68K3	-	4.59 $\pm$ 0.34 ^{defg}	4.02 $\pm$ 0.19 ^c	5.10 $\pm$ 0.33 ^{ghi}	-	-
G69S1	-	5.01 $\pm$ 0.32 ^{de}	3.95 $\pm$ 0.25 ^c	3.65 $\pm$ 0.37 ^{hijkl}	-	-
G69S2	-	4.36 $\pm$ 0.66 ^{efgh}	4.79 $\pm$ 0.13 ^{ab}	1.93 $\pm$ 0.07 ^{lm}	-	-
G70K2	2.73 $\pm$ 0.34 ^{abcdefuwxyz}	7.24 $\pm$ 0.78 ^b	2.69 $\pm$ 0.04 ^{fghijk}	4.07 $\pm$ 0.13 ^{hijk}	2.34 $\pm$ 0.18 ^{efg}	-
G71K1	1.64 $\pm$ 0.05 ^{ijk}	1.84 $\pm$ 0.33 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
			Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)			
G72S1	4.01±0.19 ^{defghij}	2.38±0.03 ^{abmnopqrstuvwxy}	1.25±0.01 ^{abxyz}	-	-	-
G75K1	3.85±0.18 ^{efghijkl}	9.38±0.31 ^a	3.80±0.17 ^c	-	-	-
G75K2	-	-	4.49±0.05 ^b	3.42±0.26 ^{ijkl}	-	-
G79K1	3.28±0.25 ^{klmnopqrstuv}	-	2.44±0.04 ^{ijklmno}	-	-	-
G79K2	-	1.24±0.02 ^b	-	-	-	-
G79K3	3.97±0.18 ^{defghijk}	-	1.89±0.04 ^{qrstuv}	-	2.10±0.10 ^{ghı}	-
G79S1	2.75±0.03 ^{abcdeftuvwxyz}	-	-	-	-	-
G79Y1	1.85±0.09 ^{ghijk}	3.04±0.17 ^{ijklmnopqrst}	2.25±0.15 ^{klmnopq}	-	-	-
G79Y2	4.13±0.14 ^{defgh}	2.67±0.25 ^{lmnopqrstuvwxy}	1.67±0.03 ^{stuvwxy}	3.35±0.12 ^{ijklm}	1.63±0.03 ^{ghı}	-
G79Y3	2.80±0.14 ^{abcdestuvwxyz}	-	-	-	-	-
G79Y4	4.48±0.22 ^{cde}	-	2.95±0.08 ^{defgh}	-	-	-
G80K1	2.30±0.14 ^{abcde fghıyz}	4.09±0.26 ^{efghijk}	1.40±0.08 ^{abwxyz}	2.79±0.09 ^{ijklm}	-	-
G80K3	4.03±0.17 ^{defghij}	-	3.05±0.13 ^{def}	-	4.44±0.90 ^a	-
G80S1	-	-	3.80±0.08 ^c	7.27±1.05 ^{de}	-	-
G81K1	1.62±0.03 ^{ijk}	1.51±0.04 ^{abxyz}	-	-	-	-
G81K2	-	-	1.21±0.05 ^{abyz}	3.57±0.05 ^{ijkl}	-	-
G81Y1	-	2.07±0.14 ^{abpqrstuvwxy}	2.99±0.06 ^{defg}	5.51±0.58 ^{fgh}	1.57±0.14 ^{ghı}	-
G82K2	-	-	2.22±0.08 ^{lmnopq}	-	-	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selülaaz, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)						
İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G82S1	3.34±0.04 ^{ijklmnopqrstuv}	2.75±0.15 ^{lmnopqrstuvwxy}	-	-	-	-
G82S2	3.31±0.03 ^{ijklmnopqrstuv}	2.62±0.07 ^{almnopqrstuvwxyz}	1.51±0.23 ^{abuvwxyz}	-	1.91±0.09 ^{ghi}	-
G82Y1	1.86±0.16 ^{ghijk}	2.35±0.24 ^{abmnopqrstuvwxyz}	-	-	-	-
G83K1	3.55±0.16 ^{ghijklmnopqr}	2.19±0.20 ^{abopqrstuvwxyz}	1.37±0.02 ^{abxyz}	-	-	-
G83S1	1.65±0.04 ^{ijk}	-	-	-	-	-
G83S2	3.05±0.24 ^{nopqrstuvwx}	2.29±0.10 ^{abnopqrstuvwxyz}	1.13±0.02 ^{ab}	-	-	-
G83S3	2.85±0.05 ^{abcdqrstuvwxyz}	3.67±0.15 ^{fghijklm}	3.91±0.37 ^c	4.40±0.10 ^{ghij}	2.05±0.05 ^{ghi}	-
G84K1	-	1.49±0.03 ^{abxyz}	2.03±0.13 ^{opqrst}	-	-	-
G84Y1	1.54±0.02 ^{jk}	-	-	-	-	-
G85K2	3.49±0.04 ^{hijklmnopqrst}	-	-	-	-	-
G85K3	2.94±0.16 ^{aqrstuvwxyz}	4.32±0.16 ^{efghi}	2.76±0.20 ^{efghij}	-	-	-
G88K1	3.78±0.06 ^{efghijklmn}	1.90±0.11 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	2.88±0.38 ^a
G88K2	-	4.19±0.21 ^{efghij}	2.11±0.09 ^{nopqrs}	-	1.27±0.03 ¹	2.04±0.66 ^{ab}
G88S1	2.22±0.10 ^{bcdefghijk}	5.05±0.83 ^{de}	-	-	4.25±0.14 ^{ab}	-
G88Y1	1.95±0.13 ^{ghijk}	1.54±0.06 ^{abxyz}	-	-	-	-
G90S1	2.94±0.08 ^{abqrstuvwxyz}	6.79±2.01 ^b	3.23±0.09 ^d	5.02±0.27 ^{ghi}	-	-
G90Y1	-	3.30±0.23 ^{ghijklmnopqr}	2.29±0.20 ^{klmnopq}	-	-	-
G90Y2	3.46±0.15 ^{hijklmnopqrstu}	9.80±0.20 ^a	2.14±0.03 ^{mnpq}	6.10±0.16 ^{efg}	1.73±0.03 ^{ghi}	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selülaaz, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)						
İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G91K1	-	2.04±0.05 ^{abqrstuvwxyz}	-	-	-	-
G91S1	2.78±0.00 ^{abctestvwxyz}	2.31±0.16 ^{abnopqrstuvwxyz}	2.13±0.13 ^{nopqr}	3.39±0.09 ^{ijklm}	-	-
G91S2	-	1.49±0.06 ^{abxyz}	-	4.10±0.06 ^{hijk}	-	-
G91S3	4.82±0.08 ^{bc}	2.20±0.36 ^{abopqrstuvwxyz}	2.00±0.07 ^{opqrst}	10.83±1.46 ^b	3.32±0.15 ^{cd}	-
G91Y1	-	-	-	-	-	-
G91Y2	1.74±0.10 ^{hijk}	1.35±0.02 ^{abz}	-	-	-	-
G92S1	2.83±0.02 ^{abcdeqrstuvwxyz}	1.93±0.23 ^{abrstuvwxyz}	-	-	-	-
G92S2	-	-	3.04±0.06 ^{def}	-	-	-
G93Y1	-	-	-	-	1.67±0.19 ^{ghı}	-
G95S1	-	3.41±0.07 ^{ghijklmnop}	2.77±0.20 ^{efghij}	-	1.67±0.08 ^{ghı}	-
G95Y1	3.70±0.75 ^{fghijklmnop}	3.43±0.11 ^{ghijklmnop}	1.32±0.11 ^{abxyz}	3.29±0.35 ^{ijklm}	-	-
G95Y2	-	2.83±0.24 ^{klmnopqrstuvw}	2.79±0.22 ^{defghı}	-	-	-
G96Y1	4.33±0.15 ^{cdef}	2.97±0.22 ^{jklmnopqrstuv}	2.64±0.12 ^{fghijkl}	-	-	-
G96Y2	-	1.60±0.15 ^{abwxyz}	-	-	-	1.40±0.15 ^b
G96Y3	2.97±0.07 ^{pqrstuvwxyz}	2.01±0.07 ^{abqrstuvwxyz}	1.37±0.01 ^{abxyz}	-	-	1.77±0.19 ^{ab}
G99K1	-	3.36±0.18 ^{ghijklmnopq}	-	1.54±0.04 ^m	-	-
G99K2	-	1.91±0.00 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	-

Çizelge 4.1. İzolatların proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri (devam)

İZOLAT /ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G99K3	-	1.78±0.08 ^{abstuvwxyz}	-	2.80±0.00 ^{jklm}	-	-
G99Y1	2.74±0.06 ^{abcdefuvwxyz}	1.69±0.03 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	-
G99Y2	-	1.44±0.04 ^{abyz}	-	-	-	-

*Enzim İndeksleri, ilgili testte ölçülen ortalama şeffaf zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak hesaplanmıştır. Tüm ölçümler dört tekrarlı olarak yapılmıştır.

** Farklı harflerle ifade edilen gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir (p<0.05)

Çizelge 4.2. 16S rRNA dizi analizi için seçilmiş 20 adet izolatın proteaz, lipaz , amilaz, selüla, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimindeksleri.

İZOLAT/ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G91S3	4.82±0.08 ^{bc}	2.20±0.36 ^{abopqrstuvwxyz}	2.00±0.07 ^{opqrst}	10.83±1.46 ^b	3.32±0.15 ^{cd}	-
G90Y2	3.46±0.15 ^{hijklmnopqrstu}	9.80±0.20 ^a	2.14±0.03 ^{mnpq}	6.10±0.16 ^{efg}	1.73±0.03 ^{gh}	-
G90S1	2.94±0.08 ^{abqrstuvwxyz}	6.79±2.01 ^b	3.23±0.09 ^d	5.02±0.27 ^{gh}	-	-
G88S1	2.22±0.10 ^{bcdefghijk}	5.05±0.83 ^{de}	-	-	4.25±0.14 ^{ab}	-
G88K1	3.78±0.06 ^{efghijklmn}	1.90±0.11 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	2.88±0.38 ^a
G83S3	2.85±0.05 ^{abcdqrstuvwxyz}	3.67±0.15 ^{fghijklm}	3.91±0.37 ^c	4.40±0.10 ^{ghj}	2.05±0.05 ^{gh}	-

Çizelge 4.2. 16S rRNA dizi analizi için seçilmiş 20 adet izolatin proteaz, lipaz , amilaz, selülaaz, pektinaz ve ksilanaz aktivitesine ait enzimatik indeksleri(devam)

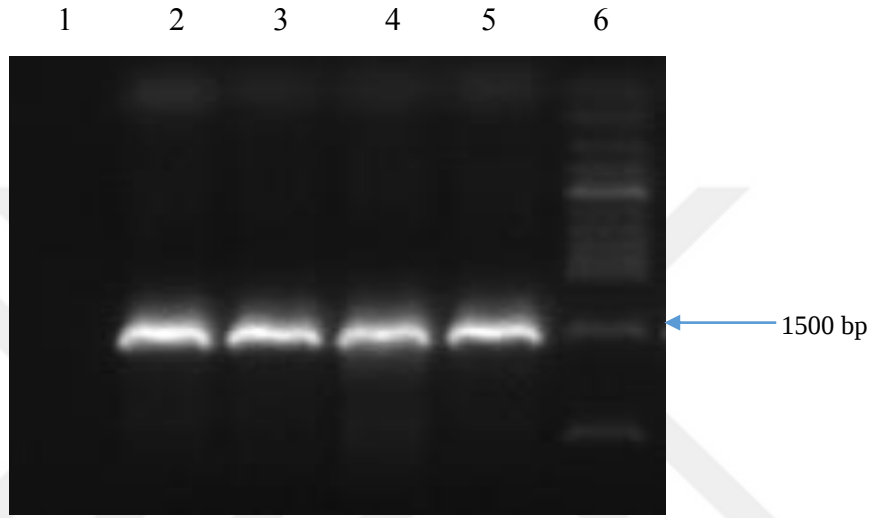
İZOLAT/ENZİM	PROTEAZ	LİPAZ	Ortalama ± Std. Hata Mean ± Std. Error.Error ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)			
			AMİLAZ	SELÜLAZ	PEKTİNAZ	KSİLİNAZ
G105Y1	7.29±0.71 ^a	1.87±0.34 ^{abstuvwxyz}	3.03±0.29 ^{def}	12.75±1.38 ^a	3.81±0.38 ^{abcd}	-
G105S1	-	-	-	-	-	-
G100Y1	3.40±0.12 ^{ijklmnopqrstuv}	6.96±0.54 ^b	2.18±0.08 ^{lmnopq}	7.02±0.46 ^{def}	-	-
G80K3	4.03±0.17 ^{defghij}	-	3.05±0.13 ^{def}	-	4.44±0.90 ^a	-
G70K2	2.73±0.34 ^{abcdefuwxyz}	7.24±0.78 ^b	2.69±0.04 ^{fghijk}	4.07±0.13 ^{hijk}	2.34±0.18 ^{efg}	-
G42K2	3.57±0.20 ^{gijklmnopq}	4.89±0.22 ^{def}	2.68±0.09 ^{fghijk}	2.66±0.04 ^{ijklm}	1.76±0.14 ^{ghi}	-
G119Y1T	-	4.37±0.15 ^{efgh}	1.29±0.04 ^{abxyz}	7.50±0.00 ^{de}	-	-
G118S2T	4.22±0.16 ^{cdefg}	4.46±0.22 ^{defg}	1.69±0.08 ^{rstuvw}	3.46±0.19 ^{ijkl}	-	2.65±0.41 ^{ab}
G117Y1T	3.22±0.13 ^{lmnopqrstuvw}	6.32±1.78 ^{cb}	2.81±0.01 ^{defghi}	2.46±0.12 ^{klm}	-	1.90±0.27 ^{ab}
G116K1T	4.68±0.25 ^{bcd}	1.91±0.18 ^{abstuvwxyz}	-	-	-	-
G114Y1	4.41±0.37 ^{cdef}	2.71±0.28 ^{lmnopqrstuvwxyz}	-	10.00±0.68 ^{bc}	3.78±0.22 ^{abcd}	-
G114S1T	3.78±0.17 ^{efghijklmn}	-	-	9.53±0.64 ^{bc}	3.46±0.38 ^{bcd}	-
G113Y3	5.12±0.07 ^b	3.15±0.13 ^{hijklmnopqrs}	4.70±0.17 ^{ab}	9.77±0.42 ^{bc}	3.48±0.29 ^{bcd}	1.75±0.25 ^{ab}
G107Y2	3.26±0.09 ^{klmnopqrstuv}	7.33±0.67 ^b	2.68±0.27 ^{fghijk}	4.95±0.30 ^{ghi}	-	-

*Enzim İndeksleri, ilgili testte ölçülen ortalama şeffaf zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak hesaplanmıştır. Tüm ölçümler dört tekrarlı olarak yapılmıştır.

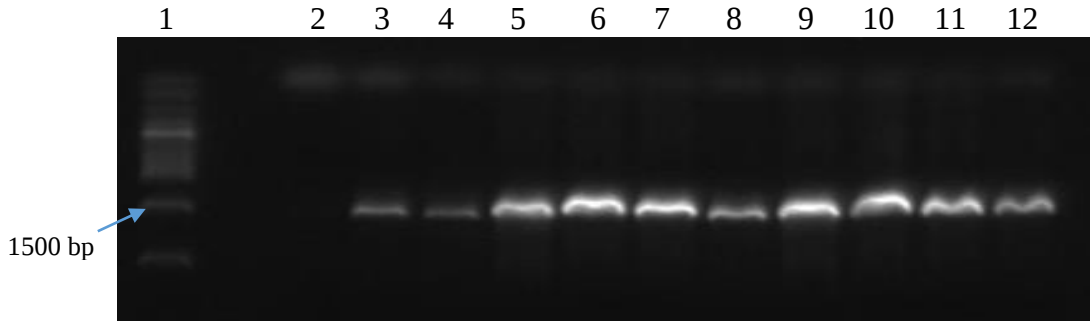
** Farklı harflerle ifade edilen gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir (p<0.05)

4.5. Seçilen İzolatların Moleküler Tanılanması

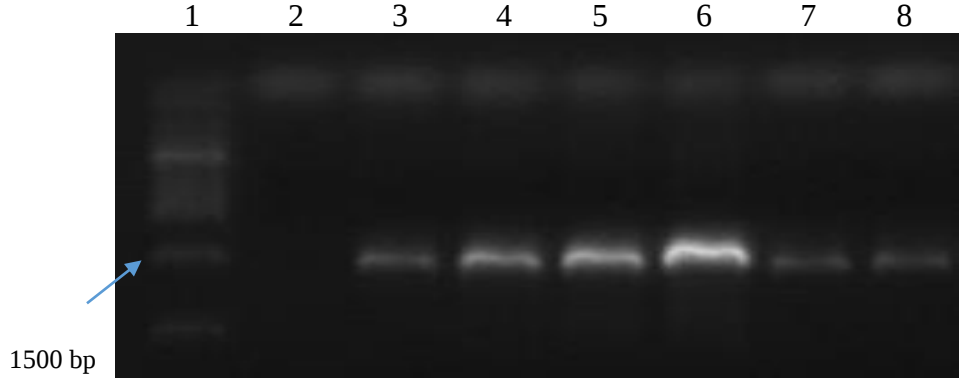
27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1492r (5'- TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') evrensel primer çifti kullanılarak çoğaltılan, 20 adet izolata ait, yaklaşık 1500 bp büyüklüğündeki 16S rRNA gen bölgeleri Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Seçilen izolatlardan bazılarının ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri (1- Negatif, 2- G90S1, 3- G107Y2, 4- G90Y2, 5- G113Y3, 6- Ladder).



Şekil 4.4. Seçilen izolatlardan bazılarının ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri (1-Ladder, 2- Negatif, 3- G100Y1, 4- G118S2T, 5- G70K2, 6- G80K3, 7- G105Y1, 8- G114Y1, 9- G83S3, 10- G42K2, 11- G105S1, 12- G117Y1T).



Şekil 4.5. Seçilen izolatlardan bazılarına ait, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri (1-Ladder, 2- Negatif, 3- G116K1T, 4- G91S3, 5- G88S1, 6- G88K1, 7- G119Y1T, 8- G114S1T).

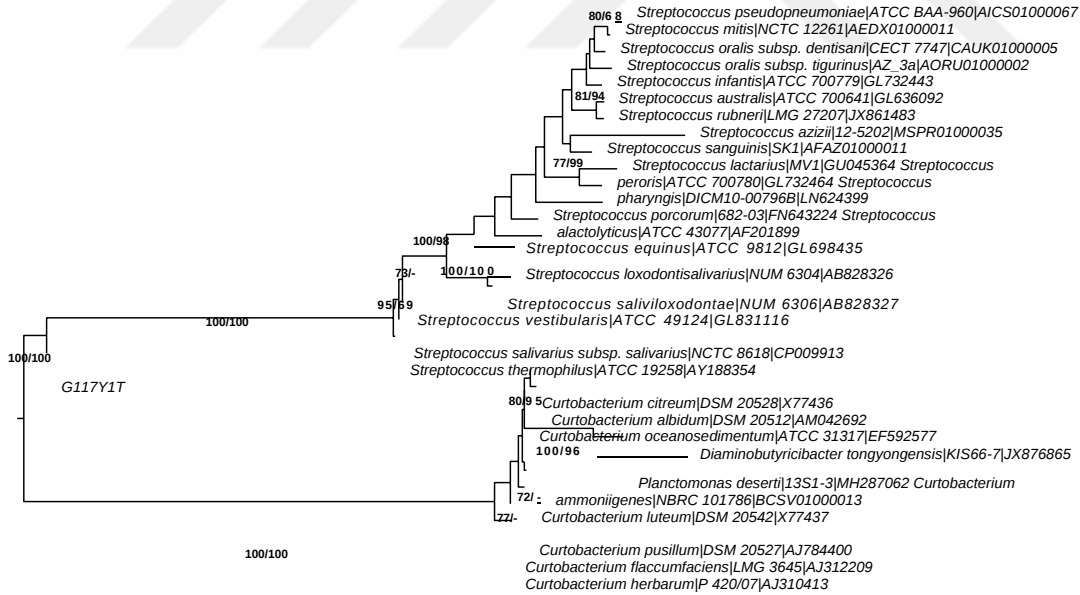
4.6. Dizi Analizi Sonuçları

Dizileme sonucunda, 17 izolatın kısmi 16S rRNA dizilemesi başarılı bir şekilde elde edilmiş, 3 adet izolatın dizileme işlemi sonuçsuz kalmıştır. Elde edilen diziler “<https://www.ezbiocloud.net/>” adlı internet sayfasında bulunan veri tabanı ile karşılaştırılmış ve Ezbiocloud GenBank sistemine girişleri yapılarak “SRA accession” erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.3).

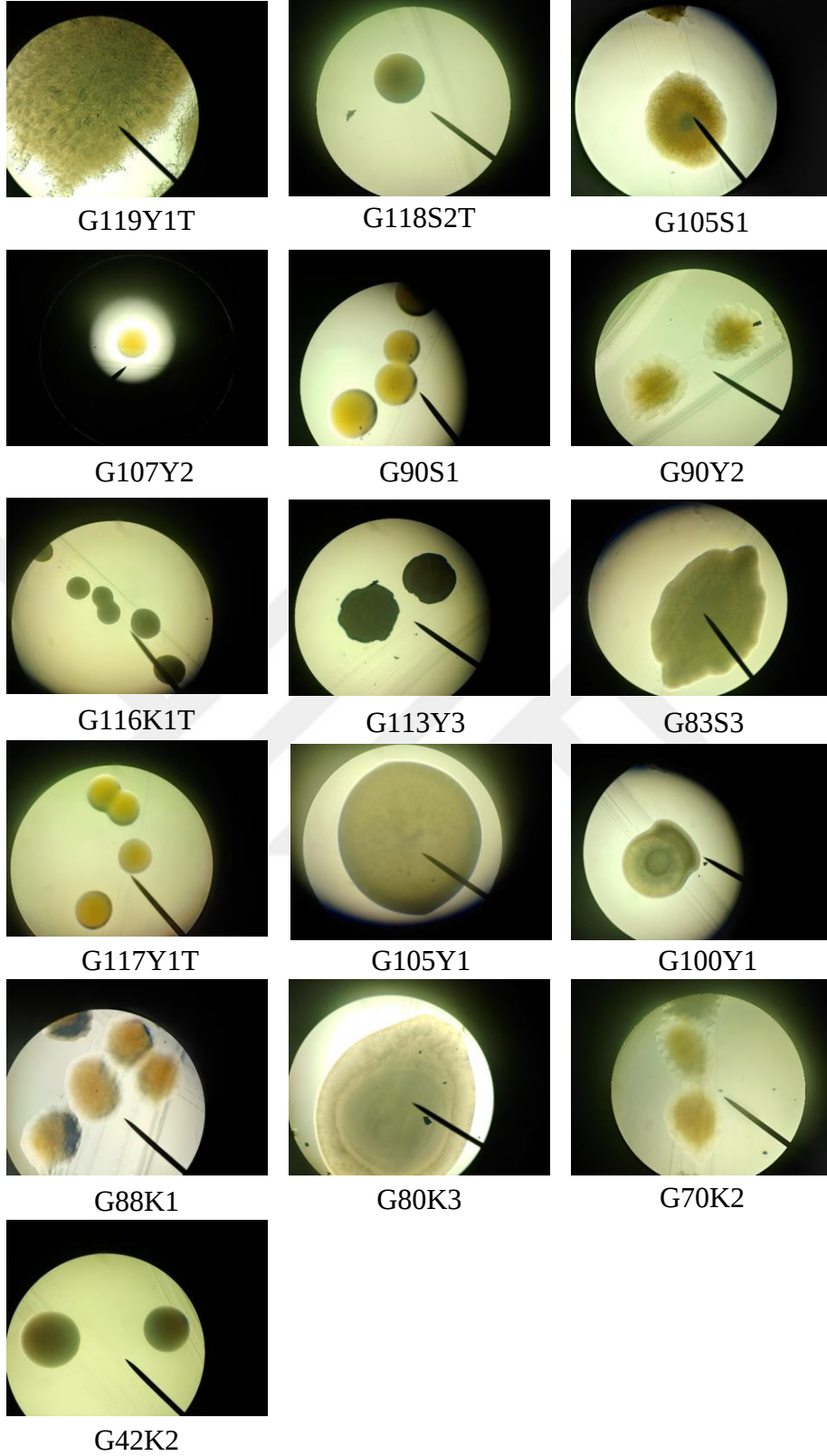
Çizelge 4.3. EzBioCloud veri tabanı kullanılarak yapılan dizi analizi sonuçlarına göre izolatların tanısı ve GenBank erişim numaraları

Tasks	Name	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy	Completeness (%)
	>G119Y1T	Bacillus toyonensis	BCT-7112	100.00	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	70.1
	>G118S2T	Pseudomonas congelans	DSM 14939	100.00	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	100.0
	>G117Y1T	Streptococcus thermophilus	ATCC 19258	90.93	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae;Streptococcus	100.0
	>G116K1T	Micrococcus luteus	NCTC 2665	99.58	Bacteria;Actinobacteria;Actinobacteria_c;Micrococcales;Micrococcaceae;Micrococcus	100.0
	>G113Y3	Bacillus halotolerans	ATCC 25096	99.93	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	100.0
	>G107Y2	Curtobacterium flaccumfaciens	LMG 3645	100.00	Bacteria;Actinobacteria;Actinobacteria_c;Micrococcales;Microbacteriaceae;Curtobacterium	100.0
	>G105Y1	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum	KCTC 13429	99.92	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus;Bacillus subtilis	84.5
	>G105S1	Bacillus idriensis	SMC 4352-2	99.58	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	100.0
	>G100Y1	Paenibacillus nuruki	T145-13ar	99.25	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	100.0
	>G90Y2	Paenibacillus tundrae	A10b	99.84	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	83.3
	>G90S1	Curtobacterium flaccumfaciens	LMG 3645	100.00	Bacteria;Actinobacteria;Actinobacteria_c;Micrococcales;Microbacteriaceae;Curtobacterium	100.0
	>G88S1	No hits found		0		0
	>G88K1	Pseudomonas orientalis	CFML 96-170	99.62	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	89.2
	>G83S3	Paenibacillus seodonensis	DCT19	99.23	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	88.0
	>G80K3	Paenibacillus xylanexedens	B22a	99.80	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	100.0
	>G70K2	Paenibacillus xylanexedens	B22a	99.80	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	100.0
	>G42K2	Chryseobacterium luteum	DSM 18605	99.44	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteriia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Chryseobacterium	100.0

Veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı veri analiz sonucunda, 17 adet izolata ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi 2 adet *Pseudomonas* sp. (G88K1, G118S2T), 1 adet *Micrococcus* sp. (G116K1T), 5 adet *Paenibacillus* sp. (G100Y1, G90Y2, G83S3, G80K3, G70K2), 1 adet *Streptococcus* sp. (G117Y1T), 2 adet *Curtobacterium* sp. (G107Y2, G90S1), 1 adet *Chryseobacterium* sp. (G42K2) ve 4 adet *Bacillus* sp. (G119Y1T, G105S1, G113Y3, G105Y1) cinslerine ait sonuç vermiştir. İzolatlar içerisinde G80K3 ve G70K2 izolatlarına ait dizi analizleri *Paenibacillus xylanexedens* suşu ile maksimum benzerlik göstererek örtüşmüşlerdir. Aynı şekilde G107Y2 ve G90S1 izolatlarına ait dizi analizleri de *Curtobacterium flaccumfaciens* sonucunu vermişlerdir. G88S1 izolatına ait dizi ise 16s veri tabanında hiçbir eşleşme göstermediği için hatalı dizileme olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca *Streptococcus thermophilus* ile %90.93 benzerlik oranı ile örtüşen G117Y1T izolatu potansiyel yeni tür olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.6). Tanımlaması yapılan 16 adet izolatın koloni fotoğrafları Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.6. G117Y1T izolatının 16S rRNA gen bölgesine göre oluşturulmuş filogenetik ağaç.



Şekil 4.7. Dizi sonuçları alınmış izolatların mikroskop altındaki koloni görünüşleri.
(Görüntüler 10X büyütme altında boyama yapılmaksızın alınmıştır).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamız Van Gölü havzasının belirli bölgelerinden toplanmış çeşitli kültür ve yabani tahıl bitkilerinden izolasyonu gerçekleştirilen endofit bakteri izolatlarının biyoteknolojik öneme sahip ekstraselüler enzimler açısından karakterizasyonuna yönelik yapılmış ilk çalışmadır.

Endofitik bakteriler, yaygın olarak bitki büyümesini teşvikeden rizobakteri (PGPR) olarak adlandırılan rizosferik bakterilerin doğal üyesidir. Bunlar aslında bitki konakçısının içsel dokularında yaşayabilme yeteneğini kazanmış uzmanlaşmış bir rizobakteri grubudur (Reinhold-Hurek ve Hurek, 1998). Dolayısıyla, endofitik bakteriler yüzeyi sterilize edilmiş bitki dokularından izole edilen ve konakçı bitkilerine belirgin bir şekilde zarar vermeyen bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Santoyo ve ark., 2016). Yeryüzünde var olan yaklaşık 300.000 bitki türünün bir veya daha fazla endofite ev sahipliği yaptığı düşünülmektedir (Ryan ve ark., 2008). Bu endofitler hem fungus hem de bakteri olabilir (Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011).

Literatürde, endofitik bakteriler farklı tipteki bitki konakçılarından izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bunlar arasında tarım bitkileri, çayır bitkileri, aşırı ortamlarda yetişen bitkiler ve yabani ve çok yıllık bitkiler bulunur (Afzal ve ark., 2019). Endofitik bakteriler kökler, saplar, yapraklar, tohumlar, meyveler, yumru kökler, ovüller ve nodüller dahil olmak üzere yerin altında ve üstünde bulunan farklı bitki kısımlarından izole edilmiştir (Senthilkumar ve ark., 2011). Endofitik bakteriler için uygulanan izolasyon prosedürü, endofit araştırmaları için anahtar rol oynamaktadır. Endofit bakterilerin izolasyonunda yüzey seterilizasyonu çok önem taşımaktadır. Endofitik bakterilerin izolasyonu için en yaygın yöntemlerden birisi tritürasyon yöntemidir. Bu süreç sodyum hipoklorit ve etanol de dahil olmak üzere farklı dezenfektanlar kullanarak yapılmaktadır (Gardner ve ark., 1982; Fisher ve ark., 1992; Hinton ve Bacon, 1995).

Literatürde endofit bakterilerin ekstraselüler enzim üretme potansiyellerine yönelik çalışmalar mevcuttur. Carrim ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada bir medikal bitki olan *Jacaranda decurrens*'in sürgün ve yapraklarından endofit bakteri izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu izolatlarda proteaz, amilaz, lipaz ve esteraz ekstraselüler enzim üretimini incelemişlerdir. Elde ettikleri izolatların 16S rRNA dizilemeleri ağırlıklı olarak

Bacillus sp. cinsine ait suşları tanımlarken *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.* ve *Actinomyces sp.* cinslerinin varlığını da ortaya koymuştur. Ayırteci katı besiyerleri kullanarak yaptıkları enzim taramaları sonucunda izolatların %60'nın proteaz, %60'nın amilaz, %40'nın lipaz ve %40'nın esteraz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada Cho ve ark. (2007), Kore'nin üç farklı bölgesinden topladıkları Ginseng bitkisinin köklerinden 63 endofitik bakteri izolatı elde etmiş ve bu izolatlar içinden 13 farklı cins tanımlanmıştır. Bu cinsler arasında *Microbacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudoclavibacter sp.*, *Erwinia sp.*, *Pectobacterium sp.* gibi cinsler bulunmaktadır. Bu bakteriler proteaz, selüloz, ksilanaz ve pektinaz enzimleri için ayırteci katı besiyerlerinde test edilmişlerdir. Pozitif enzim aktivite sonuçları çeşitlilik gösterse de, proteaz aktivitesi gösteren suş sayısı diğerlerine kıyasla daha fazla gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ise lipaz enzim aktivitesi gösteren suş sayısının daha fazla olduğu belirlenmiş ve sırasıyla bunu proteaz, amilaz, selüloz, pektinaz ve ksilanaz enzim aktivitelerinin takip ettiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada endofit bakterilerin antifungal özellikleri başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. Endofit bakteri izolatlarının ekstraselüler enzim üretimi ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada, bakteri ve fungus izolasyonu için çeşitli medikal bitkilerin kök, sürgün ve yaprak kısımları kullanılmıştır. Elde edilen izolatlar amilaz, proteaz, esteraz, lipaz, selüloz ve asparaginaz enzimleri açısından taranmışlardır. Yaptıkları denemelerde endofitik bakterilerin endofitik funguslara göre daha fazla enzim üretme potansiyelleri olduğunu göstermişlerdir (Jalgaonwalave ve Mohajan, 2011). Bu çalışmada izolatların moleküler tanımlaması yapılmamıştır.

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz, gerek izolatlarımızın filogenetik kimlikleri (Çizelge 4.3) gerekse enzim sonuçları (Şekil 4.2) tek tek her bir çalışma ile olmasa da, genel profil olarak literatür verileri ile tutarlılık göstermektedir. Moleküler tanımlamasını başarı ile yaptığımız 16 adet izolat *Firmicutes* (*Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*), *Proteobacteria* (*Pseudomonas sp.*), *Actinobacteria* (*Micrococcus sp.*, *Curtobacterium sp.*) ve *Bacteroidetes* (*Chryseobacterium sp.*) dört ana şubesi içinde gruplanmışlardır. Bu sonuçlar sadece yukarıda belirli sayıda örnekleri verilen ekstraselüler enzim amaçlı endofit bakteri çalışmaları ile değil aşağıda örneklerini vereceğimiz başka amaçlar doğrultusunda yapılmış diğer endofit çalışmalarının sonuçları ile de örtüşmektedir.

Tahıl bitkilerini (buğday, arpa vs.) endofit bakteri izolasyonları için kullanan çalışmalar da mevcuttur. Chavez ve ark. (2019), mısır ve buğday bitkilerinin kök kısımlarından toplam 136 adet endofit bakteri izolatu elde etmişler ve bu izolatları IAA (Indole-3-acetic acid) üretim ve PSI (Phosphorus solubilization index) kapasiteleri yönünden incelemişlerdir. Kayda değer sonuçlar aldıkları 41 izolatu 16S rRNA tanımlamaları, bu bakterileri *Proteobacteria* (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp. vs.) ve *Firmicutes* (*Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp.) şubeleri altında guruplandırmıştır.

Antimikrobiyal ve antioksidant özelliklerini araştırma amaçlı, *Aloe vera* bitkisinin kök, sürgün ve yapraklarından izole edilen endofit bakterilerin moleküler karakterizasyonu 13 cinse ait veriler ortaya koymuştur. Bu cinsler arasında *Bacillus* sp. (%20.7), *Pseudomonas* sp. (%20.7) ve *Enterobacter* sp. (%13.8) öne çıkmıştır (Akinsanya ve ark., 2015). Lilley ve ark. (1996), şeker kamışından izole ettikleri endofit bakterilerden 23 farklı cins teşhis etmişlerdir. Germida ve ark. (1998), 220 endofit bakteri izolatu içerisinde 18 farklı cins teşhis etmişlerdir.

Yukarıda verilen ve sayıları daha da arttırılabilecek çalışmalarda da gösterildiği gibi, pek çok araştırmacı farklı bölgelerden, farklı bitkilerden, farklı sayıda ve farklı cinslere ait endofit bakteri suşları tanımlamışlardır. Hatta aynı bitkinin farklı bölgelerdeki topraklardan alınan örnekleri sahip oldukları endofit bakteriler açısından farklılık gösterebilmektedir (Cho ve ark., 2007). Bu veriler endofit çeşitliliğinin farklı bölgeler, farklı bitkiler hatta izolasyon yapılan farklı bitki dokularına göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Akinsanya ve ark., 2015).

Bu tez çalışması her ne kadar biyoteknolojik perspektif doğrultusunda yapılsa da, ekstraselüler enzimlerin varlığı endofit bakteri-bitki konakçısı ilişkisi açısından da değerlendirilmeli ve tartışılmalıdır. Örneğin, Al-Mallah ve ark. (1987), bitki hücre duvarını yıkan enzimlerin (selülaz, pektoliyaz) *Rhizobium loti*'nin azot tutucu nodül oluşturmada etkili olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada farklı oranlarda selülaz ve pektinaz enzimlerinin endofitik diazotrof (azot fiksasyonu yapabilen) bakterilerin bitki hücreleri arası kolonizasyonunda önemli bir yere sahip olabileceği bildirilmiştir (Verma ve ark., 2001). Hücre duvarını yıkan enzimlerin bitki patojeni bakteriler tarafından da sentezlendiği düşünüldüğünde bu enzimlerin her iki gurup içerisindeki ekspresyonları ve regülasyonları hakkında daha fazla bilgiye sahip olmak bu iki bakteri

grubunu anlamak ve ayırt edebilmek için çok önemli olabilir. Ancak tüm bakterilerin bu enzimleri üretemediği düşünüldüğünde, bu bakterilerin bitki dokusu iç kısımlarına başka mekanizmalar kullanarak girdikleri düşünülebilir.

G117Y1T izolatu dışında tüm izolatlarımızın 16S rRNA dizileme sonuçları %99-100 benzerlik oranları vermektedir (Çizelge 4.3). 16S rRNA gen sekansları tek başına yeni bir türü tanımlamaya yetmeyebilir, ancak yeni bir türün izole edildiğine dair ilk ve güçlü bir indikatördür (Tindall ve ark., 2010). 16S rRNA gen dizisi benzerlik oranı eşiği, DNA-DNA Hibridizasyonuna (DDH) alternatif olarak bakteri sınıflandırmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. 1994 yılında Stackebrandt ve Goebel, iki suşun aynı türe ait olmadığını doğrulamak için %97 16S rRNA gen dizisi benzerlik eşiğini önermiştir. %97'den daha az 16S rRNA gen dizisi benzerliği paylaşan iki suşun aynı türün üyeleri olmadığına dair belgelenmiş kanıtlar vardır (Collins ve ark., 1991; Amann ve ark., 1992; Fox ve ark., 1992; Stackebrandt ve Goebel, 1994). Daha sonraki yıllarda 380 çift suşun karşılaştırılmasına dayanarak, Stackebrandt ve Ebers (2006), Stackebrandt ve Goebel tarafından önerilen % 97 orijinallik değerinden daha yüksek bir eşik olan % 98.7 16S rRNA gen dizisi benzerlik oranını önermiştir. Daha yakın bir zamanda, 571 çift suş kullanılarak yapılan çalışma sonucunda benzer bir eşik aralığı (% 98.2-99.0) önerilmiştir (Meier-Kolthoff ve ark., 2013b). Kim ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada genom ve 16S rRNA gen dizisi benzerlikleri arasında bir milyondan fazla karşılaştırma yapmışlardır. Bu çalışmada, iki katlı çapraz validasyon istatistiksel testi kullanılarak, önceki öneriler (%98.2-99.0) ile benzer bir sonuçla, iki türün ayırt edilmesinin eşiği olarak %98.65 16S rRNA gen dizisi benzerlik oranının kullanılabileceğini gösterilmiştir. G117Y1T kod numaralı izolatımızın verdiği %90.93 benzerlik oranının yukarıdaki tüm eşiklerin çok altında olduğu bir gerçektir. Bu oran bu izolatın farklı bir tür olarak değerlendirilmesine yönelik güçlü bir indikatördür. Ancak DNA-DNA hibridizasyonu, tüm genom sekanslaması, fenotipik karakterizasyonlar (morfoloji, fizyoloji, biyokimya vs.), hücresel yapısal elementlerin kimyasal karakterizasyonu (hücre duvarı peptidoglikanı, teikoik asitler, mikolik asitler, vb., hücre zarı yağ asitleri, polar lipitler, pigmentler, vb. veya poliaminler gibi sitoplazmanın bileşenleri) gibi çalışmalar ek olarak yapılmalıdır (Tindall ve ark., 2010). G117Y1T izolatu pektinaz haricinde tüm enzimler yönünden pozitif sonuçlar vermiştir.

16S rRNA dizileme sonuçlarımızın veri tabanı ile karşılaştırılması, *Paenibacillus* cinsine ait 5 adet izolatımızın olduğunu göstermiştir (G100Y1, G90Y2, G80K3, G70K2, G83S3). %99.25 benzerlik oranı ile *Paenibacillus nuruki* suşu ile benzeşen G100Y1 proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzim testlerinde pozitif sonuçlar vermiş, yüksek selüloz ve lipaz indeks değerleriyle dikkat çekmiştir. % 99.84 benzerlik oranı ile *Paenibacillus tundrae* suşu ile benzeşen G90Y2 izolatu ise ksilanaz enzimi dışındaki tüm enzimleri üretmiş ve yüksek selüloz ve lipaz indeks değeri göstermiştir (Çizelge 4.2). Yine ksilanaz dışındaki tüm enzimler için pozitif sonuç veren G83S3 izolatu %99.23 oranı ile *Paenibacillus seodonensis* ile örtüşmüştür. Burada ilginç olan %100 benzerlik oranı ile *Paenibacillus xylanexedans* suşu ile örtüşen G80K3 ve G70K2 kodlu izolatlarımızdır. Bu izolatlarımıza ait 1503 baz çiftinin tümü dizilenmiş ve sonuç elde edilmiştir. Ancak çizelge 4.2 incelendiğinde 16S rRNA dizilemesine göre aynı suş gibi görünen bu iki izolatu enzim üretme profilleri birbirinden son derece farklıdır ve tartışmaya açıktır. Bu iki izolatu aynı türün farklı alt türleri olması akla gelen ilk olasılıktır. Tabi bir diğer ve en basit açıklama da laboratuvarımızda ya da dizileme sırasında yapılan deneysel hatalardan kaynaklanan basit bir kontaminasyon olduğudur. Dolayısı ile 16S rRNA gen bölgesinin “proofreading” özelliği daha güçlü, özel bir enzim ile çoğaltılarak, dizileme çalışmasının tekrarlanması ve daha önce bahsi geçen diğer moleküler tanımlama testlerinden bazılarının yapılması gerekmektedir.

Penibacillus, 1993 yılında *Bacillus* cinsinden flogenetik olarak ayrılmış, ancak gelecekte daha fazla alt bölüme girmesi muhtemel olan bir cinstir. Birçok türü bitkilerde besin alımını teşvik eden, fitopatojenlerin çoğalmasını kontrol edebilen ve fitohormonlar üretebilen suşlara sahip, iyi bilinen bitki büyümesi detekçileridir. Tarımsal uygulamalara ek olarak *Paenibacillus* tıp ve biyoremediasyon alanında, bazıları halihazırda ticarileşmiş olan antimikrobiyaller, enzimler ve ekzopolisakkaritler üretir. Ancak bu cinsin tüm üyeleri faydalı değildir. Bazı türleri bal arısı hastalıkları, besin zehirlenmeleri ve fırsatçı insan hastalıklarına sebep olmaktadır (Grady ve ark., 2016).

G119Y1T, G113Y3, G105Y1 ve G105S1 izolatları sırası ile *Bacillus toyonensis* (%100 benzerlik oranı), *Bacillus halotolarens* (%99.93 benzerlik oranı), *Bacillus subtilis* sbp. *inaquosorum* (%99.92 benzerlik oranı) ve *Bacillus idriensis* (%99.58) ile örtüşmüşlerdir. G119Y1T izolatu lipaz, amilaz ve yüksek selüloz aktivitesi göstermiştir. G113Y3 test edilen altı enzim için de pozitif sonuç vermiş, özellikle hayli yüksek selüloz

aktivitesi dikkat çekmiştir. G105Y1 ksilanaz dışındaki tüm enzimler için pozitif sonuç vermiş, yüksek proteaz ve selüloz enzim indeksi göstermiştir. Dizileme için seçmiş olduğumuz izolatlar içinde bu enzimlerin hiç birini üretmeyen tek izolatımız olan G105S1 de *Bacillus* cinsine ait sonuç vermiştir (Çizelge 4.2). *Bacillus sp.*, cinsi Gram +, düşük G+C içeriğine sahip, çubuk şekilli, endospor oluşturma yetisine sahip aerob ya da fakültatif anaeroblardır. *Bacillus sp.* cinsleri toprak, alkali ortamlar, hidrotermal menfezler, böcek bağırsağı gibi çok çeşitli ortamlarda bulunabilirler. Çok çeşitli ortamlardaki varlıkları geniş ve çok yönlü metabolik yeteneklerini yansıtır ve bu özellikleri onları endüstriyel uygulamalar için yüksek potansiyellere sahip, çok önemli mikroorganizmalar haline getirir. Bu cinse ait, gıda, ilaç, çevre ve tarım endüstrileri için çok önemli metabolitler sentezleyen, ekonomik değeri olan pek çok tür vardır (Schallmey ve ark., 2004; Vary ve ark., 2007; Pérez-García ve ark., 2011; Yamashiro ve ark., 2011). Örneğin bir çalışmada aromatik hidrokarbonların parçalanmasından sorumlu anahtar enzimleri üreterek farklı petrol türevlerini parçalayan *Bacillus sp.* suşları izole edilip, karakterizasyonları yapılmıştır (da Cunha ve ark., 2006).

%100 benzerlik oranı ile *Pseudomonas congelans* ile eşleşen G118S2T pektinaz dışındaki enzim testlerinde pozitif sonuç vermiştir. %99.62 ile *Pseudomonas orientalis* sonucunu veren G88K1 proteaz, lipaz ve ksilanaz enzimlerini üretme potansiyelini göstermiştir. Tüm izolatlar göz önüne alındığında, sayıca en az pozitif sonuç ksilanaz enzim aktivisinde çıkmıştır (Şekil 4.2). Bu nedenden ötürü bu iki izolat ksilanaz enzim üreticileri olarak değerlidir. *Pseudomonas* cinsi üyeleri çok fazla metabolik çeşitlilik gösteren ve sonuç olarak çok çeşitli yaşam alanlarını kolonize edebilen Gram negatif, “*Proteobacteria*” şubesine ait bakterilerdir (Madigan, 2005). Biyoteknolojik uygulamalara sahip, oldukça önemli bir bakteri cinsidir. Örneğin biyokontrol amaçlı kullanılan bazı floresan *Pseudomonas* suşları fungal patojenlerin büyümesini inhibe eden ve hastalığı baskılayıcı ekstraselüler sekonder metabolitler üretir (Haas ve Defago, 2005). Ayrıca bu cinsin bazı üyelerinin biyoremediasyon amaçlı kullanılabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Yen ve ark., 1991; Luque-Almagro ve ark., 2005).

Çalışmamızda dizileme sonuçlarına göre “*Actinobacteria*” şubesine ait izolatlarımızdan biri %99.58 ile *Micrococcus luteus* ile eşleşen G116K1T olmuştur. Bu izolat yüksek proteaz aktivitesi ile birlikte lipaz aktivitesi göstermiştir (Çizelge 4.2). Mikrokoklar Gram +, spor üretmeyen, hareketsiz, küresel hücre şekline sahip

bakterilerdir Bu bakteriler su ve toprak dahil olmak üzere çok çeşitli ortamlarda bulunabilirler (Letnik ve ark., 2016). *Actinobacteria* şubesinin diğer pek çok temsilcisi gibi piridin, herbisit, klorlu bifenoller ve yağ asitleri gibi olağandışı substratları metabolize etme kabiliyetleri açısından çok yönlüdürler (Sims ve O'Loughlin, 1992; Doddamani ve Ninnekar, 2001).

Actinobacteria şubesine ait diğer izolatlarımız %100 benzerlik oranı ile *Curtobacterium flaccumfaciens* ile eşleşen G107Y2 ve G90S1 bakterileridir. Her iki izolatta proteaz, yüksek lipaz, amilaz ve selüloz aktiviteleri sergilemişlerdir. Lipaz ve selüloz enzim indeksleri arasında istatistik olarak önemli fark olmaması, diğer iki enzim arasında istatistiksel olarak önemli olsa da, sayısal değerlerin birbirlerine yakın olması bu iki izolatın aynı suş olabileceği olasılığını arttırmaktadır. Ancak yine de farklı alt türler olabileceği de unutulmamalı, G80K3 ve G70K2 izolatlarının ileri karakterizasyonu için yapılması gereken, daha önce belirttiğimiz teknikler bu izolatlar için de geçerlidir. *Curtobacterium* cinsine ait endofit bakteriler kırmızı yonca, pirinç ve patates dahil pek çok bitkiden izole edilmiştir (Sturz ve Matheson, 1996; Elbeltagy ve ark., 2000; Lacava ve ark., 2007). Lacava ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada narenciye (citrus) bitkilerinden daha önce izolasyonunu gerçekleştirdikleri *Curtobacterium flaccumfaciens* endofitik suşunun *Xylella fastidiosa sub sp. pauca* patojenik bakterisinin sebep olduğu bir portakal hastalığı olan turuncğilde alacalı kloroz (citrus variegated chlorosis = CVC) hastalığının semptomlarını azalttığını göstermişlerdir.

Bacteroidetes şubesine ait tek izolatımız %99.44 benzerlik oranı ile *Chryseobacterium luteum*'u gösteren G42K2 kodlu bakteridir. Ksilanaz dışında tüm enzim aktivitelerini göstermiştir. Bu cins Gram negatif, çubuk şeklinde, flexirubin tipi pigment üretmesi nedeniyle sarı-turuncu koloniler oluşturan bakterilerdir ki bu oluşum izolatımızın oluşturduğu koloni rengi ile tutarlıdır. *Chryseobacterium sp.*, cinsi tatlı su kaynakları, toprak, deniz balıkları ve insan konakları dahil olmak üzere çeşitli habitatlardan 100'den fazla tür içerir (Matu ve ark., 2019). 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada sebze dökümü atık toprağından izole edilen ve tanımlanan *Chryseobacterium indologens* suşunun gösterdiği pektinaz enzim aktivitesinin meyve suyu berraklaştırma işlemi için potansiyel taşıdığı gösterilmiştir (Roy ve ark., 2018). Enzim indeks sonuçlarımız G42K2 izolatının da pektinaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.2). Biyoteknolojik uygulamalar ile ilgili yapılan bir başka çalışmada doğal ve

yapay soğuk ortamlardan izolasyonu ve tanımlaması yapılan *Chryseobacterium sp.*, suşlarında soğuk-aktif proteaz enzimi taranmıştır (Mageswari ve ark., 2017). Bu çalışmada soğuk-aktif proteaz enzim aktivitesine sahip, ileriye dönük endüstriyel alanda kullanım potansiyeli olan yeni bir suş keşfedilmiştir. Çalışmada, *Chryseobacterium sp.* IMDY adı verilen bakteri izolatının büyüme sıcaklığı 28 °C olarak belirlenmiştir. İzolatlarımızın optimum büyüme sıcaklığının da bu sıcaklığa yakın olduğu düşünüldüğünde, gelecekte benzer bir çalışmanın bu izolat ile yapılabilirliğini ortaya çıkarmaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1) Daha önce Van ilinin çeşitli bölgelerinden toplanmış kültür ve yabanıl tahlil bitkilerinin sağlıklı kök, yaprak ve gövde kısımlarından izolasyonu yapılarak elde edilen bakteri izolatlarından 128 adeti Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarından temin edilmiştir. Öncelikle bu izolatlar endüstriyel öneme sahip proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz ve ksilanaz enzim üretim yeteneklerini test etmek için ayırt edici katı besiyerleri kullanılarak taranmıştır. Yapılan bu nitel tarama testleri sonucunda, test edilen 128 suşdan 84'ünün proteaz, 41'nin selüloz, 28'inin pektinaz, 95'inin lipaz, 10'unun ksilanaz, 71'inde lipaz ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların içerisinde 6 enzimi üreten 1, 5 enzimi üreten 8, 4 enzimi üreten 16, 3 enzimi üreten 37, 2 enzimi üreten 41, 1 enzimi üreten 19 ve hiç enzim üretmeyen 8 tane suş olduğu belirlenmiştir.

2) Hesaplanan enzim indeksleri (EI) değerlerine göre seçilen en başarılı 19 izolat ile bu enzimlerden hiç birini üretmeyen 1 izolat, 16S rRNA gen bölgesi dizileme yöntemi ile moleküler tanımlamaya tabi tutulmuştur. 20 adet izolata ait ilgili gen bölgelerinden 17 adeti başarılı bir şekilde okunmuş, 3 adet dizileme sonuçsuz kalmıştır.

3) Veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı veri analiz sonucunda, 17 adet izolata ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi 2 adet *Pseudomonas sp.*, (G88K1, G118S2T), 1 adet *Micrococcus sp.*, (G116K1T), 5 adet *Paenibacillus sp.*, (G100Y1, G90Y2, G83S3, G80K3, G70K2), 1 adet *Streptococcus sp.*, (G117Y1T), 2 adet *Curtobacterium sp.*, (G107Y2, G90S1), 1 adet *Chryseobacterium sp.*, (G42K2) ve 4 adet *Bacillus sp.*, (G119Y1T, G105S1, G113Y3, G105Y1) cinslerine ait sonuç vermiştir.

4) G117Y1T izolatı dışında tüm izolatlarımızın 16S rRNA dizileme sonuçları %99-100 benzerlik oranları vermiştir. G117Y1T kod numaralı izolatımızın verdiği

%90.93 benzerlik oranı, bu izolatın farklı bir tür olarak değerlendirilmesine yönelik güçlü bir indikatör olarak sonuçlarımız içerisinde yer almıştır.

Bu çalışmada, nitel olarak üretimleri ortaya konan enzimlerden bazılarının saflaştırılarak, aktivitelerinin ve stabilitelerinin farklı sıcaklıklar ve pH değerleri gibi fiziksel koşullarda nicel olarak ortaya konması bu çalışmanın devamı olarak ayrıca yapılacaklar arasındadır. Endofit bakteriler yüksek tür çeşitliliği ve farklı ortamlara adaptasyonları, farmasötik veya tarımsal uygulamalar gibi pek çok alan için zengin enzim ve yeni ikincil metabolitler kaynağı olarak kabul edilirler. Bu nedenle, endofit bakteri izolatlarının sadece ekstraselüler enzimler açısından değil, belirlenen ve endüstriyel olarak önem taşıyan bazı sekonder metabolitler açısından da araştırılması ileriye dönük planlar arasındadır.



KAYNAKLAR

- Adrio, J. L., Demain, A. L., 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. ***Biomolecules***, **4**: 117-139.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., Shahzad, S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. ***Microbiological Research***, **221**: 36-49.
- Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P., Ting, A. S. Y., 2015. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in Aloe vera. ***FEMS Microbiology Letters***, **362**(23): fmv184.
- Al-Mallah, M. K., Davey, M. R., Cocking, E. C. 1987. Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to Rhizobium host specificity. ***Biotechnology***, **5**(12): 1319-1322.
- Amann, R. I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L., Stahl, D. A., 1992. Diversity among Fibrobacter isolates: towards a phylogenetic classification. ***Systematic and Applied Microbiology***, **15**: 23-31.
- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Pandey, A., Faraco, V., 2015. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. ***Journal of Chemical Technology & Biotechnology***, **90**(3): 573-581.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Cihan, A. C., Chaulagain, B. P., 2013. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. ***Biomed Research International***, **2013**: 204014.
- Arachevaleta, M., Bacon, C. W., Hoveland, C. S., Radcliffe, D. E., 1989. Effect of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. ***Agronomy Journal***, **81**: 83-90.
- Bajpai, P., 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. ***Biotechnology***, **15**: 147-157.
- Barraquio, W. L., Revilla L., Ladha J. K., 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. ***Plant and Soil***, **194**: 15-24.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A Review. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, **56**: 326-338.
- Bender, M. L., Bergeron, R. J., Komiyama, K., 1984. ***The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis***. Wiley-Interscience, ISBN: 0-471-05991-9, New York, 312.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites a personal view. ***The Journal of Antibiotics***, **58**: 1-26.
- Berg, G., Hallmann, J., 2006. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes, Chap. 4. ***Microbial Root Endophytes***(Editor: B. J. E Schulz, C. J. C. Boyle, T. N. Sieber.) Springer, Berlin. 354.
- Biely, P., 2003. Diversity of Microbial Endo-1,4-Xylanases, Chap. 21. ***Applications of Enzymes to Lignocellulosics***(Editor: S. D. Mansfield, J. N. Saddler). American Chemistry Society, Washington. 480.
- Biely, P., Puls J., Schneider, H., 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. ***FEBS Letters***, **186**: 80-84.

- Blumer, C., Haas D., 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, **173**(3): 170-177.
- Boddey, R. M., Dobereiner, J., 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research*, **42**: 241-250.
- Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., Boddy, L., 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 795-811.
- Borchet, T. V., Lassen, S .E., Svendsen, A., Frabtzen, V., 1995. Oxidation of stable amylase for detergent. *Biotechnology Journal*, **10**: 175-179.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., Voogd, R. H. A process for surface sizing or coating of paper. 1996. *European Patent Application EP 0,690,170 A*, 1.
- Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., R˘Aut, I., Doni, M. B., Arsene, M. L., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, B., 2017. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal Biotechnology*, **28**: 101-112.
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., Vieira, J. D. G., 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**(3): 353-359.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J., Anadon, R., 2006. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, **494**(3): 435-459.
- Cavello, I. A., Crespo, J. M., García, S. S., Zapiola, J. M., Luna, M. F., Cavalitto, S. F., 2015. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as hair waste. *Biotechnology Research International*, **2015**: 952-921.
- Chaudhri, A., Suneetha, V., 2012. Microbially derived pectinases: A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, **2**: 1-5.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut P. R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R., 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, **25**: 1007-1014..
- Chen, Y. T., Yuan, Q., Shan, L. T., Lin, M. A., Cheng, D.Q., Li, C.Y., 2013. Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Isolated from *Ophiopogon japonicus*. *Oncology Letters*, **5**: 1787-1792.
- Cherry, J. R., Fidantsef, A. L., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion Biotechnology*, **14**: 438-443.
- Cho, K. M., Hong, S. Y., Lee, S. M., Kim, Y. H., Kahng, G. G., Lim, Y. P., Kim, H., Yun, H. D. 2007. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, **54**(2): 341-351.
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., Wallbanks, S., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, **77**: 5-12.

- Costa, J. M., Loper, J. E., 1994. characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. **Molecular Plant Microbe Interactions Journal**, 7: 440-448.
- da Cunha, C. D., Rosado, A. S., Sebastián, G. V., Seldin, L., Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep water production basin. **Brazilian Application Microbiology and Biotechnology**, 73: 949-959
- de Castro, P. A., Fernandes G. R., Franco O. L., 2014. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. **Fronties in Microbiology**, 5: 489.
- Demain, A. L., Solomon, N. A., 1981. Industrial microbiology. **Science American**, 245(3): 67-75.
- Doddamani, H. P., Ninnekar, H. Z., 2001. Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. **Current Microbiology**, 43(1): 69-73.
- Drauz, K., Gröger, H., May, O., 2010. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41(4): 850-861.
- Edgar, C. B., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32(5): 1792-1797.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Stao Y., Morisaki, H., Mitsui, H., Minamisawa K., 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, 46: 617-629.
- Eriksson, K., 1990. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Wood Science and Technology**, 24: 79-101.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 42: 166-170.
- Garg, N., Mahatma, K. K., Kumar, A., 2010. *Xylanase: Applications and Biotechnological Aspects: Biotechnological Aspects of Xylanase*, Lambert Academic Publishing A. G. & C.O., ISBN-13: 978-3838375045, Germany. 60.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Renato de Freitas, J., Seib, A. M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, 26(1): 43-50.
- Gessesse, A., 1998. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an *Alkaliphilic Bacillus* sp.. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(9): 3533-3535.
- Ghazali, H. M., Hamidah, S., Che Man, Y.B., 1995. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 72: 633-639.
- Goodstime, C. O., Felix, O. E., Augustina, O. J., Christopher, O. E., 2014. Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, 2: 77-85.
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Hilda, A., 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **Biomed Research International**, 2013: 10.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z. C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, 15(1): 203.

- Gray, E. J., Smith, D. L., 2005. Intracellular and Extracellular PGPR: Commonalities and Distinctions in The Plant Bacterium Signaling Processes. ***Soil Biology and Biochemistry***, **37**: 395-412.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003a. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. ***Processing Biochemistry***, **38**: 1599-1616..
- Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil borne pathogens by *Pseudomonads fluorescent*. ***Nature Reviews Microbiology***, **3**: 307-319.
- Hallmann, J., Qualt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W., 1997 Bacterial endophytes in agricultural crops. ***Canadian Journal Microbiology***, **43**: 895-914.
- Hankin, L. Anagnostakis, S. L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. ***Mycologie***, **67**: 597-607.
- Hardoim, P. R., Van, Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. ***Trends in Microbiology***, **16**: 463-471.
- Hardoim, P., 2011. Bacterial endophytes of rice- their diversity, characteristics and perspectives. ***The Netherlands Plant Research International***, ISBN: 978-90-367-5086-8, Wageningen. 218.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. ***Enzyme and Microbial Technology***, **39**: 235-251.
- Hennig, K., Villforth, F., 1940. Experimentelle untersuchungen zur frage der bakteriensymbiose in hoheren pflanzen und ihrer beeinflussung durchleitelemente. ***Biochem Z***, **305**: 299-309.
- Hmidet, N., El-Hadj, Ali N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S., Nasri, M., 2009. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: characterization and potential application as detergent additive. ***Biochemical Engineering Journal***, **47**: 71-79.
- Hoffman, M., Decho, A. W., 1999. Extracellular Enzymes Within Microbial Biofilms and The Role of the Extracellular Polymer Matrix, Chap. 12. ***Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function***. (Editor: J. Wingender, T. Neu, H. C. Flemming), Springer, Berlin. 258.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Islam, S., 2017. Plant growth-promoting fungi (PGPF): phytostimulation and induced systemic resistance. ***Plant Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives***, **2**: 135-191.
- Hu, H. Q., Li, X. S., He, H., 2010. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of capsicum bacterial wilt. ***Biological Control***, **54**: 359-365.
- Hu, J., Arantes, V., Saddler, J. N., 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect. ***Biotechnology for Biofuels***, **4**: 36.
- Huertas, M. J., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., Roldán, M. D., 2006. Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. ***Biochemical Society Transactions***, **34**: 5-152.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, T., Van Montagu, M., Kellenberger, E., 1991. Infection of Intact Roots of Kallar Grass and Rice Seedlings by *Azoarcus*. Chap. 41. ***Nitrogen Fixation***(Editor: M., Polsinelli, R., Materassi, M., Vincenzini 1). Springer, Netherlands. 680.

- Isikgor, F. H., Becer, C. R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. ***Polymer Chemistry***, **6**: 4497-4559.
- Jacobson, J. W., Glick, J. L., Madello, K. L. 1985. *U.S. Patent No. 4,540,506*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Jalgaonwala, R. E., Mahajan, R. T., 2011. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. ***Journal of Agricultural Technology***, **7**(6): 1733-1741.
- Jena, S. K., Rath, C. C., 2013. Optimization of culture conditions of phosphate solubilizing activity of bacterial sp. isolated from Similipal biosphere reserve in solid-state cultivation by response surface methodology. ***International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences***, **2**(5): 47-59.
- Jiang, Z., Li, X., Yang, S., Li, L., Tan, S., 2005. Improvement of the bread making quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase b from *Thermotoga maritima*. ***Food Research International***, **38**: 37-43.
- Joseph, B., Mini Priya, R., 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A Review. ***The American Journal of Biochemistry and Molecular Biology***, **1**: 291-309.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M., Viikari, L., 1993. Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. ***Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood***, **47**(4): 318-324.
- Kareem, S. O., Adebawale, A. A., 2007. Clarification of orange juice by crude fungal pectinase from *Citrus peel*. ***Nigerian Food Journal***, **25**: 130-136.
- Kerry, B.R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. ***Annual Review of Phytopathology***, **38**: 423-441.
- Khan, L. A., Shahzad, R., Al-Harrasi, A., Lee, J. I., 2017. Endophytic Microbes: A Resource for Producing Extracellular Enzymes. Chap. 5. ***Endophytes: Crop Productivity and Protection***(Editor: D. K. Maheshwari ve K. Annapurna). Springer International Publishing, Antigua ve Barbuda. 291.
- Khan, M., Nakkeeran, E., Kumar, S. U., 2013. Potential application of pectinase in developing functional foods. ***Annual Review of Food Science and Technology***, **4**: 21-34.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., Chun, J., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **64**(2): 346-351.
- Kloepper, J.W., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, G.W., Murphy, J., Sikora, E., Fernandez, C., 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. ***Australasian Plant Pathology***, **28**: 27-33.
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., 1999. Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. ***Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry***, **63**: 72-75.
- Korkina, L. G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. ***Cellular and Molecular Biology***, **53**: 15-25.

- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**: 411-456.
- Kumar, C. G., Malik, R., Tiwar, M., 1998. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Current Science*, **75**: 1312-1318.
- Kumar, L., Nagar, S., Mittal, A., Garg, N., Gupta, V. K., 2014. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. *Journal of Food Science and Technology*, **51**: 1737-1749.
- Kumar, S., Aharwal, R. P., Shukla, H., Rajak, R. C., Sandhu, S. S., 2014. Endophytic fungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3**: 1179-1197.
- Lacava, P. T., Li, W., Araujo, W. L., Azevedo, J. L., Hartung, J. S., 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *Journal of Microbiology-Seoul*, **45**(5): 93-388.
- Laurikainen, T., Härkönen, H., Autio, K., Poutanen, K., 1998. Effects of enzymes in fibre-enriched baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**: 239-249.
- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. E., Kennedy, C., 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, **186**: 5384-5391.
- Lee, W.C., Yusof, S., Hamid, S.A., Baharin, B.S., 2006. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, **73**: 55-63.
- Leo, V. V., Passari, A. K., Joshi, J. B., Mishra, V. K., Uthandi, S., Ramesh, N., Gupta, V. K., Saikia, R., Sonawane, V. C., Singh, B. P., 2016. A novel triculture system (cc3) for simultaneous enzyme production and hydrolysis of common grasses through submerged fermentation. *Frontiers Microbiology*, **7**: 447.
- Letnik, I., Avrahami, R., Port, R., Greiner, A., Zussman, E., Rokem, J. S., Greenblatt, C., 2017. Biosorption of copper from aqueous environments by *Micrococcus luteus* in cell suspension and when encapsulated. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **116**: 64-72.
- Li, X., Yang, H., Roy, B., Wang, D., Yue, W., Jiang, L., Park, Y. E., Miao, Y., 2009. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, **8**: 2418-2422.
- Lilley, A. K., Fry, J. C., Bailey, M. J., Day, M. J., 1996. Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiology Ecology*, **21**(3): 231-242.
- Lin, J. E; Chang, D. C. N., Shen, G. J., 1991. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechniques*, **5**: 275-280.
- Lodewyckx, C., Taghavi, S., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Van Der Lelie, D., 2001. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, **3**: 173-187.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mergeay, M., Lelie, D.V., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**: 586-606.

- Longland, A.C., Theodorou, M. K., Sanderson, R., Lister, S. J., Powell, C. J., Morris, P., 1995. Non starch polysaccharide composition and in vitro fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. ***Animal Feed Science and Technology***, 55: 161-77.
- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., Roldán, M. D., 2005. Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. ***Biochemical Society Transactions***, 33: 168-9.
- Madigan, M., Martinko J., 2005. ***Brock Biology of Microorganisms***. 11. Prentice Hall. ISBN: 0-13-144329-1, Prentice Hall, USA. 992.
- Mageswari, A., Subramanian, P., Chandrasekaran, S., Karthikeyan, S., Gothandam, K. M., 2017. Systematic functional analysis and application of a cold-active serine protease from a novel *Chryseobacterium* sp.. ***Food Chemistry***, 217: 18-27.
- Makky, E. A., Yusoff, M. M., 2015. Bioeconomy: pectinases purification and application of fermented waste from *Thermomyces lanuginosus*. ***Journal of Medical and Bioengineering***, 4(1): 76-80.
- Malfanova, N, Lugtenberg, B, and Berg, G., 2013. Bacterial Endophytes: Who and Where, and What Are They Doing There?. Chap. 36. ***Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere***(Editor: Frans J. De Bruijn). Wiley-Blackwell, New Jersey. 1328.
- Matu, A., Nde, A. L., Oosthuizen, L., Hitzeroth, A., Badenhorst, M., Duba, L., Gidaga, M., Klinck J., Kriek, I., Lekoma P. J., Nel L., Menende dos Ramos, S., Rossouw, J., Salomane, N., Segone, N., Serobe, S., Tiyani, T., Hugo, C. J., Newman, J. D., 2019. Draft genome sequences of seven *Chryseobacterium* type strains. ***Microbiological Research***, 8(1): e01518-18.
- Mcmullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I. M., Marchant, R., Smyth, W. F., 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 56: 81-87.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., Göker, M., 2013a. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. ***BMC Bioinformatics***, 14: 60.
- Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Klenk, H., 2014. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 64(2): 352-356.
- Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Spröer, C., Klenk, H. P., 2013b. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy?. ***Archives of Microbiology***, 195: 413-418.
- Menendez, E., Garcia-Fralie, P., Rivas, R. 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases. ***Bioengineering***, 2: 163-182.
- Mercado-Blanco, J., Bakker, P. A., 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. ***Antonie Van Leeuwenhoek***, 92: 367-389.
- Miguel, Â. S. M., Martins-Meyer, T. S., Veríssimo Da Costa Figueiredo, E., Lobo, B. W. P., Dellamora-Ortiz, G. M., 2013. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends, Chap. 14. ***Food Industry***(Editor: I. Muzzalupo). Intechopen, Rijeka. 748.

- Mitidieri, S., Souza Martinelli, A. H., Schrank, A., Vainstein, M. H., 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, **97**: 1217-1224.
- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., Berninger, T., Naveed, M., Sheibani-Tezerji, R., Von Maltzahn, G., 2017. A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. **Frontiers in Microbiology**, **8**: 1-10.
- Mukhopadhyay, N.K., Garrison, N.K., Hinton, D.M., Bacon, C.W., Khush, G.S., Peck, H.D., Datta, N., 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathology**, **134**: 151-159.
- Nakajima, M., Snape, J., Khare, S. K., 2000. Applications of Enzymes and Membrane Technology In Fat and Oil Processing Processing, Chap. 5. **Method in Non-Aqueous Enzymology**(Editor: M. N. Gupta). Birkhauser Verlag, Basel. 211.
- Narisawa, K., Tokumasu, S., Hashiba, T., 1998. Suppression of club root formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology Journal**, **47**: 206-210.
- Nelson, E.B., 2017. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. **Plant and Soil**, **422**: 1-28.
- Nerurkar, P. M., Joshi, M., Pariti, S., Adivarekar, R., 2013. Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. **Journal of Surfactants and Detergents**, **16**: 435-443.
- Newton, C.R., 1995. **PCR: Essential data**. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Nishida, Y., Suzuki, K.I., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T., 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Biochimie**, **89**(8): 1002-1011.
- Oyewole, O. A., Oyeleke, S. B., Dauda, B. E. N., Emiade, S., 2011. Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus Niger* and *Penicillium Frequestans* isolated from abattoir effluent. **Journal of Microbiology**, **1**: 174-180.
- Özdemir, S., 2002. **Yemeklik Baklagiller**. Hasad Yayıncılık, İstanbul, 223.
- Pathak, P., Bhardwaj, N. K., Singh, A K., 2010. Enzymatic deinking of office waste paper: an overview. **Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association**, **22**: 83-88.
- Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., Bettucci, L., 2015., Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. **Mycotoxin Research**, **31**(3): 137-143.
- Pérez-García, A., Romero, D., Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, **22**: 187-193.
- Perotti R., 1926. On the limits of biological enquiry in soil science. **Proceeding of International Society of Soil Science**, **2**:146-161.
- Petrini, L.E., Petrini, O., Laflamme, G. 1989. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, **70**: 97-103.
- Pillay, V. J., J. Nowak., 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) Seedlings inoculated with a *Pseudomonad* bacterium. **Canadian Journal Microbiology**, **43**: 354-361.

- Ping, L., Boland, W., 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. ***Trends in Plant Science***, **9**: 263-266.
- Prade, R. A., 1995. Xylanases: from biology to biotechnology. ***Biotechnology & Genetic Engineering Reviews***, **13**: 100-131.
- Praveen, K. G., Suneetha, V., 2014. A cocktail enzyme pectinase from fruit industrial dump sites: a review. ***Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences***, **5**(2): 1252-1258.
- Praveen, K. G., Suneetha, V., 2015. Efficacy of pectinase purified from *Bacillus vit sun-2* and in combination with xylanase and cellulase for the yield and clarification improvement of various culinary juices from south india for pharma and health benefits. ***International Journal of Pharmtech Research***, **7**(3): 448-452.
- Priest, F. G., 1984. ***Extracellular Enzymes***. Van Nostrand Reinold Co. Ltd., ISBN 13: 9780442305888, Wokingham. 79.
- Puentea, M., Ching, Y., Li B. L., Yoav Bashana, C., 2009. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. ***Environmental and Experimental Botany***, **66**: 402-408.
- Raddadi, N., Crotti, E., Rolli, E., Marasco, R., Fava, F., Daffonchio, D., 2012. Other *Bacillus* Species in Biotechnology. Chap. 4. ***The most important Bacillus species in biotechnology***. (Editor: E. Sansinenea). Springer, Dordrecht. 373.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Lucera, L., 2003. Enhancing the quality of virgin olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing. ***European Food Research and Technology***, **216**: 109-115.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. ***Trends in Microbiology***, **6**: 139-144.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. ***Current Opinion in Plant Biology***, **14**: 435-443.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., Hurek, T., 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. ***Molecular Plant-Microbe Interactions***, **19**(2): 181-188.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2004. Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. ***Archives of Microbiology***, **181**: 337-344.
- Rouau, X., 1993. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. ***Journal of Cereal Science***, **18**: 145-157.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M., Barua, R., Hossain, M., 2018. Extracellular pectinase from a novel bacterium *Chryseobacterium indologenes* strain SD and its application in fruit juice clarification. ***Enzyme Research***, **2018**: 3859752
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. ***FEMS Microbiology Letters***, **278**: 1-9.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. ***Microbiology Research***, **183**: 92-99.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O. P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. ***Canadian Journal of Microbiology***, **50**: 1-17.

- Senthilkumar, M., Anandham, R., Madhaiyan, M., Venkateswaran, V., Sa, T., 2011. Endophytic Bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. ***Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems***.(Editor: D. K. Maheshwari). Springer, Verlag Berlin Heidelberg. 434.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. ***Molecular Plant Microbe Interactions***, **25**: 28-36.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. ***Biotechnology Advence***, **19**: 627-662.
- Siciliano, S., Fortin, N., Himoc, N., 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. ***Applied and Environmental Microbiology***, **67**: 2469-2475.
- Sims, G. K., O'Loughlin, E. J., 1992. Riboflavin production during growth of *Micrococcus luteus* on pyridine. ***Applied and Environmental Microbiology***, **58**(10): 3423-3425.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., Pandey, D. K., 2017. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. ***3 Biotechnology***, **7**: 1-14.
- Singh, R., Mittal A., Kumar, M., Mehta, P. K., 2016. Microbial protease in commercial applications. ***Journal Pharmedical Chemistry Biology Science***, **4**: 365-74.
- Smith, C. A., Wood, E. J., 1991. ***Molecular and Cell Biochemistry, Biological Molecules***. 1. Chapman&Hall, ISBN-13: 978-0412407802, New York. 206.
- Sreedharan, S., Prakasan, P., Sasidharan, S., Benjamin, S., 2016. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. ***Journal of Nutrition & Food Sciences***, **6**: 1.
- Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. ***Microbiology Today***, **33**: 152-155.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, **44**: 846- 849.
- Stamakis, A., 2004. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies. ***Bioinformatics***, **30**(9): 1312-1313.
- Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Coelho L. C. B. B., Araujo, J. M., 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis sp.* endophyte of yam bean. ***Bioresource Technology***, **76**: 137-141.
- Stamp, N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. ***The Quarterly Review of Biology***, **78**: 23-55.
- Stirling, J. L., Thurston, C. F., 1985. Handbook of Enzymes Biotechnology, Chap. 3. ***The Application of Enzymes in Industry***(Editor: A. Wiseman, E. Norwood, J. Wiley&Sons 2). Ellis Horwood, Chichester. 457.
- Strobel, D., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, **67**: 491-502.
- Sturz, A. V., Nowak, J., 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing association with crops. ***Applied Soil Ecology***, **15**: 183-190.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. ***Canadian Journal of Microbiology***, **44**: 162-167.

- Sturz, A. V., Christie, B. R., Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. ***Critical Reviews in Plant Sciences***, **19**: 1-30.
- Sturz, A.V., Matheson, B. G., 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host resistance to *Erwinia* induced bacterial soft rot in potato tubers. ***Plant Soil***, **184**: 265-271.
- Sun, X, Guo, L.D., 2012. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. ***Mycology*** **3**, **1**: 65-76.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., Imanaka, T., 1992. Action of neopullulanase; Neopululanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1-4)- and α -(1-6)- glucosidic linkages. ***The Journal of Biological Chemistry***, **267**: 18447-18452.
- Tan, R. X., Zou, W. X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. ***Natural Product Reports***, **18**: 448-449
- Tanaka, A., Hoshino, E., 1999. Study on the substrate specificity of α -amylases that contribute to soil removal in detergents. ***Journal of Surfactants and Detergents***, **2**: 193-199.
- Thanikaivelan, P., Rao, J. R., Nair, B.U., Ramasami, T., 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. ***Trends in Biotechnology***, **22**: 181-188.
- Thomas, T. D., Mills, O .E., 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. ***Netherlands Milk and Dairy Journal***, **35**: 255-273.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **60**(1): 249-266.
- Traving, S. J., Thygesen, U. H., Riemann, L., Stedmon, C. A., 2015. A model of extracellular enzymes in free living microbes: which strategy pays off?. ***Applied and Environmental Microbiology***, **81**: 7385-7393.
- Trotsenko, A. Y., Khmelenina, N. V., 2002. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. ***Archives of Microbiology***, **177**: 123-131.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., Vangronsveld, J., 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. ***Environmental Microbiology Reports***, **7**: 40-50.
- Tucker, G. A., Woods, L. F. J., 1995. ***Enzymes in Food Processing***. Springer, ISBN: 978-1-4615-2147-1, USA. 319.
- Van Aken, B., Peres, C., Doty, S., Yoon, J., Schnoor, J., 2004. *Methylobacterium populi* sp. Nov., a novel aerobic, pink pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilising bacterium isolated from poplar trees (*Populus Deltoides X Nigra* DN34). ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***. **54**: 1191-1196.
- Van Der Maarel, M. J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. ***Journal of Biotechnology***, **94**: 137-155.
- Vary, P. S, Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., Jahn, D., 2007. *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, **76**: 957-967

- Vasco-Correa, J., Ge, Y., Li, J., 2016. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, Chap. 24. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**(Editor: S. I. Mussatto). Elsevier Science, USA. 633.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K., 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, **91**: 127-141.
- Verma, V. C., Gond, S. K., Kumar, A., Mishr, A., Kharwar, R. N., Gange, A. C., 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* a. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbial Ecology**, **57**: 749-756.
- Vetter, Y., Deming, J. W., Jumars, P. A., Krieger-Brockett, B. B., 1998. A predictive model of bacterial foraging by means of freely released extracellular enzymes. **Microbial Ecology**, **36**: 75-92.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, **13**: 335-350.
- Vijayalakshmi, R., Kairunnisa, K., Sivvaswamy, S. N., Dharan, S. S., Natarajan, S., 2016. Enzyme production and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from medicinal plants. **Indian Journal Science Technology**, **9**: 1-8
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., Ryder, M. H., 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* sp. Closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, **40**: 36-43.
- Webster, G., Gough, C., Vasse, J., Batchelor, C. A., O'Callaghan, K. J., Kothari, S. L., Davey, M.R., 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, **194**: 115-122.
- Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H. C., 2012. **Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function**. Springer, ISBN: 978-3-642-64277-7, Verlag Berlin Heidelberg. 258.
- Xu, Q. H., Wang, Y. P., Qin, M. H., Fu, Y. J., Li, Z. Q., Zhang, F. S., Li, J. H., 2011. Fibre surface characterization of old new print pulp deinked by combining hemicellulase with laccase-mediated system. **Bioresource Technology**, **102**: 6536-6540.
- Xu, Q., Fu, Y., Gao, Y., Qin, M., 2009. Performance and efficiency of old newspaper deinking by combining cellulase/hemicellulase with laccase-violuric acid system. **Waste Managemnet**, **29**: 1486-1490.
- Yamashiro, D., Yoshioka, M., Ashiuchi, M., 2011. *Bacillus subtilis* pgsE (Formerly ywtC) stimulates poly- γ -glutamate production in the presence of zinc. **Biotechnology and Bioengineering**, **108**: 226-230.
- Yanni, Y. G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stolfus, J., Buckley, D., Schmidt, T. M., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., 1997. Natural endophytic assoassociation between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, **194**: 99-114.
- Yen, K. M., Karl, M. R., Blatt, L. M., Simon, M. J., Winter, R. B., Fausset, P. R., Lu, H. S., Harcourt, A. A., Chen, K. K., 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. **Journal of Bacteriology**, **173**(17): 5315-5327.

ÖZ GEÇMİŞ

1994 yılında Şanlıurfa’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa’da tamamladı. 2013 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2017-2018 öğrenim döneminde aynı bölümden ziraat mühendisi olarak mezun oldu. 2018 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa kabul edildi.



YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 16/03/2020

Tez Başlığı / Konusu:

Tahıl Bitkilerinden İzole Edilmiş Olan Endofit Bakterilerde Biyoteknolojik Öneme Sahip Bazı Enzimlerin Belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 16/03/2020 tarihinde Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 (Sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


16.03.2020
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gökhan DOĞAN

Öğrenci No: 17910001065

Anabilim Dalı: Tarımsal Biyoteknoloji

Programı: Tarımsal Biyoteknoloji

Statüsü: Y. Lisans ☒

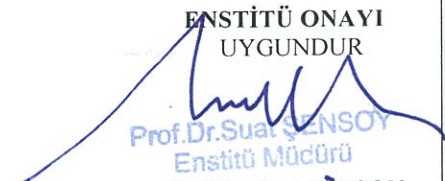
Doktora ☐

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR



Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR


Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Suat ŞENSOY