

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

**ENDOFİT BAKTERİ G15S1 İZOLATININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ,
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE
KARŞI DUYARLILIĞININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rümeysa GÖK
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

VAN – 2023

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

**ENDOFİT BAKTERİ G15S1 İZOLATININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ,
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE
KARŞI DUYARLILIĞININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rümeysa GÖK

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FYL-2022-10304 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN danışmanlığında, Rümeysa GÖK tarafından sunulan “Endofit Bakteri G15S1 İzolatının Tüm Genom Dizilemesi. Biyokimyasal Karakterizasyonu ve Bazı Ağır Metallere Karşı Duyarlılığının İncelenmesi” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 18 /05 /2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Koca ÇAYDAŞI

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

İmza:

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

İmza

Prof. Dr. Harun AKKUŞ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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 atf yapıldığını bildiririm.

İmza

Rümeysa GÖK



ÖZET

ENDOFİT BAKTERİ G15S1 İZOLATININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ, BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI DUYARLILIĞININ İNCELENEMESİ

GÖK, Rümeysa

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Mayıs 2023, 52 sayfa

Endofitler, bitkilerin doku aralarında/içlerinde yaşayan ancak konukçusunda gözle görülen bir hastalık belirtisine neden olmayan bakteriyel veya fungal mikroorganizmaları kapsar. Bu çalışmada çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş ve daha önceki çalışmalarda gerek bitki büyümesini teşvik edici markörler gerekse demir (Fe^{+3}), kobalt (Co^{+2}) ve nikel (Ni^{+2}) varlığında yüksek siderofor üretme potansiyeli gösteren G15S1 kodlu endofit izolatının farklı besi ortamlarındaki büyüme/ koloni morfolojisi belirlenmiş, biyokimyasal karakterizasyonu ve yeni nesil dizileme yolu ile tüm genom dizilemesi tamamlanmıştır. Ayrıca izolatın en iyi gelişim gösterdiği katı besi kültür ortamlarında bakır, çinko, mangan, civa ve lityum metallerine karşı dirençliliği test edilmiş ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MIK) ortaya konmuştur. Yapılan gram boyama sonucunda gram-(+), kok hücre morfolojisine sahip olduğu anlaşılan G15S1 izolatının identifikasyon amacıyla Microgen ve API ticari kitleri kullanılarak fenotipik (biyokimyasal) özellikleri belirlenmiş, bu testlerde sadece glikoz, üreaz, sitrat, jelatin, sukroz ve arabinoz testlerine pozitif sonuç göstermiştir. Bakteri izolatı proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz ve selüloz hidrolitik enzimlerini üretebilme yetenekleri açısından nitel olarak incelenmiş ve izolatın ilgili ayırt edici besi ortamlarında test edilen enzimlerin hiçbirini üretmediği gözlemlenmiştir. Illumina HiSeq platformu kullanılarak yapılan tüm genom dizilemesi sonucunda G15S1 izolatının genom boyutunun ve genom G+C içeriğinin sırasıyla 2.2 Mb (2216911 bp) ve %31.4 olarak belirlenmiştir. Tüm genom tabanlı filogenetik analizde G15S1, *Staphylococcus hominis* NCTC 11320, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* CCUG 42399 ile birlikte kümelenmiş ve %92,9 dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değeri ile G15S1 izolatının *Staphylococcus hominis* türü içinde yer alan bir alt tür olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Ağır metal, Endofit bakteriler, Mikrobiyal biyoteknoloji, Tüm genom analizi



ABSTRACT

WHOLE GENOME ANALYSIS, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF RESISTANCE TO SOME METALS OF G15S1 ENDOPHYTE BACTERIAL ISOLATE

GÖK, Rümeysa

M.Sc. Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bilgin TAŞKIN

May 2023, 52 pages

Endophytes include bacterial or fungal microorganisms that live in/between the tissues of plants but do not cause any visible signs of disease in their host. In our previous study, endophyte bacterial isolate coded G15S1 isolated from various annual plants showed high siderophore production in the presence iron (Fe^{+3}), cobalt (Co^{+2}) and nickel (Ni^{+2}) with some plant growth promoting properties. In this study, growth/colony morphology in different kinds of growth media, biochemical characterization and whole genome sequencing by next generation sequencing were completed. In addition, the resistance of the isolate to copper, zinc, manganese, mercury and lithium metals was tested in solid media, and Minimum Inhibition Concentrations (MIC) were revealed. The phenotypic (biochemical) characteristics of the G15S1 isolate, which was found to have gram-(+), coccus cell morphology, were determined by using Microgen and API commercial kits. The isolate showed positive results only in glucose, urease, citrate, gelatin, sucrose and arabinose tests in these tests. The bacterial isolate was qualitatively examined in terms of their ability to produce protease, lipase, amylase, pectinase, xylanase and cellulase hydrolytic enzymes and it was observed that the isolate could not produce any of the enzymes tested in the relevant differential media.

As a result of whole genome sequencing using the Illumina HiSeq platform, the genome size and genome G+C content of the G15S1 isolate were determined as 2.2 Mb (2216911 bp) and 31.4%, respectively. In the whole genome-based phylogenetic analysis, G15S1 was clustered together with *Staphylococcus hominis* NCTC 11320 and *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* CCUG 42399 and with a digital DNA-DNA hybridization (dDDH) value of 92.9%, G15S1 isolate was revealed to be a subspecies within the genus *Staphylococcus hominis*.

Anahtar kelimeler: Heavy metal, Endophyte bacteria, Microbial biotechnology, Whole genome analysis



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deney aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki tüm genom verilerinin biyoinformatik analizlerinin yapılması aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hilal AY'a teşekkür ederim.

Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyesi ve araştırma görevlisi hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dâhil olmak üzere yaşamımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan annem Belgüzal GÖK ve babam Halil GÖK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmaya FYL-2019-8770 nolu proje ile destek veren Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

2023

Rümeysa GÖK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1 Endofit Bakteriler	3
2.2 Ağır Metal Duyarlılığı	4
2.3 Tüm Genom Dizilenmesi.....	5
2.4 Ekstraselüler (Hücre Dışı) Enzimler	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Bakteri İzolatı	9
3.2. İzolatın Geliştirilmesi	9
3.3. G15S1 İzolatının Farklı Besi Ortamlarındaki Büyüme Profili.....	10
3.4. Gram Boyama	11
3.5. Biyokimyasal Karakterizasyon.....	13
3.6. Ekstraselüler Enzim Aktivitesi Belirlenmesi	12
3.7. Bakır (Cu), Çinko (Zn), Mangan (Mn), Civa (Hg), Lityum (Li) Metallerinin G15S1 İzolatı Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Değerlerinin Belirlenmesi	17
3.8. Tüm Genom Dizileme ve Analizi	17
4. BULGULAR.....	19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	43
ÖZ GEÇMİŞ.....	51



ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Kullanılan izolat, konukçu ve izole edilen organ	9
Çizelge 3.2 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi...	9
Çizelge 3.3 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan besi ortamları ve bileşenleri	10
Çizelge 3.4 Metal stok solüsyonları	16
Çizelge 4.1 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	21
Çizelge 4.2 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla API ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite.....	22
Çizelge 4.3 G15S1 bakteri izolatının ekstraselüler enzim aktiviteleri. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	22
Çizelge 4.4 Bakır (Cu) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.	26
Çizelge 4.5 Mangan (Mn) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.	26
Çizelge 4.6 Çinko (Zn) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.	26
Çizelge 4.7 Civa (Hg) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.	27
Çizelge 4.8 Lityum (Li) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1 Soldan sağa doğru sırasıyla Çinko (0,1 M), Bakır (0.1 M), Lityum (0,1 M), Civa (0,1 M) ve Mangan (0.1 M) stok solüsyonları.....	16
Şekil 4.1 G15S1 izolatının sırası ile TSB (A), NB (B), King's B (C), LB (D) ve PD (E) agar besi ortamlarında 25 oC'de 48 saat inkübasyon sonrası gösterdiği gelişim profilleri.....	19
Şekil 4.2 G15S1 izolatının gram boyaması. Görüntü ışık mikroskobu altında 100X büyütme ile alınıştır.	20
Şekil 4.3 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuç fotoğrafı.....	21
Şekil 4.4 G15S1 bakteri izolatının fenotipik identifikasyon amacıyla API ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuç fotoğrafı.....	21
Şekil 4.5 G15S1 bakteri izolatının ekstraselüler enzim aktivite testlerini gösteren örnek fotoğraflar. A) Selülaz, B) Proteaz, C) Lipaz, D) Amilaz, E) Pektinaz, F) Ksilinaz	23
Şekil 4.6 Çeşitli konsantrasyonlardaki Li (A), Zn (B), Cu (C), Hg (D) ve Mn (E) metallerinin izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisini gösteren örnek petri fotoları.....	24
Şekil 4.7 G15S1 izolatının RAST sunucusu tarafından oluşturulan genom açıklaması (annotation) (https://rast.nmpdr.org/rast.cgi).....	29
Şekil 4.8 Genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı. Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89,1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir..	31
Şekil 4.9 16S rDNA gen dizilerinden hesaplanan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan 16S rRNA tabanlı filogenetik ağaç. Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden	

ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89,1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.. 32

Şekil 4.10 Biyoaktif ikincil metabolit kodlayan gen kümelerini belirlemek için izolatu genomu antiSMASH versiyon 6.0 (Blin vd. 2021) algoritması kullanılarak analiz sonucu..... 33



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigrat
µl.	Mikrolitre
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Fe	Demir
g.	Gram
Hg	Civa
L.	Litre
Li	Lityum
m/v	Mol/Hacim
M.	Molar
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Zn	Çinko

Kısaltmalar

Açıklama

AMY	Amygdalin
ANI	Ortalama Nükleotid Özdeşlik Değeri
ARA	Arabinose
ADH	Arginine
BGC	Biyosentetik Gen Kümesi
C	Sitozin
CIT	Citrate

Kısaltmalar**Açıklama**

CMC	Karboksimetilselülaz
dDDH	Dijital DNA-DNA Hibridizasyon
DNA	Deoksi Nükleik Asit
G	Guanin
GEL	Gelatinase
GLU	Glucose
IND	İndol
INO	İnositol
KCl	Potasyum Klorür
K₂HPO₄	Dipotasyum Fosfat
LB	Luria Broth Agar
LDC	Lysine
MAN	Mannitol
MEL	Melibiose
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları
NaCl	Sodyum Klorür
NaNO₃	Sodyum Nitrat
NIT	Nitrat Resduction
NB	Nutrient Broth agar
ONPG	Beta Galactosidase
ODC	Ornithine
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPR	Bitki Gelişimin Teşvik Edici
RHA	Rhamanose
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
SOR	Sorbitol
SAC	Sucrose
H₂S	Thiosulfate

Kısaltmalar

Açıklama

TDA

Tryptophane

TSB

Tryptic Soy Broth Agar

URE

Urease

VP

Voges-Proskauer





1. GİRİŞ

Endofit bakteriler, sağlıklı bitkilerin kök, yaprak, tohum, sürgün gibi dokularının içlerinde ya da doku aralarında yaşam döngülerinin bir kısmını/tamamını geçiren mikroorganizmalardır (Hallman vd., 1997). Bakteriyel endofitler, konakçı bitkilerin büyümesini teşvik eder ve çeşitli patojenlere ve çevresel streslere karşı dirençlerini artırır. Ayrıca önemli tıbbi özelliklere sahip ikincil metabolitlerin sentezini düzenleyebilir ve çeşitli biyolojik etkiler üretebilirler (Wu vd., 2021). Endofitler, kendilerini dış ortamların negatif etkilerinden korumak için bitkinin iç ortamını (yani endosferi) benzersiz bir niş olarak kullanırlar (Senthil kumar vd., 2011).

Bu son derece uzmanlaşmış simbiyozların evrimi, ortak organizmalar arasındaki fizyoloji, yapı ve yaşam döngülerinin sıkı koordinasyonunu gerektirir (Saikkonen vd., 2004; Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011) ve ortaya çıkan ortaklık her iki türe de fayda sağlar (Aravind vd., 2010). Bu tür karşılıklı ilişkiler karasal ekosistemlerde temel işlevlere hizmet eder: ev sahibi bitkiler endofitleri barındırır ve korur, bu da nitrojen fiksasyonu, fosfor zenginleştirme ve fitohormonların sentezi yoluyla bitkilerin büyümesini destekler (Borah vd., 2019). Bitki mikro ekosistemi için önemlerine rağmen, bakteriyel endofitlerin ev sahibi bitkilerle ilişkisi tam olarak anlaşılammıştır (Tiwari vd., 2013).

Toprak ve su kaynaklarındaki kirliliğin artmasıyla ekolojik kirlenme çağımızın en büyük sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kirliliğe neden olan etmenlerden biri ağır metallerdir. Gelişen endüstri ile birlikte artış gösteren, çinko, bakır, cıva ve lityum gibi ağır metallerin doğal habitatlardan temizlenmesi ve olumsuz etkilerinin minimuma indirgenmesi çözüm bekleyen önemli sorunlardandır. Bununla beraber ağır metallerin çevresel temizliğinde bakteri ve mantarların kullanımı da son yıllarda oldukça fazla önem kazanmaktadır (Hofmann vd., 2020). Endüstriyel tesislerden çevreye salınan metal yüklü atık sular süreçler uygun şekilde idare edilmezse çevresel bir tehdit oluşturur (Verma ve Sharma, 2017). Endofit bakteriler bize hayatımıza doğrudan dokunabilecek potansiyele sahip yeni kaynaklar sunabilirler. Çevresel kirliliğin günümüzde giderek artmasının bir sebebi olan bazı metallerin mikroorganizmalar kullanılarak giderimi olarak tanımlanabilecek biyoremediasyon, bu mikroskobik organizmaların sağladığı yararlılardan sadece bir tanesidir. Ayrıca gittikçe yaygın hale gelen ve çok etkili bir yöntem olan, yeni nesil dizileme ile bir

mikroorganizmanın tüm kromozom/genom dizilemesinin, haritalamasının ve karakterizasyonun yapılması, bir organizmanın sahip olduğu tüm biyoteknolojik uygulama potansiyelini ortaya koyması açısından son derece değerlidir. Tüm genom dizilemesinin, biyokimyasal karakterizasyon, ağır metal/antibiyotik dirençliliği gibi fenotipik veriler eşliğinde sahip olacağı yüksek değer tartışmasız bir gerçektir.

Daha önce Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2019-8770 No'lu proje olarak desteklenen “Çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş olan endofit bakterilerde siderofor üretim potansiyelleri” başlıklı yüksek lisans projemizde, G15S1 kod numaralı endofit bakteri izolatu gerek demir (Fe^{+3}) gerekse kobalt (Co^{+2}) ve Nikel (Ni^{+2}) varlığında siderofor üretme potansiyeli en yüksek izolatların başında gelmiştir. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen başka çalışmalarda PGPR (Bitki Gelişimini Teşvik Edici) markörler açısından da kayda değer veriler ortaya koymuştur. Bu tez çalışması kapsamında G15S1 kod numaralı izolatımızın farklı besi ortamlarındaki büyüme/morfoloji, biyokimyasal testleri, ekstraselüler enzim üretme kabiliyet testleri tamamlanmıştır. Ayrıca izolatımızın bakır, çinko, mangan, civa, lityum metallerine karşı dirençliliği test edilmiş ve katı besi ortamında bu metallere karşı ortaya koyduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MIK) belirlenme testleri sonuçlandırılmıştır. Son olarak, izolatın tüm genom dizilemesi yapılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1 Endofit Bakteriler

Endofit bakteriler, sağlıklı bitkilerin kök, yaprak, tohum, sürgün gibi dokularının içlerinde ya da doku aralarında yaşam döngülerinin bir kısmını/tamamını geçiren mikroorganizmalardır (Hallman vd., 1997). Bakteriyel endofitler, konakçı bitkilerin büyümesini teşvik eder ve çeşitli patojenlere ve çevresel streslere karşı dirençlerini artırır. Ayrıca önemli tıbbi özelliklere sahip ikincil metabolitlerin sentezini düzenleyebilir ve çeşitli biyolojik etkiler üretebilirler (Wu vd., 2021). Endofitler, kendilerini dış ortamların negatif etkilerinden korumak için bitkinin iç ortamını (yani endosferi) benzersiz bir niş olarak kullanırlar (Senthilkumar vd., 2011).

Endofit bakteriler yaşam döngülerinin tamamını veya bir kısmını sağlıklı bitkilerin toprak altındaki kök dokularında veya toprak üstündeki tohum, yaprak, sürgün gibi dokularının iç kısımlarında, doku aralarında veya doku yüzeylerinde geçiren mikroorganizmalardır (Hallman vd., 1997).

Endofit bakteriler yaşamlarını sürdürebilme şekillerine göre iki farklı şekilde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma fakültatif ve obligat şeklindedir. Fakültatif endofit bakteriler konakçı bitkiden ayrı dışarda bir yaşam süreci geçirdiği bir süreç vardır. Obligat endofit bakteriler ise yaşamlarının tamamını sürdürebilmek için kesinlikle bir konakçı bitkiye ihtiyaç duyarlar (Hardoim vd., 2008).

Simbiyotik şekilde yaşamlarını devam ettiren organizmalar arasında fizyolojileri ve yaşam döngülerinde sıkı bir koordinasyon olması gerekir (Saikkonen vd., 2004; Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011). Yaşamlarını simbiyotik olarak yani ortaklık şeklinde devam ettiren her iki tür yaşamlarında karşılıklı fayda sağlar (Aravind vd., 2010). Bu karşılıklı fayda sağlanan yaşam şeklinde endofit bakteriler nitrojen fiksasyonu, fosfor zenginleştirme ve fitohormonların sentezi yoluyla bitkilerin büyümesini destekler (Borah vd., 2019). Konukçusu olduğu bitkilerde endofit bakterileri diğer mikroorganizmalar ile besin rekabetinden ve çevresel etkenlerin sebep olduğu olumsuz durumlardan korur (Sülü vd., 2016). Endofit bakteriler bitki mikro ekosistemi için çok önemli olmalarına rağmen, bakteriyel endofitlerin konukçusu olan bitkilerle ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır (Tiwari vd., 2013).

Endofit bakteriler, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış olan sağlıklı bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi dokuların iç kısımlarından izole edilebilirler (Hallmann vd., 1997; Ryan vd., 2008; Kumar vd., 2014).

Endofit bakterilerin popülasyonları, patojen ve rizosferik bakteri gruplarının popülasyonlarına göre düşük seviyededir (Hallmann vd., 1997; Rosenblueth ve Martínez-Romero,2006). Endofit bakteri popülasyonunun yoğunluğunu konakçı genotipi, konakçının gelişim aşaması, çevre koşulları ve bakterinin türü gibi değişkenlere bağlıdır (Pillay ve Nowak, 1997). Endofit bakterilerin kültüre alınabilen ve kültüre alınamayan 200'den fazla sayıda endofit bakteri cinsi olduğu bilinmektedir. Bu sayı her geçen yıl artmaktadır (Hallmann vd., 1997; Sessitsch vd., 2012; Sun ve Guo 2012).

Endofit bakteriler konakçısına sağlamış olduğu faydalardan kaynaklı olarak çok büyük bir biyoteknolojik öneme sahiptirler. Bitkinin toprağa tutunarak büyümesi ve gelişmesi için yaklaşık 16 elemente gereksinim duyar. Bitkilerin bu elementeleri çevreden alıp kullanılabilir forma getirmesinde en etkin görevi endofit bakteriler gerçekleştirir (Arachevaleta vd., 1989). Virüsler, mantarlar, bakteriler ve böcekler tarafından zarar görmüş hastalıklı bitkilerin tedavisinde veya sağlıklı bitkilerin bu zararlılar tarafından zarar görmesini engellemek için bitkiyi endofit bakteri ile aşılama çalışmaları yapılmaktadır (Sturz ve ark, 2000; Kerry, 2000; Ping ve Boland, 2004; Berg ve Hallmann, 2006).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, mikroorganizmanın büyümesinde, gelişmesinde, rekabet ortamından korunmasında, çoğalmasında dolaylı etkisi olan bileşilere sekonder metabolit denilmektedir (Stamp, 2003). Endofit bakterilerde yaşamlarını sürdürebilmek için pek çok sayıda sekonder metabolit üretmektedir. Bu sekonder metabolitler gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde önemli bir yer almaktadır (Strobel ve Daisy, 2003; Goodstime vd., 2014).

2.2 Ağır Metal Duyarlılığı

Dünya genelindeki toprak ve su kirliliğinin artması çevre kirliliğini çağımızın en büyük sorunlarından biri haline getirmektedir. Ağır metaller bu kirliliğe sebep olan unsurlardan bir tanesidir. Yaşamakta olduğumuz çağda sürekli gelişen sanayi ve

endüstri beraberinde ağır metallerin neden olduğu çevre kirliliğini beraberinde getirmektedir. Endüstriyel atıklardan olan bakır, cıva, çinko ve lityum gibi ağır metalleri doğal yaşam alanlarından arındırılması ve doğaya vermiş oldukları olumsuz etkilerinin en aza indirgenmesi çözümlenmesi beklenen en önemli sorunlardandır. Bununla beraber gelişen biyoteknoloji ile son yıllarda ağır metallerin doğal habitatlardan temizlenmesinde mantarların ve bakterilerin kullanımı da oldukça değer kazanmaktadır (Hofmann vd., 2020).

Endüstriyel üretim yapan işletmelerden doğaya bırakılan ağır metal yüklü atıklar dikkatli ve uygun bir şekilde arındırılmazsa doğa ve canlılar için çok önemli bir boyutta çevresel bir tehdit oluşturmaktadır (Verma vd., 2017). Endofit bakteriler bizlerin yaşamlarına direk fayda sağlayabilecek potansiyele sahip yeni kaynaklar olarak düşünülmektedir. Ekolojik kirliliğin sebeplerinden bir tanesi olan ağır metallerin çevreden mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirmesinde kullanılması şeklinde tanımlanan biyoremediasyon, endofit bakterilerin sağladığı yaralardan bir tanesidir.

2.3 Tüm Genom Dizilenmesi

Sürekli gelişim halinde olan biyoloji bilimindeki en önemli yeniliklerden bir taneside DNA sekanslamasıdır. İlk DNA sekans analiz çalışmalarında çok farklı yöntemler denenmesi sonucunda farklı DNA sekanslama teknikleri bulunmuştur (Wu vd., 2015).

Lynx Therapeutics firması 200 yılında Massively Parallel Signature Sequencing yöntemini kullanarak ilk yeni nesil dizileme teknolojisi (Next Generation Sequencing-NGS) başlatan firma olmuştur. Daha sonraki yıllarda bu firmayı Illumina firması satın almıştır. 454 Life Sciences Roche firması 2004 yılında pirodizileme kimyasına dayalı yeni nesil dizileme teknolojilerinin ikincisini kullanmaya sunmuştur (Cock vd., 2010; Kulski, 2015).

Yaşamakta olduğumuz çağ boyunca devamlı bir şekilde gelişme halinde olan moleküler biyoloji çalışmaları ve ticari olarak alınabilen dış görünüş özelliklere göre tanımlama yapan kitlerin üretilmesi ve geliştirilmesine rağmen halen birçok moleküler genetik ve mikrobiyoloji laboratuvarında bakteri suşlarının tanımlanması aşamasında zorluk yaşanılmaktadır. Bir bakterinin tüm genom dizilemesi ile elde edilen

genomundaki binlerce gen arasından 16S rRNA geni iyi bir şekilde seçilmiş 16S rRNA gen dizisi biyonformatik analizler için tasarlanmış veritabanlarıyla karşılaştırıldığında filogenetik bilgiye dayalı tanımlama için önemli bir görev görmüştür (Rosselló-Mora ve Amann, 2001; Tindall vd., 2010).

Bir bakterinin genom verilerinin yeni nesil dizileme ile elde edilmesi 12 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar sırasıyla biyolojik materyalin elde edilmesi, genomik DNA izolasyonu, DNA'nın hedef bölgelerinin seçilmesi, DNA'nın enzimatik reaksiyola kesilerek DNA kütüphanesinin oluşturulması, kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılması, bu DNA parçalarının dizilenmesi, işlenmemiş verinin oluşturulması, kaynak olarak kullanılan dizinin üzerine haritalama yapılması, olası varyantların analizi ve yorumlanması son olarak raporlanması şeklindedir (Özmerdivenli, 2017)

Endofitik bakterilere ait genomik veriler, bitkilerle simbiyotik ilişki halinde olan endofitlerin yaşam şekli, dağılımı ve çeşitliliği ile ilgili genleri hakkında güçlü bir bilgi kaynağıdır. Bu bilgi kaynaklarındaki genomik verileri mikrobiyal taksonomide anlamlı bir hale getirmek için birçok teknik vardır. Bunlardan iki tanesi çok önemlidir. Bir tanesi 16S rRNA gen dizi analizi diğeri ise DNA: DNA hibridizasyonu tekniğidir. (Konstantinidis ve Tiedje, 2005; Hoffman ve Decho, 1999). Bu hücre yüzeyine bağlı halde olan enzimler bakteriye sağlamış olduğu yararlardan bir tanesinde kullanmış oldukları substratı bakterinin büyüme istekleri üzerinde hidrolize ederek bakteriye beslenme faydası sağlamaktır (Vetter vd., 1998).

Mikroorganizmaların tüm genom verilerini yani protein kodlayan genlerin ve rRNA gen bölgelerinin, genlerin işlevlerinin tanımlanması RAST sunucusu kullanılarak yapılmaktadır (Aziz vd., 2008).

Mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitler insanların, hayvanların ve bitki sağlığında hayati öneme sahiptir. Bakteri, arkelerde ve mantarlarda bu metabolitlerin sentezinde aktif olan genlerin analizi için gelişen bilişim teknolojilerinden olan veri madenciliği ile birlikte mikrobiyal genomda mikroorganizmaların sekonder metabolit sentezinde var olan genlerin ve biyosentetik gen kümelerinin (BGC) modüler yapısını kullanıcıya sunan antSmash programı kullanılmaktadır (Blin vd., 2021).

2.4 Ekstraselüler (Hücre Dışı) Enzimler

Enzimler katalizör madde olarak adlandırılan proteinlerdir. Mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmesi için vücudunda birtakım reaksiyonlar meydana gelir. Enzimler, bu reaksiyonların hızını artırır ve reaksiyon boyunca tüketilmezler. Enzimler mikroorganizma için hayati öneme sahip kimyasal reaksiyonların yüksek bir seviyede hızlanmasına yeni yollar kazandırır (Bender vd.,1984).

Bakteriler sentezledikleri enzimlerin bir kısmının hücre içinde kullanırlar, bir kısmında sitoplazmik membrana bağlı halde bulunan ribozomlar üretir ve membran yolu ile hücre dışına aktarırlar (Priest, 1984). Bakterinin sentezleyip hücre dışına aktardığı enzim bakteri hücresinin dış yüzeyine bağlı halde de kalabilir veya çevreye de bırakılabilir. Bakterinin hücresinin dış yüzeyine bağlı halde olan enzimler bakteri hücresi için hayati öneme sahip reaksiyonlarda katalizör görevinde bulunarak koruduğu için ürün alımında kolaylık oluşur bu sayede bakteriye önemli bir fayda sağlar (Hoffman ve Decho, 1999). Bu hücre yüzeyine bağlı halde olan enzimler bakteriye sağlamış olduğu yararlardan bir tanesinde kullanmış oldukları substratı bakterinin büyüme istekleri üzerinde hidrolize ederek bakteriye beslenme faydası sağlamaktır (Vetter vd., 1998).

Endofitik bakteriler ekstraselüler enzimleri bitkinin kök, sürgün, tohum gibi bölgelerinden izole edildiğini gösteren çok fazla sayıda araştırma sonuçları bulunmaktadır. Hastalıkların tedavisinde kullanılan değerli birçok bitkide ekstraselüler enzimleri üreten endofit bakteriler keşfedilmiştir (Vijayalakshmi vd., 2016).

Enofit bakteriler olarak tanımlanmış olan bakterilerde hücre dışı enzimlerden; lipaz, amilaz, selülaz, proteaz, ksilanaz, pektinaz ve esteraz gibi birçok enzimi üretebildikleri araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir (Sturz ve Nowak, 2000; Carrim vd., 2006).

Amilaz enzimi, kıyafetlerin beyazlatılması, nişastalı atıklardan oligosakkaritlerin uzaklaştırılması, unlu mamüllerin üretimindeki en önemli adım olan hamurun mayalanmasında, haşıl sökülmesi olarak bilinen kumaş üzzerinden nişastanın uzaklaştırılması gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Borchet vd., 1995; Tanaka ve Hoshino, 1999; Gupta vd., 2003; Drauz vd., 2010).

Selülaz enzimi, genellikle bitki hücrelerinin yapısında bulunur. Bakteriler tarafından üretilmektedir. Selülaz enzimi, tekstil endüstrisinde kotların taşlanması ve kumaşların parlatılmasında kullanılmaktadır (McMullan vd., 2001). Gıda endüstrisinde selülaz enzimi, hayvan yemi üretiminde, meyve suyu ve şarap üretiminde, zeytin yağı ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Menendez vd., 2015).

Ksinilaz enzimi, gıda endüstrisinde bulanık haldeki meyve sularının bulanıklılığını gidermek için kullanılmaktadır. Ksinilaz, şarap üretiminde ve unlu mamul üretiminde kullanılan hamurun yumşatılmasında kullanılmaktadır (Biely, 1985). Klorlu ağartıcıların yerine kullanılacak bir alternatiftir (Kantelinen vd., 1993).

Pektinaz enzimi, meyvelerin işlenmesinde, hayvan yemlerinin üretiminde, kâğıt endüstrisinde kullanılan bir enzimdir. Pektinazlar, çay üretimindeki sorunların başında gelen köpük oluşumunu engeller. Çayın fermantasyonunun gecikmesi sorununa çözüm sağlayarak hızlandırır ve çayın renk değişimi, aromasına katkı sağlar (Chaudhri ve Suneetha, 2012; Praveen ve Suneetha, 2015).

Lipaz enzimi, lipitlerin gliserole ve yağ asitlerine kadarki hidroliz reaksiyonunu katalize eden enzimdir. Lipazlar, gıda endüstrisinde ucuz yağların kaliteli yağlara evrilmesinde, detarjan endüstrisinde çamaşır, bulaşık ve tıkanmış gider borularındaki yağ kalıntılarının giderilmesine özgü tasarlanan detarjanlarda kullanılmaktadır (Nakajima vd., 2000; Nerurkar vd., 2013).

Proteaz enzimi, peptid bağlarının hidrolizini katalize eden enzimdir. Proteazlar gıda endüstrisinde ekmekteki gluteniin etkisini düzenlemektedir (Tucker ve Woods, 1995, Miguel vd., 2013). Süt endüstrisinde, süt ürünlerindeki alerjenik özelliklerin azaltılması ve peynirin olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır (Thomas ve Mills, 1981).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bakteri İzolatı

Bu çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bakteriyoloji laboratuvarında stoklarında bulunan, Van ili ve civarında, bazı kültür ve yabancı tahıl bitkilerinden (Poaceae familyası) izole edilmiş ve daha önce Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2019-8770 No'lu proje olarak desteklenen “Çeşitli Tek Yıllık Bitkilerden İzole Edilmiş Olan Endofit Bakterilerde Siderofor Üretim Potansiyelleri” başlıklı yüksek lisans projesinde de kullanılan G15S1 kod numaralı endofit bakteri izolatu kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan izolat, konukçu ve izole edilen organ

İzolat No	İzolat Kodu	Konukçu	İzolasyon Yapılan Organ
1	G15S1	Yulaf/Albatros	Sürgün

3.2. İzolatın Geliştirilmesi

%20 gliserol içeren nutrient sıvı besiyerinde -80°C'de saklanan saf kültürlerin geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar (NA) besi ortamının Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Nutrient Agar	Et Özütü	1 g
	Maya Özütü	2 g
	NaCl	5 g
	Pepton	5 g
	Agar	15 g

3.3 G15S1 İzolatının Farklı Besi Ortamlarındaki Büyüme Profili

G15S1 izolatının farklı besiyer ortamlarındaki gelişim profillerini ve morfolojik karakterizasyonlarını oluşturmak için, Luria Broth agar (LB), Nutrient Broth agar (NB) (Dogan ve Taskin, 2021), Tryptic Soy Broth agar (TSB) gibi zengin besiyer ortamlarının yanı sıra King's B agar (Akköprü, 2012) ve Potato Dextrose agar (PD) gibi ayırt edici özellikleri bulunan katı besiyer ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan besiyer ortamları ve bileşenleri

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Nutrient Broth Agar	Et Özütü	1 g
	Maya Özütü	2 g
	NaCl	5 g
	Pepton	5 g
	Agar	15 g
Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Luria Broth Agar	Tripton (Tryptone)	10 g
	Maya Özütü	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	15 g
Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Tryptic Soy Broth Agar	Tripton (Tryptone)	17 g
	Pepton (Soybean)	3 g
	Glikoz	2.5 g
	NaCl	5 g
	K ₂ HPO ₄	2.5 g
	Agar	15 g

Çizelge 3.3 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan besi ortamları ve bileşenleri (devam)

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
King's B Agar	Pepton	20 g
	Gliserol	10 mL
	K ₂ HPO ₄	1.5 g
	MgSO ₄	1.5 g
	Agar	15 g

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Potato Dextrose Agar (PDA)	Patates İnfüzyonu	200 g
	Dekstroz	20 g
	Agar	20 g

3.4 Gram Boyama

Gram boyama yapmak için hazırlanmış bakteri preparatının üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika beklenmiştir. Preparata iyot (lugol) çözeltisi damlatılarak 1-2 dakika bekletilip, distile su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine %96'lık etil alkol damlatılarak 15-30 saniye beklenmiş, distile su ile yıkanmış ve karşıt boya olarak safranin damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Preparat distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Lamel üzerine immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifle incelenmiştir. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.5 Biyokimyasal Karakterizasyon

Çalışmada besiyeri ortamında izole edilen ve G15S1 bakteri izolat kültürleri fenotipik identifikasyon amacıyla Microgen ve API ticari kitleri (GNA-GNB) kullanılarak fenotipik (biyokimyasal) özellikleri belirlenmiştir. Besiyerinde 25 °C' de 48 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik dansiteye ayarlanan bakteriler kit içerisindeki küpüllere inoküle edilerek 25 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

İnkübasyon sonrasında mikrogen ve API firmasının okuma tablosuna göre sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Önalın ve Çevik, 2018).

3.6 Ekstraselüler Enzim Aktivitesi Belirlenmesi

Tüm ölçüm deneyleri dörder tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.6.1 Proteaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Carrim vd. (2006)'nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. 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 besi ortamına aseptik koşullarda ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülerek katılması beklenmiştir. Çözünabilir süt tozu içeren proteaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen izolat, 25°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Koloni etrafında şeffaf bir zon oluşumu proteaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2 Amilaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Amilaz aktivitesi Hankin ve Anagnostakis (1975)'in bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Amilaz enzimi üretimi için %1 çözünabilir nişasta içeren Nutrient Agar hazırlanmıştır. Çözünabilir nişasta içeren amilaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen suş 25°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petriye lügol çözeltisi (%1'lik iyot çözeltisi) dökülerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Amilaz aktivitesine sahip izolatta koyu mavi zemin üzerinde koloni çevresinde şeffaf bir zon oluşumu amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.6.3 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, CaCl₂ H₂O 0.1 g, agar 15 g, pH 6.0 ve 20 ml Tween 20. 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. İzolatın lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla lipaz ortamlarına nokta ekimi yapılmış ve izolat gelişme sıcaklığında 2-3 gün inkübe edilmiştir. Koloni çevresinde açık renkte opak zon oluşumu lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.6.4 Selüloz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Selüloz aktivitesi Amore vd. (2015)'nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle selüloz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla selüloz ortamı hazırlanmıştır. Selüloz 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, Karboksimetilselüloz (CMC) 5 g, Agar 15 g Selüloz ortamında yer alan bileşenlerin distile suda tamamen çözülmesinden sonra ortam 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra hazırlanan besi ortamları eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülmüştür. İzolatın selüloz aktivitesinin belirlenebilmesi için selüloz ortamına nokta ekimi yapılmış ve 25°C'de 5-8 gün inkübasyona bırakılmıştır. 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 oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.6.5 Ksilanaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Ksilanaz aktivitesi Amore vd. (2015)'nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ksilanaz ortamı hazırlanmıştır. Ksilanaz 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, agar 15 g, Ksilan 5 g. 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 katılması 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.

3.6.6 Pektinaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Pektinaz aktivitesi Kobayashi vd. (1999)'nin 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, Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3g, Pektin 5 g, Agar 15 g. Pektinaz ortamının içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril besiyeri aseptik koşullarda petrilere 20'şer ml dökülerek katılması 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.

3.7 Bakır (Cu), Çinko (Zn), Mangan (Mn), Civa (Hg), Lityum (Li) Metallerinin G15S1 İzolatı Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Değerlerinin Belirlenmesi

İzolatin her bir metal iyonu için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri, katı besi ortamındaki ağır metal konsantrasyonları izolat büyüemeyene kadar kademeli olarak artırılarak belirlenmiştir (Atbaş, 2022). Bunun için mangan, bakır, çinko, lityum ve civa stok solüsyonları hazırlanmış, filtrasyon yöntemi ile sterilizasyonları sağlanmış ve nutrient agar katı besiyerine eklenerek, farklı konsantrasyonlarda ağır metal içeren katı besi ortamları hazırlanacaktır.

İzolatların her bir metal iyonu için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değerleri, katı besiyeri ortamındaki ağır metal konsantrasyonları izolatlar büyüemeyene kadar kademeli olarak artırılarak belirlenmiştir. Bunun için HgCl₂, LiCl, CuSO₄.5H₂O, ZnSO₄.7H₂O ve MnCl₂.4H₂O stok solüsyonları hazırlanarak, filtrasyon yöntemi ile sterilizasyonları sağlanmıştır (Çizelge 3.4, Şekil 3.1). Bakır için, 0.1 mM aralıklarla 0 mM-2 mM arasında CuSO₄ içeren, mangan için 0.1 mM aralıklarla 0 mM-2 mM arasında MnCl₂ içeren, lityum için yine 0.1 mM aralıklarla 0 mM-8 mM arasında LiCl içeren, civa için 0.01 mM aralıklarla 0 mM-0.1 mM arasında HgCl₂ içeren ve çinko için 0.1 mM aralıklarla 0 mM-1 mM arasında ZnSO₄ içeren besi ortamları kullanılmıştır. Metallerin ilgili konsantrasyonlarını içeren NA besi ortamlarını hazırlamak için, otoklav yolu ile sterilize edilmiş ve 60-70 °C ye kadar soğutulmuş besi ortamlarına gerekli hacimde alınan ilgili metal stoğu eklenmiş ve karıştırılarak aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür. EB izolatının 10⁶ cfu/ml yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 20 µl alınarak hazırlanan NA besi ortamına birbirinden eşit uzaklıktaki noktalara damlatma yolu ile ekimler yapılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra bile izolatlar petrilere büyümediğinde MIC değerleri not edilmiştir. Tüm ölçüm deneyleri dörder tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Çizelge 3.4 Metal stok solüsyonları

Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0.1 M)
MnCl ₂ .4H ₂ O (MW=197,91 g/mol)	MnCl ₂	0.395 g
	dH ₂ O	20 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0.1 M)
HgCl ₂ (MW=271,50 g/mol)	HgCl ₂	0.543 g
	dH ₂ O	20 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0.1 M)
LiCl (MW=42,39 g/mol)	LiCl	0.084 g
	dH ₂ O	20 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0.1 M)
CuSO ₄ .5H ₂ O (MW=249,69 g/mol)	CuSO ₄	0.50 g
	dH ₂ O	20 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0.1 M)
ZnSO ₄ .7H ₂ O (MW=287,56 g/mol)	ZnSO ₄	0.575 g
	dH ₂ O	20 mL



Şekil 3.1 Soldan sağa doğru sırasıyla Çinko (0.1 M), Bakır (0.1 M), Lityum (0.1 M), Civa (0.1 M) ve Manganez (0.1 M) stok solüsyonları

3.8 Tüm Genom Dizileme ve Analizi

İzolatların tüm genom dizilemesi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir (MicrobesNG, <https://microbesng.com/>). Tüm genom Illumina HiSeq 2500 yeni nesil dizileme platformu kullanılarak hizmet alımı ile dizilenmiştir. Tüm genom dizi verisi BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center) (<https://www.bv-brc.org/>) sunucusunda birleştirildikten sonra NCBI veri tabanına yüklenerek erişim numarası alınmıştır. Genom dizisinin anotasyonu RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd. 2008) sunucusunda yapılarak protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri belirlenmiştir. Biyosentetik gen kümelerinin tahminleri antiSMASH versiyon 6.0'da (Blin vd. 2021), antibiyotik dirençliliği ile ilişkili genlerinin tespiti ARTS sunucusunda (<https://arts.ziemertlab.com/analyze>) (Mungan vd. 2020) yapılmıştır. Daha kapsamlı bir filogenetik analiz için, izolatların genom dizileri Type Strain Genome Server'a (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff vd., 2019) yüklenerek tüm genom dizisine dayanan bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca, tüm genom dizisi kullanılarak izolatların veritabanlarındaki mikroorganizmalarla olan uzaklığı dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) (<https://ggdc.dsmz.de/>) analizi ve ortalama nükleotid özdeşlik değeri (ANI) hesaplanmasıyla (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) tespit edilmiştir.

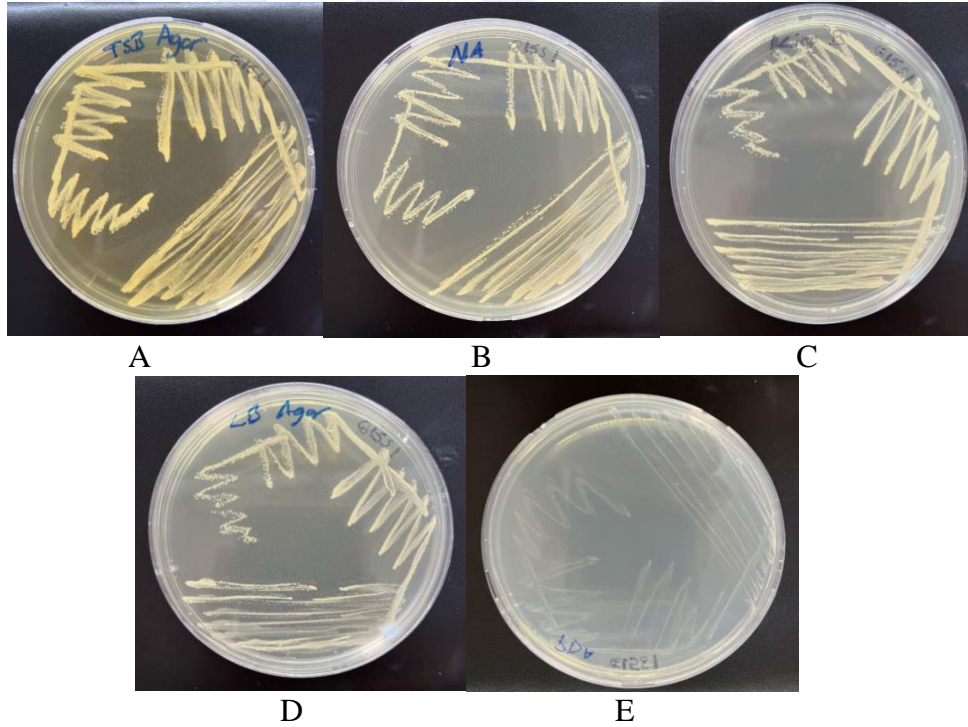


4. BULGULAR

4.1 G15S1 İzolatının Farklı Besi Ortamlarındaki Büyüme Profili

G15S1 izolatının farklı besi ortamlarındaki gelişim profillerini ve morfolojik karakterizasyonlarını oluşturmak için, Luria Broth agar (LB), Nutrient Broth agar (NB) (Dogan ve Taskin, 2021), Tryptic Soy Broth agar (TSB) gibi zengin besi ortamlarının yanı sıra King's B agar (Akköprü, 2012) ve Potato Dextrose Agar (PDA) gibi ayırtdedici özellikleri bulunan katı besi ortamları kullanılmıştır.

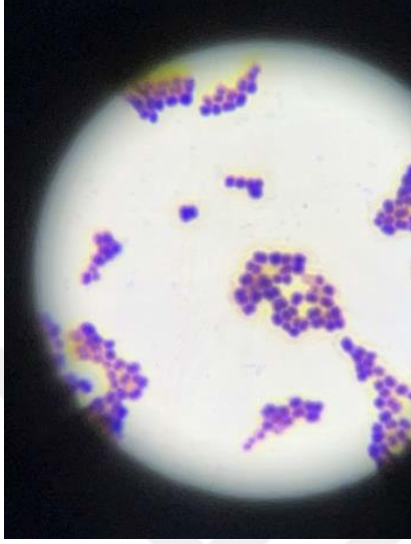
Yapılan deneyler G15S1 izolatının en verimli ve hızlı bir şekilde TSB agar besi ortamında geliştiği gözlemlenmiştir. Bu besi ortamlarını sırası ile NB agar, King's B agar, LB agar besi ortamları izlemiş ve izolatın bu üç besi ortamında benzer gelişme profili ortaya koymuş olmasına rağmen NB agar besi ortamının az da olsa daha iyi bir performans gösterdiği gözlemlenmiştir. İzolatın en az gelişim gösterdiği besi ortamı PDA olmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 G15S1 izolatının sırası ile TSB (A), NB (B), King's B (C), LB (D) ve PD (E) agar besi ortamlarında 25 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası gösterdiği gelişim profilleri

4.2 Gram Boyama

Gram boyaması sonucunda G15S1 hücrelerinin Gram (+) ve kok morfolojisine sahip olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 G15S1 izolatının gram boyaması. Görüntü ışık mikroskobu altında 100X büyütme ile alınmıştır

4.3 Biyokimyasal Aktivite Testleri

Çalışmada, G15S1 bakteri izolat kültürlerinin fenotipik tanımlama amacıyla Microgen ve API ticari kitleri (GNA-GNB) kullanılarak fenotipik (biyokimyasal) özellikleri belirlenmiştir (Önalın ve Çevik, 2018). Besiyerinde 25°C’de 48saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik dansiteye ayarlanan bakteriler kit içerisindeki küpüllere inoküle edilerek 25°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). İnkübasyon sonrasında mikrogen ve API firmalarının okuma tablosuna göre sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).



Şekil 4.3 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuç fotoğrafı



Şekil 4.4 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılamaya amacıyla API ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuç fotoğrafı

Çizelge 4.1 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

Biyokimyasal Testler	GNA Strip	Biyokimyasal Testler	GNB Strip
Lysine	-	Gelatin	+
Ornithine	-	Malonate	-
H ₂ S	-	Inositol	-
Glucose	+	Sorbitol	-
Mannitol	-	Rhamnose	-
Xylose	-	Sucrose	+
ONPG	-	Lactose	-
Indole	-	Arabinose	+
Urease	+	Adonitol	-
VP	-	Raffinose	-
Citrate	+	Salicin	-
TDA	-	Arginine	-

Çizelge 4.2 G15S1 bakteri izolatının fenotipik tanılama amacıyla API ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

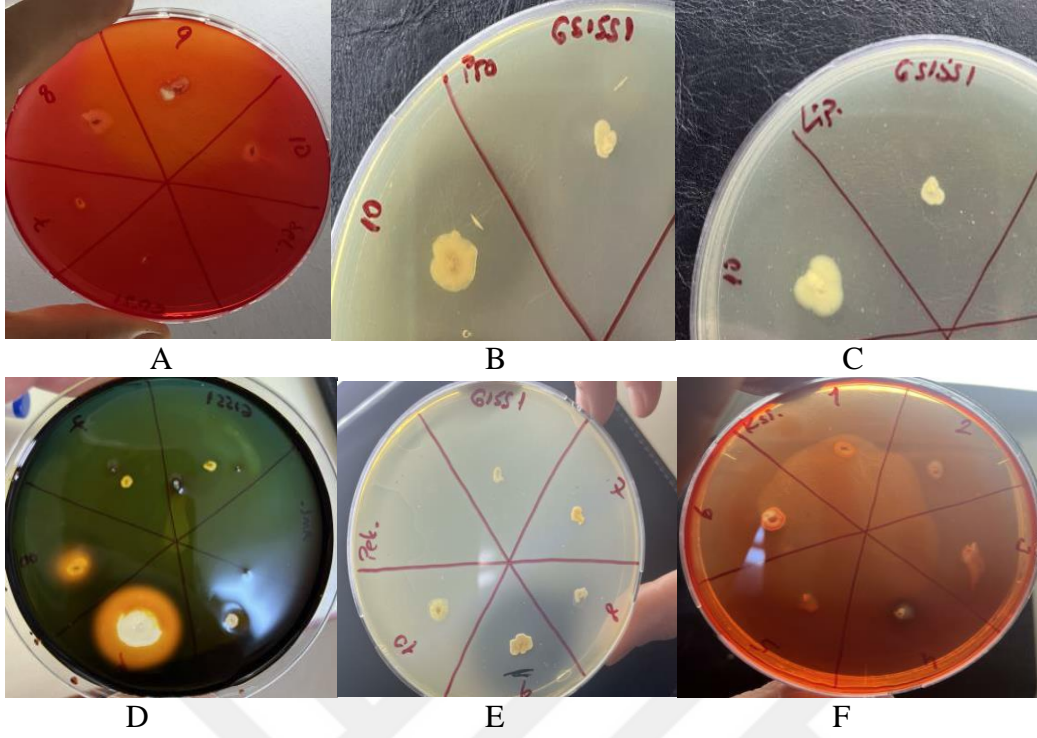
Biyokimyasal Testler	Sonuç	Biyokimyasal Testler	Sonuç
ONPG	-	Mannitol (MAN)	-
Arginine (ADH)	-	Inositol (INO)	-
Lysine (LDC)	-	Sorbitol (SOR)	-
Ornithine (ODC)	-	Rhamanose (RHA)	-
Citrate (CIT)	+	Sucrose (SAC)	+
Thiosulfate (H ₂ S)	-	Melibiose (MEL)	-
Urease (URE)	+	Amygdalin (AMY)	-
Tryptophane (TDA)	+	Arabinose (ARA)	-
Indol (IND)	-	Nitrate reduction (NIT)	-
Voges-Proskauer (VP)	-	Gelatinase (GE)	+
Glucose (GLU)	+		

4.4 Ekstraselüler Enzim Aktivite Testleri

Bakteri izolatı proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz ve selülaz enzimlerini üretebilme yetenekleri açısından nitel olarak incelenmiştir. İzolatın ilgili ayırt edici besi ortamlarında test edilen enzimlerin hiçbirini üretmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 G15S1 bakteri izolatının ekstraselüler enzim aktiviteleri. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

İzolat	Amilaz	Proteaz	Selülaz	Ksilinaz	Pektinaz	Lipaz
G15S1	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.5 G15S1 bakteri izolatının ekstraselüler enzim aktivite testlerini gösteren örnek fotoğraflar. A) Selülaz, B) Proteaz, C) Lipaz, D) Amilaz, E) Pektinaz, F) Ksilinaz

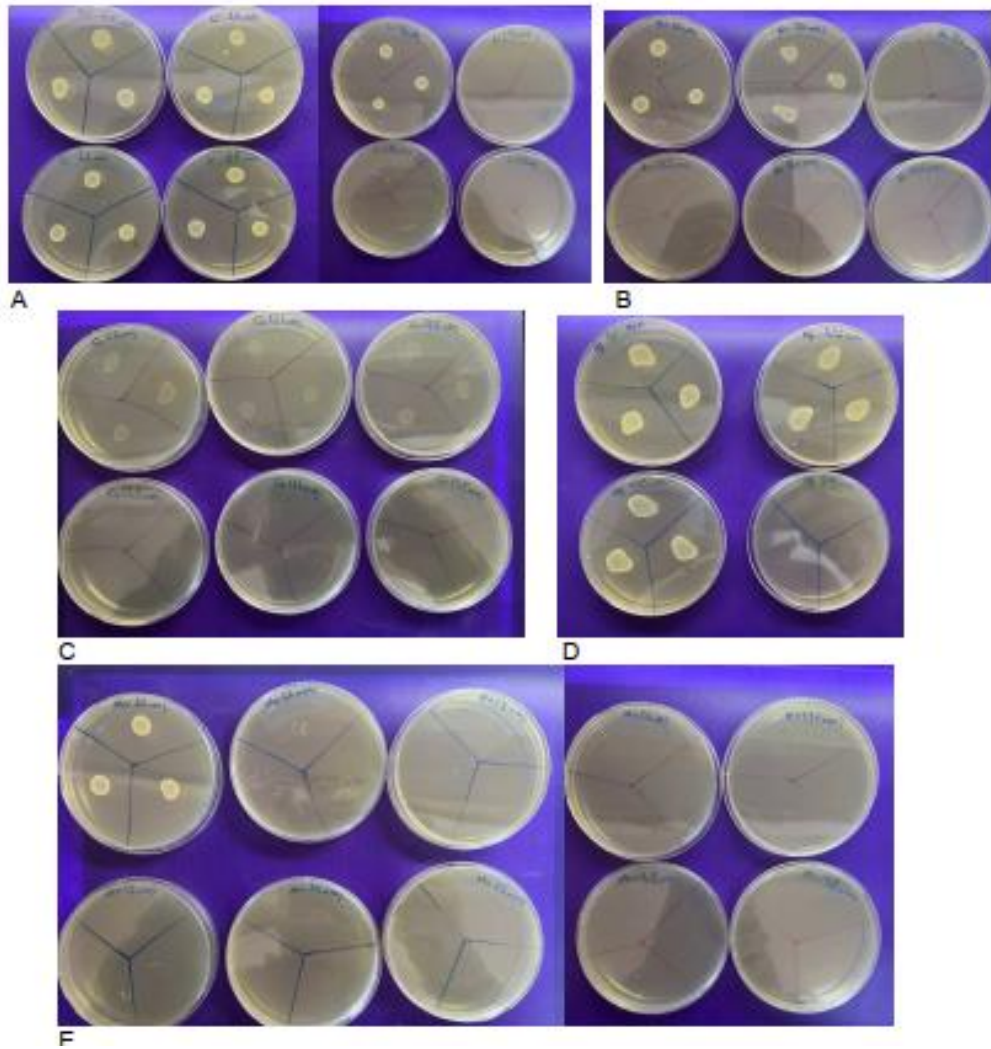
4.5 Bakır (Cu), Çinko (Zn), Mangan (Mn), Civa (Hg), Lityum (Li) Metallerinin G15S1 İzolatı Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Değerlerinin Belirlenmesi

Metallerin MIC değerlerini belirleyebilmek için izolatlar belirli konsantrasyonlar da ilgili metal solüsyonu içeren Nutrient Broth Agar (NBA) besiyeri yüzeylerine, birbirine eşit uzaklıkta olacak şekilde nokta ekim tekniği ile inoküle edilmişlerdir (Şekil 1). Sonrasında petri 72 saat süre ile 25°C de inkübasyona bırakılmış ve bu süreç sonunda koloni büyümesinin gerçekleşip gerçekleşmediği gözlemlenmiş ve çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 4.4-8). Bu amaç doğrultusunda hazırlanan stok metal solüsyonları filtrasyon yolu ile sterilize edilmiş ve steril NBA besiyerlerine aseptik olarak ayrıca eklenmiştir.

Bakır (Cu) için, 0.1 mM aralıklarla 0-2 mM arasında CuSO_4 içeren besi ortamlarında G15S1 izolatının koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 1.5 mM ve üstü CuSO_4 içeren besi ortamlarında izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. (Çizelge 4.4).

Mangan (Mn) için, 0.1 mM aralıklarla 0-2 mM arasında $MnCl_2$ içeren besi ortamlarında G15S1 izolatının koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 1.0 mM ve üstü $MnCl_2$ içeren besi ortamlarında izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. (Çizelge 4.5).

Çinko (Zn) için, 0.1 mM aralıklarla 0-1 mM arasında $ZnSO_4$ içeren besi ortamlarında G15S1 izolatının koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 0.2 mM ve üstü $ZnSO_4$ içeren besi ortamlarında izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. (Çizelge 4.6).



Şekil 4.6 Çeşitli konsantrasyonlardaki Li (A), Zn (B), Cu (C), Hg (D) ve Mn (E) metallerinin izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisini gösteren örnek petri fotoları

Civa (Hg) için, 0.01 mM aralıklarla 0-0.1 mM arasında HgCl₂ içeren besi ortamlarında G15S1 izolatının koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 0.04 mM ve üstü HgCl₂ içeren besi ortamlarında izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. (Çizelge 4.7).

Lityum (Li) için, 0.1 mM aralıklarla 0-8 mM arasında LiCl içeren besi ortamlarında G15S1 izolatının koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 6.9 mM ve üstü LiCl içeren besi ortamlarında izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. (Çizelge 4.8).



Çizelge 4.4 Bakır (Cu) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi. +++: Güçlü Büyüme Var, ++: Büyüme Var, +: Zayıf Büyüme Var, -: Büyüme Yok

Bakır (Cu)										
Konsantrasyonu	0	0,5	1	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	
(mM)										
G15S1	++++	+++	++	++	++	+	+	-	-	

Çizelge 4.5 Mangan (Mn) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatının üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi.+++ : Güçlü Büyüme Var, ++: Büyüme Var, +: Zayıf Büyüme Var, -: Büyüme Yok

Mangan (Mn)										
Konsantrasyonu	0	0,5	0,9	1	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	
(mM)										
G15S1	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 4.6 Çinko (Zn) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatinin üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi. +++: Güçlü Büyüme Var, ++: Büyüme Var, +: Zayıf Büyüme Var, -: Büyüme Yok

Çinko (Zn)									
Konsantrasyonu	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
(mM)									
G15S1	+++	++	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.7 Civa (Hg) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatinin üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi. +++: Güçlü Büyüme Var, ++: Büyüme Var, +: Zayıf Büyüme Var, -: Büyüme Yok

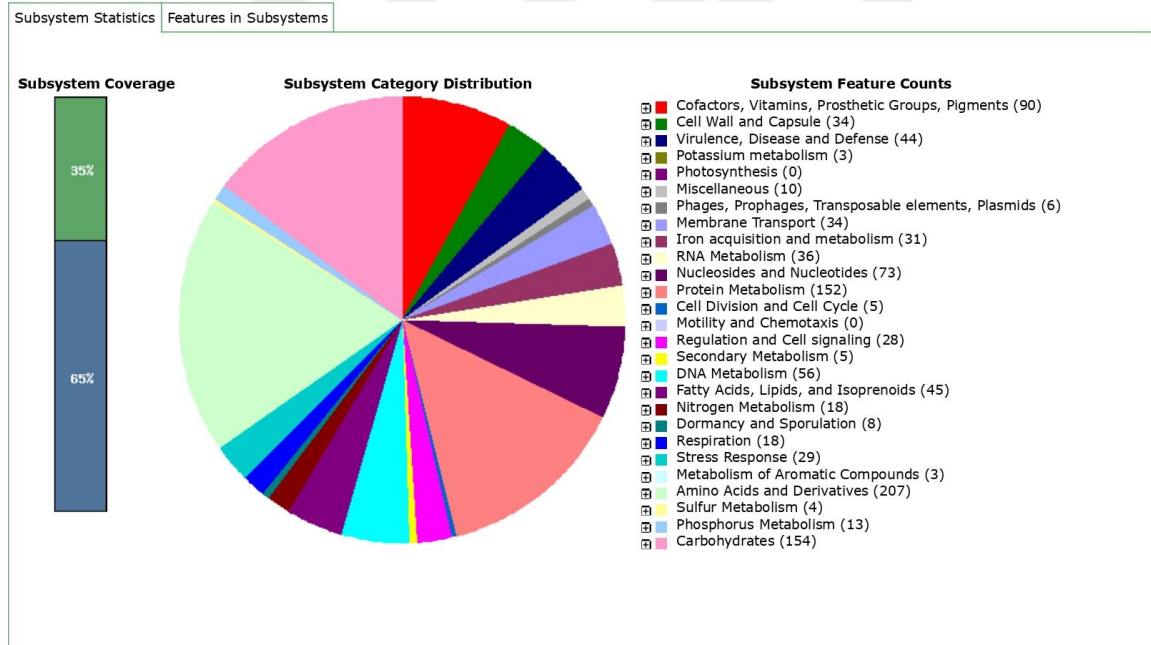
Civa (Hg)									
Konsantrasyonu	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	
(mM)									
G15S1	+++	++	++	++	-	-	-	-	

Çizelge 4.8 Lityum (Li) metalinin farklı konsantrasyonlarının G15S1 izolatinin üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi. +++: Güçlü Büyüme Var, ++: Büyüme Var, +: Zayıf Büyüme Var, -: Büyüme Yok

Lityum (Li) Konsantrasyonu (mM)	0	1	2	3	4	5	6	6.2	6.4	6.6	6.8	6.9	7
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-

4.6 G15S1'in Genom Özellikleri

G15S1 izolatının tüm genom verileri GenBank'a JARWBN000000000 erişim numarası altında yüklenmiştir. Genom verilerinin açıklaması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilmiştir (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Genom boyutunu ve genom G+C içeriği sırasıyla 2.2 Mb (2216911 bp) ve %31.4 olarak belirlenmiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 2199 protein ve 68 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Genomun büyük bir kısmının amino asitlerin ve türevlerinin sentezi ve metabolizmasına yönelik genleri kodladığı görülürken, izolat virülans, hastalık ve antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil savunma özelliklerinden sorumlu 44 geni kodladığı görülmüştür. İzolat genomunun, kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar ve pigmentler için 90 geni kodladığı, ayrıca genomun, izolatın farklı ortamlara dayanıklılık ve adaptasyon potansiyelini gösteren stres yanıtıyla ilgili 29 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 G15S1 izolatının RAST sunucusu tarafından oluşturulan genom açıklaması (annotation) (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)

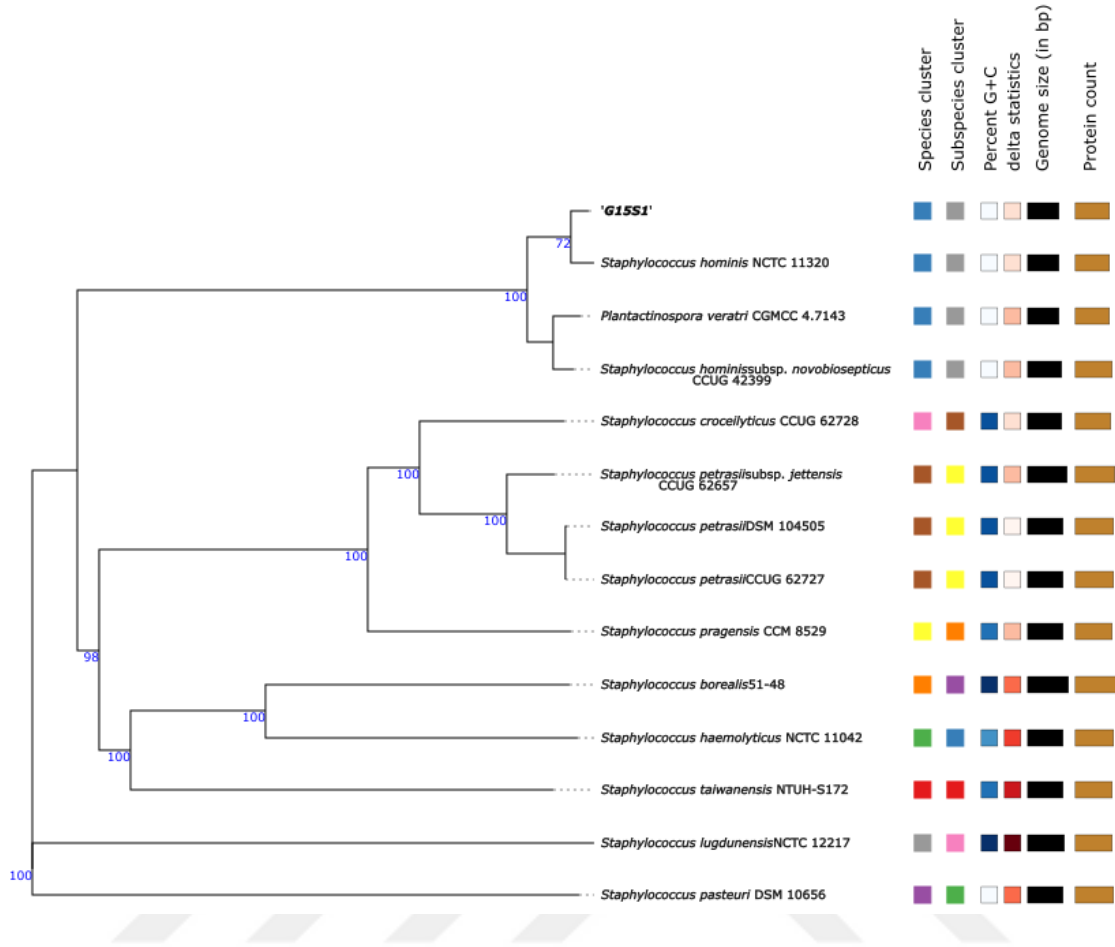
4.7 G15S1 İzolatının Filogenetik Analizi

Tüm genom tabanlı ve 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçlar, TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.8), G15S1, *Staphylococcus hominis* NCTC 11320, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* CCUG 42399 ve *Plantactinospora veratri* CGMCC 4.7143 ile birlikte kümelenirken, *Staphylococcus pragensis* CCM 8529, *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis* CCUG 62657, *Staphylococcus taiwanensis* NTUH-S172 ile daha büyük bir küme oluşturduğu görülmektedir. Benzer bir şemayı 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaç da yansıtmaktadır (Şekil 4.9).

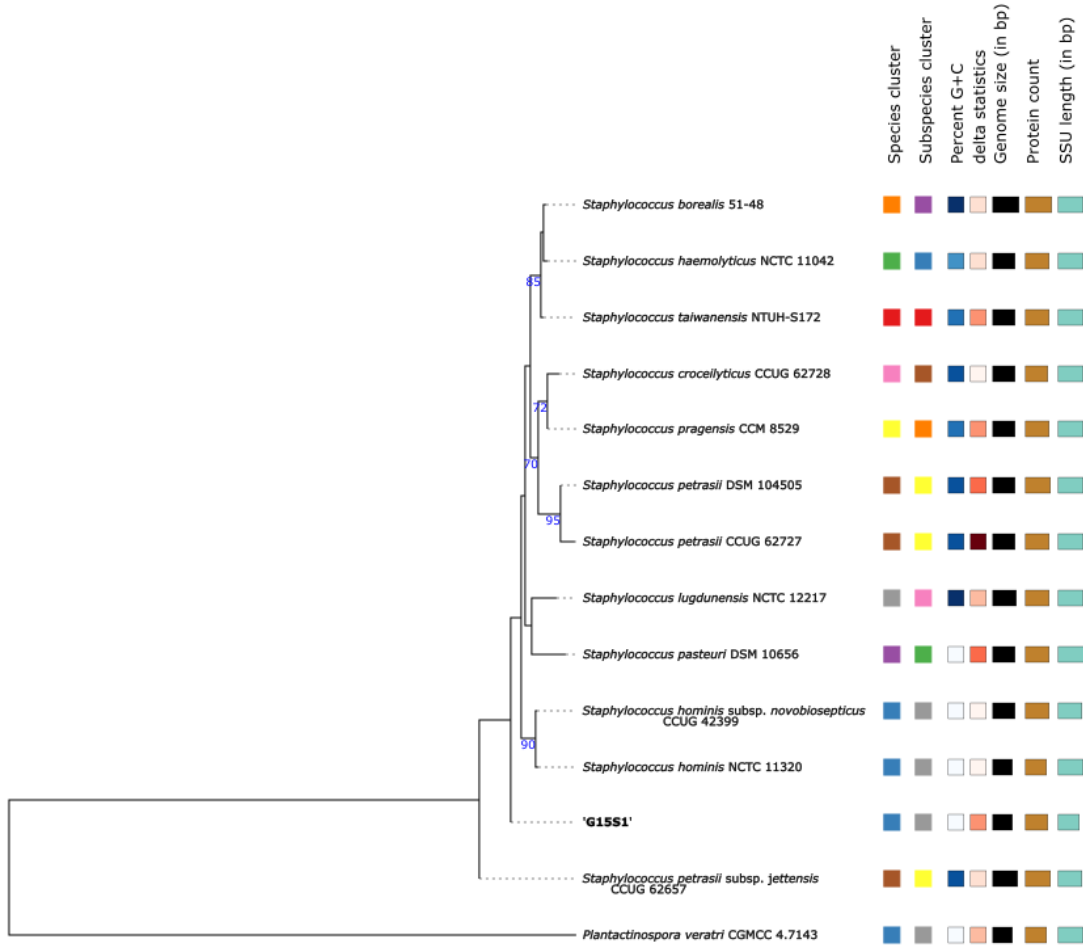
İzolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri de TYGS kullanılarak belirlenmiştir. İzolatın *Staphylococcus hominis* NCTC 11320 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %92.9 olup, bu da G15S1 izolatının *Staphylococcus hominis* türü içinde yer alan alt tür olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8).

4.8. Biyoaktif Sekonder Metabolitler için izolat G15S1'in Biyosentetik Potansiyeli

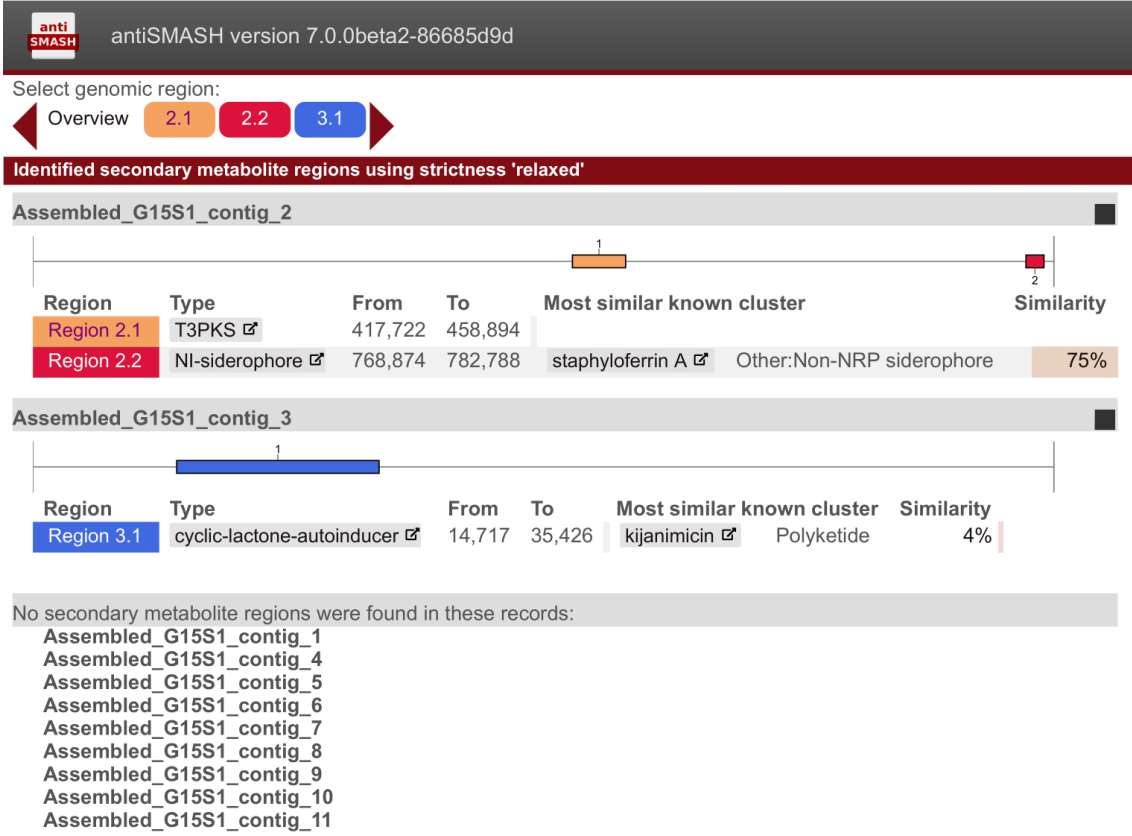
Biyoaktif ikincil metabolit kodlayan gen kümelerini belirlemek için izolatın genomu antiSMASH versiyon 6.0 (Blin vd., 2021) algoritması kullanılarak analiz edilmiştir. İzolat genomu, terpen, cyclic-lactone-autoinducer ve sideroforları kodlayan gen kümelerine sahiptir (Şekil 4.10). İzolat genomu, daha önce tanımlanmış olan staphyloferrin A tipi siderofor gen kümesi ile %75 benzerlik taşıyan gen kümesine sahiptir. Ayrıca izolat genomunun, cyclic-lactone-autoinducer gen kümesi ile %4 benzerlik taşıyan ve bilinen terpen gen kümeleri ile benzerlik taşımayan bir adet terpen gen kümesine de sahip olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.8 Genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı. Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.



Şekil 4.9 16S rDNA gen dizilerinden hesaplanan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan 16S rRNA tabanlı filogenetik ağaç. Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.



Şekil 4.10 Biyoaktif ikincil metabolit kodlayan gen kümelerini belirlemek için izolatın genomu antiSMASH versiyon 6.0 (Blin vd., 2021) algoritması kullanılarak analiz sonucu



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması, daha önce “Çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş olan endofit bakterilerde siderofor üretim potansiyelleri” başlıklı yüksek lisans projemizde, gerek demir (Fe^{+3}) gerekse kobalt (Co^{+2}) ve Nikel (Ni^{+2}) varlığında siderofor üretme potansiyeli en yüksek izolatların başında gelen, aynı zamanda laboratuvarımızda gerçekleştirilen başka çalışmalarda PGPR (Bitki Gelişimini Teşvik Edici) markörler açısından da kayda değer veriler ortaya koyan G15S1 kod numaralı endofit bakteri izolatının tüm genom dizileme ve biyokimyasal/fenotipik karakterizasyon yolu ile incelenmesi merkezinde yapılan bir çalışmadır.

Endofit bakteriler, sağlıklı bitkilerin çok çeşitli dokularının içlerinde ya da doku aralarında yaşamlarının bir kısmını/tamamını geçiren mikroorganizmalardır (Hallman vd., 1997). Bu simbiyotik organizmaların evrimi, konukçu ve konak arasında pek çok açıdan koordinasyon gerektirir (Saikkonen vd., 2004; Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011) ve ortaya çıkan ortaklık her iki türe de fayda sağlar (Aravind vd., 2010). Bu sayede ev sahibi bitkiler endofitleri barındırır ve korur, karşılığında bakteriler tarafından sağlanan nitrojen fiksasyonu, fosfor zenginleştirme ve fitohormonların sentezi bitkilerin büyümesini destekler ve teşvik eder (Borah vd., 2019).

Genom verilerinin açıklaması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilen (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) G15S1 izolatının yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri sonucunda, izolatın *Staphylococcus hominis* NCTC 11320 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %92.9 olduğu tespit edilmiştir. Bu değer G15S1 izolatının *Staphylococcus hominis* türü içinde yer alan bir alt tür olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

Staphylococcus hominis, Gram-pozitif bir nozokomiyal (hastane kaynaklı) patojendir ve küresel hücrelerden oluşan stafilokok cinsinin bir üyesidir (Abdalla vd., 2013). İnsan ve hayvan derisi için zararsız olmasına rağmen, bağışıklığı baskılanmış hastalarda potansiyel olarak kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olur. Koagülaz negatif stafilokoklar (CON'ler) arasında *S. hominis*, hastanede yatan hastaların kanından en çok tanımlanan üç izolattan biridir (Mendoza-Olazarán vd., 2013). Her ne kadar insan ve hayvan mikrobiyotasının bir üyesi olarak tanınsa da bu türe ait pek çok suşun çeşitli bitkilerden endofit olarak izole edildiği çalışmalar da mevcuttur. Yakın zamanda

gerçekleştirilen bir çalışmada ıhlamurgiller ailesinden, jüt bitki tohumlarında izole edilen ve tüm genom dizilemesi yolu ile tanımlanan endofit *Staphylococcus hominis* MBL_AB63'ten izole edilen yeni bir antimikrobiyal peptid (homicorsin) karakterize edilmiştir (Aftab Uddin vd., 2021). Yine yakın zamanda gerçekleştirilen başka bir çalışmada, soya ve maş fasulyesinden izole edilen *S.hominis* 7E ve *S.hominis* 9E olarak adlandırılan suşlar bazı bitki gelişimini destekleyici özellikler açısından test edilmiş ve 16s rRNA dizileme yolu ile tanılamaları yapılmıştır (Bakhtiyarifar vd., 2021). Her iki suş auxin testlerinde pozitif sonuç verirken azot fiksasyon testlerinde negatif sonuç vermiş, *S.hominis* 9E susu %30 oranında fungal inhibisyon etkisi göstermiştir. Sharma vd. (2015)'in safran bitkisindeki endofit çeşitliliği ile ilgili yaptığı çalışmada izole edilen *S.hominis* izolatu lipaz, amilaz, proteaz, pektinaz, siderofor ve indol asetik asit testlerine pozitif sonuç vermiştir. *S.hominis* bakterisinin endofit olarak genomik ve biyokimyasal tanılamasını içeren benzeri çalışmaların sayısı artırılabilir (Chaudhry vd., 2017; Marag ve Suman, 2018; Vijav ve Kavitha, 2022).

Bu çalışmada, bakteri izolatu proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz ve selüloz enzimlerini üretebilme yetenekleri açısından nitel olarak incelenmiş. Pozitif kontrole göre kıyaslama yapılmıştır. Test edilen enzimlerin hiçbirini üretemediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5, Çizelge 4.3). Bu sonuçlar Sharma vd. (2015) ile Vijav ve Kavitha (2022)'nin ekstraselüler enzim test sonuçları ile uyuşmamaktadır. Bu çalışmalarda izole edilen ve tanımlanan *S.hominis* suşları bahsi geçen enzimlerin pek çoğuna pozitif sonuç vermiştir. Verma vd. (2001) farklı oranlarda sentezlenen ve dışarıya salınana selüloz ve pektinaz gibi hidrolitik enzimlerin endofitik bakterilerin bitkideki kolonizasyonunda önemli bir yere sahip olabileceğini bildirilmiştir (Verma vd., 2001). Ancak G15S1 izolatomuzun bu ve diğer hidrolitik enzimleri sentezlememesi izolatomuzun bitki dokusu iç kısımlarına başka mekanizmalar kullanarak girdiği ve kolonize olduğunu düşündürmektedir (açıklık, yara dokusu vs.). Ayrıca bu çalışma kapsamında, G15S1 bakteri izolatu biyokimyasal karakterizasyonunda kullanılan ticari kitler sadece sadece glikoz, üreaz, sitrat, jelatin, sukroz ve arabinoz testlerine pozitif sonuç göstermiş, geri kalan 18 teste negatif sonuç vermiştir. Bu sonuçlar literatür ile karşılaştırdığımızda genel olarak paralellik gösterse de farklılık ortaya koyduğu testler de olmuştur. Örneğin Hwang vd. (2020)'nin yaptığı çalışmada, izole edip tanılamasını gerçekleştirdikleri *S.hominis* WiKim0113 suşu maltozu kullanabilir iken G15S1 izolatu

maltoz testine negative reaksiyon vermiştir. Mohanasrinivasan vd. (2015)'nin yaptığı diğer bir çalışmada, test ettikleri *S. hominis* MSD1 izolatu Voges-Proskauer (VP) ve mannitol testlerinde pozitif sonuçlar üretirken G15S1 izolatu aynı testlerde her iki ticari kit için de negatif sonuç vermiştir. Literatür ile paralellik göstermeyen gerek ekstraselüler enzim sonuçları gerekse bazı biyokimyasal test sonuçları aynı bakteri türüne ait farklı suşların farklı genotipik, dolayısı ile ortaya koydukları fenotipik özelliklerinin de farklı olabileceği gerçeğini yansıtmaktadır (Madigan, 2005). Endofit bakteri çeşitliliğinin büyüklüğü göz önünde bulundurulduğunda farklı fenotipik özellikler ile karşılaşılması son derece normal karşılanmalıdır. Endofit bakteri çeşitliliği farklı bölgelerden, farklı bitkilerden hatta aynı bitkinin farklı bölgelerdeki topraklardan alınan örneklerde büyük varyasyonlar içerebilmektedir (Cho vd., 2007). Pek çok veri endofit bakteri çeşitliliğinin bölgelere, bitkilere hatta izolasyon yapılan farklı bitki dokularına göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Akinsanya vd., 2015).

İzolatu için üretilen FASTQ formatındaki sekans verilerinin adaptör dizileri tıraşlanarak yeniden birleştirilmesi 160X kapsama alanıyla (coverage value) BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center) (<https://www.bv-brc.org/>) sunucusunda gerçekleştirilmiştir (annotation). G15S1 bakteri izolatının TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) veri tabanındaki tüm genom analizi ve tüm genom dizisinden ekstrakte edilen tam 16SrRNA gen dizisine dayalı analiz, bakteri izolatımızı *Staphylococcus hominis* NCTC 11320 ve *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* CCUG 42399 ile kümelemiştir (Şekil 4.8 ve 4.9). Daha iyi taksonomik çözünürlük elde etmek için bakteri izolatu %92.9 (>%70) dDDH değeri ile doğrulanmıştır (Richter ve Rosselló-Móra, 2009; Auch vd., 2010). RAST sunucusunda (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) gerçekleştirilen genom verilerinin açıklaması (annotation) genom boyutunu 2,2 Mbp (2216911 bp), N₅₀ değerini 1161846 bp, L₅₀ değerini 1 ve G+C içeriğini %31.4 olarak belirlemiştir. İzolatu tamamlanan genomunun 2199 protein ve 68 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Bu veriler genel olarak Jiang vd. (2012)'in patojen olarak izole edip tüm genom dizilemesini ortaya koyduğu *S.hominis* suşunu içeren çalışmanın verileri ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada suşun tüm genom büyüklüğü yaklaşık olarak 2.3 Mbp ve G+C içeriğinin %31.4 olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada protein kodlayan 2304 open reading frame (ORF) tespit edilmiştir ki bu sayı bizim çalışmamızda 2199 protein kodlayıcı sekans

(CDS) olarak karşımıza çıkmaktadır. Başka bir çalışmada sıtma hastalığı taşıyıcısı sivri sineklerden *S.hominis* ShAs1, ShAs2 ve ShAs3 suşlarını tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilmiştir (Hughes vd., 2016). ShAs1 suşu için bu çalışma, toplam uzunluğu 2,1 Mbp, N₅₀ değeri 332.788 bp, okuma kapsamı (covarage value) 150X ve ortalama G+C içeriği %34 olan taslak genomla sonuçlanmıştır. ShAs2 suşu için bu çalışma, toplam uzunluğu 2,1 Mbp, N₅₀ değeri 393.276 bp, okuma kapsamı (covarage value) 139X ve ortalama G+C içeriği %31 olan taslak genomla sonuçlanmıştır. ShAs3 suşu için ise, toplam uzunluğu 2,0 Mbp, N₅₀ değeri 288.000 bp, okuma kapsamı (covarage value) 122X ve ortalama G+C içeriği %33 olan taslak genomla sonuçlanmıştır. RAST kullanılarak yapılan açıklaması (annotation) ShAs1 için 2.021 protein kodlayan gen (CDS'ler) ve 66 RNA geni; ShAs2 için 2.044 CDS ve 46 RNA geni ve ShAs3 için 1.889 CDS ve 59 RNA geni ortaya koymuştur. Bu çalışmadaki tüm veriler G15S1 veri analizindeki rakamlar ile benzerlik göstermektedir. Coates-Brown and Horsburgh (2017), insan derisinden izole ettikleri *S.hominis* suşunu çalışmamızda kullandığımız dizileme platformundan farklı olarak PacBio kullanarak tüm genom verilerini elde etmişlerdir. Bu çalışmada toplam 5 kontig (contig) 2.188.325 bp N₅₀ değeri ve 207X okuma kapsamı (covarage value) değeri ile bir araya getirilerek toplamda 2.3 Mbp uzunluğunda bir genom elde edilmiştir. PROKKA, versiyon 1.5.2 (13) yazılımı kullanılarak yapılan açıklama (annotation) 2233 protein kodlayan gen (CDC), toplamda 93 RNA geni göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan Illumina HiSeq platformuna alternatif olarak kullanılan bir diğer platform olan PacBio'nun ürettiği sonuçlar da çalışmamızda elde ettiğimiz genel veriler ile benzerlik göstermektedir.

Taslak (draft) genom verilerimizi biraz daha derinden incelediğimizde G15S1 izolatının virülans, hastalık, antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil, savunma özelliklerinden sorumlu 44 genin bulunduğunu görmekteyiz (Şekil 4.7). Bu 44 genden 6 tanesinin *Staphyococcus* cinsinde daha önce tanımlanmış hücre yapışmasından sorumlu (cell adhesion) adhesin proteinlerini, 4 tanesinin, basitrasin antibakteriyel peptidlerine karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak kullanılan ABC transport proteinlerini, 25 tanesinin ise çeşitli antibiyotiklere ve toksik bileşiklere karşı direnç proteinlerini kodladığı ortaya konmuştur. Bu 25 gen içerisinde 2 adet çoklu ilaç direnç geni, 1 adet beta laktamaz geni, 2 adet florokinolon direnç geni, 2 adet safra hidrolizinden sorumlu gen ve ayrıca kobalt, civa, bakır ve çinko metal direnç genleri

mevcuttur. Ayrıca taslak genom dizisi başta ozmotik stres olmak üzere 29 adet strese karşı savunma (stres response) geni içermektedir. Bu veriler endofit olarak izole ettiğimiz bu suşun aynı zamanda insan/hayvan patojeni olabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Peki fırsatçı insan/hayvan patojenik bakteriler için rizosfer ve bitkiler birer rezervuar mıdır? Bu soruya özellikle son 20-30 yıl içerisinde verilen cevap “evet” olmuştur. Berg vd., (2005) fırsatçı patojenlerin doğal rezervuarlarından birinin, bitki tarafından etkilenen köklerin etrafındaki bölge olan rizosfer olduğunu belirtmektedir. Yüksek besin içeriği nedeniyle, bu habitat, güçlü antagonistik özelliklere sahip olanlar da dahil olmak üzere bakteri bolluğunun arttığı bir "mikrobiyal sıcak nokta"dır. *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* ve *Stenotrophomonas* dahil olmak üzere çeşitli bakteri cinsleri hem bitki hem de insan konakçılarla iki değerlikli etkileşimlerle karşılaşabilen kökle ilişkili suşlar içerir (Berg vd., 2005). Rizosferde kolonizasyondan sorumlu mekanizmalar ve bitki patojenlerine karşı antagonistik aktivite, insan organlarının ve dokularının kolonizasyonundan ve patojeniteden sorumlu olanlara benzer (Rahme vd., 1995; Cao vd., 2001; Berg vd., 2005). Ayrıca, flagella veya lipopolisakarit gibi bakteriyel bileşenler tarafından bitkinin doğuştan gelen bağışıklığının uyarılması, birçok yönden memelilerin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin patojenlere karşı tepkisine benzer. Kökenlerinden bağımsız olarak, klinik ve rizosferle ilişkili *Stenotrophomonas* suşları indol-3-asetik asit üretebilir, ancak çevresel suşlar daha yüksek miktarda fitohormon üretme eğilimindedir (Suckstorff ve Berg, 2003). *Salmonella* spp. gibi bazı insan patojenleri endofit olarak da izole edilmişlerdir (Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006). Ayrıca *Pseudomonas* spp.'nin çevresel izolatları ile klinik suşlarını ayırt etmek güç olmuştur. (Foght vd., 1996). Bazı çalışmalarda, endofitlerin insan patojenleriyle yakından ilişkili olduğu veya insan/fırsatçı insan patojenleri olduğu bulunmuştur. Çiğ meyve ve sebze tüketicileri için salgınlara neden olan ve sağlık riski oluşturan endofitik *Salmonella* suşları (Guo vd. 2002) bu duruma örnektir. Parke ve Gurian-Sherman (2001)'in dediği gibi, “Bitki hastalıklarının en etkili biyokontrol ajanlarının (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans* ve *Burkholderia cepacia*) çoğunun aynı zamanda fırsatçı insan patojenleri olması belki de tesadüf değildir.

Çalışmanın bir diğer önemli kısmında, G15S1 izolatının 5 adet ağır metale karşı toleransı incelenmiştir. Bunlar içerisinde en düşük dozda toksisite gösteren metal cıva (Hg) olmuştur. Literatürde Hg'nin minimum inhibisyon konsantrasyonu ile ilgili farklı değerler bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada *Pseudomonas spp.* ve *Burkholderia spp.* için büyüme inhibisyonu derecesine ve MİK değerlerinin dağılımına göre, yüksek ($MIC \geq 30$ mg/L $HgCl_2$), orta ($10 < MIC < 30$) ve hassas, $MIC \leq 10$ mg olmak üzere üç cıva direnci aralığı oluşturulmuştur (Cardona vd., 2022). Bir diğer çalışmada ağırlıklı olarak *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait izolatlar 700 ppm Hg varlığını tolere edebilmişlerdir (Pushkar vd., 2019). Irawati vd. (2012)'un yürüttüğü çalışmada *Brevundimonas sp. HgP1* ve *Brevundimonas sp. HgP2*, 575 ppm değeri ile bir altın madeninden izole edilen, cıvaya oldukça dirençli iki bakteri izolatı olarak literatürde yer almaktadır. Yaptığımız çalışmada izolatımız en son 0,03M $HgCl_2$ (8.38 mg $HgCl_2/L$, 6 ppm Hg) içeren katı NA besi ortamında gelişim gösterebilmiştir. Bu değer literatürdeki MİK değerlerine göre düşük bir değerdir. Her ne kadar taslak genom verisinde Hg direnç geni tespit edilmiş olsa da G15S1 izolatının cıvaya karşı fenotipik olarak dirençli olduğunu söylemek oldukça zordur. Ancak daha hassas sonuçlar, izolatın belirli konsantrasyonlarda Hg içeren sıvı besi ortamında geliştirilmesi, OD_{600} ve CFU değerlerinin ortaya koyulması yolu ile elde edilebilir.

İzolatın bitki bakteriyel hastalıklarda sıklıkla kullanılan $CuSO_4$ bileşiğine karşı katı besi ortamında gösterdiği en yüksek tolerans değeri 1.4 mM olmuştur. Bu değer üzerinde $CuSO_4$ içeren katı besi ortamı üzerinde koloni gelişimi gerçekleşmemiştir. Malik ve Jaiswal (2000), bakterilerde bakır direnç seviyelerini sınıflandırmak için hala genel bir kural olmadığını belirtmiştir. Bununla birlikte, $CuSO_4$ kullanıldığında, *Pseudomonas* suşları için MİK değerleri sırasıyla <0.8 mM, 1.0–1.6 mM, 1.8–2.4 mM ve 2.6–3.2 mM olduğunda duyarlı, düşük dirençli, dirençli ve yüksek dirençli olarak sınıflandırılmıştır (Renick vd., 2008; Aiello vd., 2015; Hussein ve Akköprü, 2020). Bu değerlere göre G15S1 izolatı bakıra karşı düşük dirençli kategorisine girmektedir. Stafilocokların çinko klorür veya bakır sülfata duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılması için şu anda onaylanmış yorumlayıcı kriterler bulunmamakla birlikte, literatürde direnç için aşağıdaki geçici eşik değerler kullanılmıştır: $ZnCl_2$ ($MIC > 2$ mM) ve $CuSO_4$ ($MIC > 12$ mM) (Aarestrup ve Hasman, 2004; Cavaco vd., 2011). Bu veriler

ışığında G15S1 izolatu 0.1 mM üst konsantrasyon değeri ile çinkoya (Zn) karşı da hassas olarak değerlendirilebilir.

Yüksek lityum konsantrasyonlarına toleranslı mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu hakkında sınırlı bilgi olmasına rağmen, bunlara olan ilgi giderek artmaktadır. Örneğin Kamekura ve Onishi (1982), 1,5 M LiCl'de büyüeyebilen spontan lityum dirençli *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* ATCC 21971'in mutantlarını göstermiştir. Bir başka çalışmada *Pseudomonas rodhesiae*, *Planomicrobium koreense* ve *Pseudomonas* sp.'ye karşılık gelen üç lityum dirençli suş izole edilmiştir (MIC > 700 mM) (Bruna vd., 2022). *Staphylococcus sciuri* LCHXa suşu, spesifik büyüme oranında %85'lik bir düşüşle 2 M LiCl içeren LB ortamında büyümeyi sürdürebilmiştir (Salazar-Ardiles vd., 2020). G15S1 izolatımız 7.0 mM ve üzeri LiCl içeren katı besi ortamlarında gelişme gösterememiştir. Bu üst değer literatürde ortaya konan değerlerin çok altındadır. Dolayısı ile *S.hominis* olarak teşhis edilen G15S1 izolatu lityum metaline karşı oldukça hassas olarak değerlendirilebilir.

Mangan bitki, hayvan ve mikroorganizmalar için gerekli bir mikro besindir. Bununla birlikte, fazla Mn, ekosistemleri zararlı bir şekilde etkileyebilir ve ayrıca üreme ve bağışıklık sistemlerindeki anormallikler dahil olmak üzere insanlarda Mn toksisitesine neden olabilir (Barboza vd., 2017). Ayrıca mikrobiyal mineralizasyon kaynağı olarak mangan yüksek dozlarda mikroorganizmalar üzerinde toksik rol oynamaktadır. Bu nedenle, G15S1 izolatının mangan toleransını da araştırdık. İzolatımız 1 mM ve üstü MnCl₂ (55 mg/L, Mn miktarı) içeren katı besi ortamlarında gelişmemiştir. *Pseudomonas taiwanensis* ile yapılan bir çalışmada mangan konsantrasyonu 0–120 mg/L aralığında olduğunda, mikroorganizmaların büyümesinin güçlü bir şekilde etkilenmediği ve mangan konsantrasyonu 240 mg/L ulaştığında suşların neredeyse büyümediğini gösterilmiştir (Liu vd., 2022). Başka bir çalışmada seçilen *Serratia marcescens* izolatlarının katı besiyerinde 1200 mg/L'e kadar artan Mn (II) konsantrasyonlarına karşı maksimum direnci belirlenmiştir (Barboza vd., 2017). Tıpkı diğer metallerde olduğu gibi her ne kadar, Mn dirençliliğini ortaya koyan bir derecelendirme olmasa da literatür verileri ile karşılaştırıldığında G15S1 izolatının mangana karşıda toleransı düşük olarak değerlendirilmiştir.

Tüm genom dizisi incelendiğinde kobalt, civa, çinko ve bakır direnç genleri göze çarpmaktadır. Ancak bu genlerin fenotipik yansıması ağır metal tolerasyon

testlerinde gözlemlenmemiştir. Bu veriler bu genlerin kriptik genler (cryptic genes) olabileceği hipotezini akla getirmektedir. Kriptik genler, genellikle bir mikroorganizmanın yaşam döngüsü sırasında ifade edilmeyen, ancak mutasyon, rekombinasyon, yerleştirme süreçleri veya diğer genetik mekanizmalar yoluyla büyük bir popülasyonun birkaç üyesinde ifade edilebilen fenotipik olarak sessiz DNA dizileri olarak tanımlanmıştır (Tamburini ve Mastromei, 2000).

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1) Laboratuvarımızda gerçekleştirilen başka çalışmalarda PGPR (Bitki Gelişimini Teşvik Edici) markörler açısından da kayda değer veriler ortaya koyan G15S1 kod numaralı endofit bakteri izolatının tüm genom dizilemesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve taslak tüm genom verisi ortaya çıkarılmıştır. Sonuçlar genom boyutunu 2.2 Mbp (2216911 bp), N₅₀ değerini 1161846 bp, L₅₀ değerini 1 ve G+C içeriğini %31.4 olarak belirlemiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 2199 protein ve 68 adet RNA kodladığı ortaya konmuş ve izolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH değeri) %92.9 olup, bu da G15S1 izolatının *Staphylococcus hominis* türü içinde yer alan alt tür olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

2) Taslak (draft) genom verileri G15S1 izolatının virülans, hastalık, antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil, savunma özelliklerinden sorumlu 44 gen ve başta ozmotik stres olmak üzere 29 adet strese karşı savunma (stres response) gen bilgisini ortaya koymuştur.

3) Bu veriler endofit olarak izole ettiğimiz bu suşun aynı zamanda insan/hayvan patojeni olabileceği, fırsatçı insan/hayvan patojenik bakteriler için rizosfer ve bitkilerin birer rezervuar olabileceği hipotezini güçlendirmektedir.

4) Tüm genom dizisinde bulunan civa, çinko ve bakır direnç genlerinin fenotipik etkisi (yansıması) katı besi ortamı kullanılarak yapılan ağır metal tolerasyon testlerinde gözlemlenmemiş, izolat bu metallere karşı literatür verileri göz önüne alındığında düşük tolerasyon göstermiştir. Bu da bu genlerin kriptik genler (cryptic genes) olabileceği olasılığını düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

- Aarestrup, F. M., Hasman, H. (2004). The susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulfate, zinc chloride and antimicrobial agents used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, 100 (1-2), 83–89. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.013
- Abdalla, N. M., Haimour, W. O., Osman, A. A., Sarhan, M. A., Musaa, H. A. (2013). Antibiotics sensitivity profile towards *Staphylococcus hominis* in Assir region of Saudi Arabia. *Journal of the International Scientific Research*, 5, 171–183. doi: 10.1002/hsr2.1104
- Aftab, Uddin, M., Akter, S., Ferdous, M., Haidar, B., Amin, A., Shofiul, Islam, Molla, A.H.M, Khan, H., Islam, M. R. (2021). A plant endophyte *Staphylococcus hominis* strain MBL_AB63 produces a novel lantibiotic, homiocorcin and a position one variant. *Scientific Reposts*. 27;11(1):11211. doi:10.1038/s41598-021-90613-9
- Aiello, D., Ferrante, P., Vitale, A., Polizzi, G., Scortichini, M., & Cirvilleri, G. (2015). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicily and occurrence of copper-resistant strains. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 273-282.
- Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P., Ting, A.S. (2015). Metagenomic study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genomix Data*, 6 , 159–163. doi:10.1016/j.gdata.2015.09.004
- Akköprü, A. (2012). Hıyar Bakteriyel Köşeli Yaprak Leke Hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) Bazı Kök Bakterileriyle Biyolojik Savaşımı Üzerinde Araştırmalar. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, Türkiye.
- 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 and Biotechnology*, 90(3): 573-581. doi: 10.1002/jctb.4589
- Anonim. (2023) G15S1 izolatının RAST sunucusu tarafından oluşturulan genom açılımı (annotation). Erişim Adresi: <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>
- 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. 989 doi:10.2134/agronj1989.00021962008100010015x
- Aravind, R., Eapen, S. J., Kumar, A., Dinu, A., & Ramana, K. V. (2010). Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Crop Protection*, 29(4), 318-324.
- Atbaş, Ş. (2022). Çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş olan endofit bakterilerde siderofor üretim potansiyelleri. *Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van, Türkiye.
- Auch, A. F., Von Jan, M., Klenk, H. P., Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2:117. doi: 10.4056/sigs.531120
- Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., De Jongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. (2008). The

- RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *Bio Med Central (BMC) Genomics* 9:75. doi: 10.1128/genomeA.00105-16
- Bakhtiyarifar, M., Enayatizamir, N., Mehdi, Khanlou, K. (2021) Biochemical and molecular investigation of non-rhizobial endophytic bacteria as potential biofertilisers. *Archives of Microbiology*. 203(2):513-521. doi: 10.1007/s00203-020-02038-z
- Barboza, N. R., Morais, M. M., Queiroz, P. S., Amorim, S. S., Guerra-Sá, R., & Leão, V. A. (2017). High manganese tolerance and biooxidation ability of *Serratia marcescens* isolated from manganese mine water in Minas Gerais, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1946. doi: 10.3389/fmicb.2017.01946
- 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.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiology*, 7(11):1673-85. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. ve Smalla, K. (2005). Effect of plant species and site on rhizosphere-associated fungi hostile to *Verticillium dahliae* kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8), 4203–4213. doi: 10.1128/AEM.71.8.4203-4213.2005
- 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. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in biotechnology*, 3(11), 286-290.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35. doi: 10.1093/nar/gkab335
- Brettin T., Davis J. J., Disz T., Edwards R. A., Gerdes S., Olsen G. J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G. D., Shukla M., Thomason J. A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A. R., Xia F. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5:8365. doi: 10.1038/srep08365
- Bruna, N., Galliani, E., Oyarzún, P., Bravo, D., Fuentes, F., & Pérez-Donoso, J. M. (2022). Biomineralization of lithium nanoparticles by Li-resistant *Pseudomonas rodhesiae* isolated from the Atacama salt flat. *Biological Research*, 55(1), 12. doi:10.1186/s40659-022-00382-6
- Borah, A., Das, R., Mazumdar, R., Thakur, D. (2019). Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 825-844. 9.doi:10.1111/jam.14356
- Borchet, T. V., Lassen, S. E., Svendsen, A., Frabtzen, V. (1995). Oxidation of stable amylase for detergent. *Biotechnology Journal*, 10: 175-179. doi: 10.1002/bmb.20612
- Cao, H., Baldini, R. L., Rahme, L. G. (2001). Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annual Review of Phytopathology*. 39:259-84. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.259.PMID: 11701866.
- Cardona, G. I., Escobar, M. C., Acosta-González, A., Marín, P., Marqués, S. (2022). Highly mercury-resistant strains from different Colombian Amazon ecosystems affected by artisanal gold mining activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106(7):2775-2793. doi: 10.1007/s00253-022-11860-y

- 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.
- Chaudhry, V., Sharma, S., Bansal, K., Patil, P. B. (2017). Glimpse into the Genomes of Rice Endophytic Bacteria: Diversity and Distribution of Firmicutes. *Frontiers in Microbiology*. 5;7:2115. doi: 10.3389/fmicb.2016.02115.
- Chaudhri, A., Suneetha, V., (2012). Microbially derived pectinases: A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 2: 1-5. doi: 10.9790/3008-0220105
- Cho, K. M., Hong, S. Y., Lee, S. M., Kim, Y. H., Kahng, G. G., Lim, Y. P., Yun, H. D. (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 54, 341-351. doi: 10.9790/3008-0220105
- Coates-Brown, R., Horsburgh, M. J. (2017). Whole-Genome Sequence of *Staphylococcus hominis* Strain J31 Isolated from Healthy Human Skin. *Genome Announcements*. 13;5(15):e01548-16. doi: 10.1128/genomeA.01548-16
- Cock, P.J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6):1767–1771. doi: 10.1093/nar/gkp1137
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Aarestrup, F. M. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology*, 150 (3-4), 344–348. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.014
- Dogan, G., Taskin, B. (2021). Hydrolytic enzymes producing bacterial endophytes of some poaceae plants. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3): 297. doi: 10.33073/pjm-2021-026
- Drauz, K., Gröger, H., May, O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4): 850-861. doi: 10.1590/S1517-83822010000400004
- Foght J. M., Westlake D. W., Johnson W. M., Ridgway H. F. (1996). Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology (Reading)*. 142 (Pt 9):2333-40. doi: 10.1099/00221287-142-9-2333.
- Goodstine, 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.
- Guo X., Van Iersel M. W., Chen J., Brackett R. E., Beuchat L. R. (2002). Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7):3639-43. doi: 10.1128/AEM.68.7.3639-3643.2002.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003a). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Processing Biochemistry*, 38: 1599- 1616. doi: 0.1016/S0032-9592(03)00053-0
- Haas, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil borne pathogens by *Pseudomonads* fluorescent. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129
- Hallmann, J., Qualt-Hallmann, A., Mahaffee., W. F., Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*, 43: 895-914. doi:10.1139/m97-131
- Hankin, L., Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologie*, 67: 597-607. Doi: 10.2307/3758395

- 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.
- Hofmann, M., Retamal-Morales, G., Tischler, D. (2020). Metal binding ability of microbial natural metal chelators and potential applications. *Natural Product Reports*, 37(9), 1262-1283. doi: 10.1039/C9NP00058E
- 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. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.008
- 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.
- Hughes G. L., Raygoza Garay J. A., Koundal V., Rasgon J. L., Mwangi M. M. (2016). Genome Sequences of Staphylococcus hominis Strains ShAs1, ShAs2, and ShAs3, Isolated from the Asian Malaria Mosquito Anopheles stephensi. *Genome Announcements* 10;4(2):e00085-16. doi: 10.1128/genomeA.00085-16. PMID: 26966197; PMCID: PMC4786653.
- 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. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.010
- Husseini, A., Akköprü, A. (2020) Possible mechanisms of copper resistance in pathogens of the pathogen Pseudomonas syringae in stone fruit trees. *Phytoparasitica*, 48 , 705–718. doi:10.1007/s12600-020-00828-1
- Hwang H., Lee H. J., Lee M. A., Sohn H., Chang Y. H., Han S. G, Jeong J. Y., Lee S. H., Hong S. W. (2020). Selection and Characterization of Staphylococcus hominis subsp. hominis WiKim0113 Isolated from Kimchi as a Starter Culture for the Production of Natural Pre-converted Nitrite. *Food Science of Animal Resources*. 40(4):512-526. doi: 10.5851/kosfa.2020.e29.
- Irawati, W., Soraya, Y., & Baskoro, A. H. (2012). A study on mercury-resistant bacteria isolated from a gold mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(4), 197-200. doi: 10.4308/hjb.19.4.197
- Jiang, S., Zheng, B., Ding, W., Lv, L., Ji, J., Zhang, H., Li, L. (2012). Whole-genome sequence of Staphylococcus hominis, an opportunistic pathogen. *Journal of bacteriology*, 194(17), 4761–4762 .doi: 10.1128/JB.00991-12
- Kamekura, M., Onishi, H. (1982). Cell-associated cations of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. halophilus grown in media of high concentrations of LiCl, NaCl, KCl, RbCl, or CsCl. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(2), 155-161. doi: 10.1128/jb.119.2.339-344.1974
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M., Viikari, L. (1993). Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Journal*. doi:10.1515/hfsg.1993.47.4.318
- 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. doi:10.1146/annurev.phyto.38.1.423
- Kulski, J. K. (2015). Next-Generation Sequencing An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications: *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and*

- Challenges*, Ed: Kulski, J. K., International Technology (InTech). pp: 3-60. doi: 10.5772/61964
- 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. doi: 10.1007/s13197-014-1268-z.
- Kumar, S., Aharwal, R. P., Shukla, H., Rajak, R. C., Sandhu, S. S. (2014). Endophyticfungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 1179-1197.
- 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. Doi:10.1271/bbb.63.65
- Konstantinidis, K. T. and Tiedje, J. M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of bacteriology*, 187(18), 6258-6264. doi: 10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005
- Lefort, V., Desper, R. ve Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-based Phylogeny Inference Program. *Molecular biology and evolution*, 32 (10), 2798–2800. doi: 10.1093/molbev/msv150
- Liu, M., Wang, S., Yang, M., Ning, X., Nan, Z. (2022). Experimental study on treatment of heavy metal–contaminated soil by manganese-oxidizing bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(4), 5526-5540. doi: 10.1007/s11356-021-15475-0
- Madigan, M. T. (2005). *Brock biology of microorganisms*, 11th edn.
- Malik, A., & Jaiswal, R. (2000). Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 177-182. doi:10.1023/A:1008905902282
- Marag P. S., Suman A. (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiological Research*, 214, 101–113. doi: 10.1016/j.micres.2018.05.016.
- 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. doi:10.1007/s002530000587
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., Göker, M. (2013a). Genome sequencebased species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *Bio Med Central (BMC) Bioinformatics*, 14: 60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60
- 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. doi: 10.1007/s00203-013-0888-4
- Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1), 2182. doi:10.1038/s41467-019-10210-3
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Llaca-Diaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G.M., Villarreal-Treviño, L., Garza-González, E. (2013). Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *Public Library of Science (PLoS ONE)*, 8, e61161. doi: 10.1371/journal.pone.0061161
- Menendez, E., Garcia-Fralie, P., Rivas, R. (2015). Biotechnological applications of bacterial cellulases. *Bioengineering*, 2: 163-182. doi:10.3934/bioeng.2015.3.163

- 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. doi: 10.5772/53168
- Mohanasrinivasan, V., Subathra, D. C., Dhanmoni, K., Vaishnavi, B., Jemimah, N. S., Kaustuvmani, P. (2015). Production and purification of staphylokinase from *Staphylococcus hominis* MSD1 isolated from Kadi: A traditional Indian fermented food. *International Journal of PharmTech Research* , 8(6):265-272.
- Mungan, M. D., Alanjary, M., Blin, K., Weber, T., Medema, M. H., Ziemert, N. (2020). ARTS 2.0: feature updates and expansion of the Antibiotic Resistant Target Seeker for comparative genome mining. *Nucleic acids research*, 48(W1), W546-W552. doi: 10.1093/nar/gkaa374
- 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. doi:10.1007/978-3-0348-8472-3_5
- 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. doi:10.1007/s11743-012-1434-0
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., Stevens, R. (2014). The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Research* ,42, D206–D214.doi:10.1093/nar/gkt1226.
- Önalın, Ş., Çevik, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 934-942. doi: 10.1590/1519-6984.234969
- Özmerdivenli, R. (2017). Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması) . *Düzce Tıp Dergisi* , 19(1), 27-30
- Parke J. L., Gurian-Sherman D. (2001). Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*. 39:225-58. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.225
- Pillay, V. J., J. Nowak. (1997). Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Seedlings inoculated with a Pseudomonad bacterium. *Canadian Journal Microbiology*, 43: 354-361. Doi:10.1139/m97-049
- Ping, L., Boland, W. (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 9: 263-266. doi: 10.1016/j.tplants.2004.04.008
- Priest, F. G. (1984). *Extracellular Enzymes*. Van Nostrand Reinold Co. Ltd., ISBN 13: 9780442305888, Wokingham. 79.
- Pushkar, B., Sevak, P., Singh, A. (2019). Bioremediation treatment process through mercury-resistant bacteria isolated from Mithi river. *Applied Water Science*, 9, 1-10. doi:10.1007/s13201-019-0998-5
- Rahme L. G., Stevens E. J., Wolfort S. F., Shao J., Tompkins R. G., Ausubel F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 30;268(5219):1899-902. doi: 10.1126/science.7604262.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology*, 14 (4), 435–443. doi: 10.1016/j.pbi.2011.04.004

- Renick, L. J., Cogal, A. G., Sundin, G. W. (2008). Phenotypic and Genetic Analysis of Epiphytic *Pseudomonas syringae* Populations from Sweet Cherry, Michigan. *Plant Disease*, 92 (3), 372–378. doi:10.1094/PDIS-92-3-0372
- Rosenblueth M., Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(8):827-37. doi: 10.1094/MPMI-19-0827.
- Richter, M., and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)*, 106, 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106
- Rosselló-Mora R., Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Reviews*, 25:39–67 doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x
- 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.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science*, 9 (6), 275–280. doi: 10.1016/j.tplants.2004.04.005
- Salazar-Ardiles, C., Caimanque, T., Galetović, A., Vilo, C., Araya, J. E., Flores, N., Gómez-Silva, B. (2020). *Staphylococcus sciuri* strain LCHXa is a free-living lithium-tolerant bacterium isolated from Salar de Atacama, Chile. *Microorganisms*, 8(5), 668. doi: 10.3390/microorganisms8050668.
- 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. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_3
- 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. doi: 10.1094/MPMI-08-11-0204
- Sharma T., Kaul S., Dhar M. K. (2015). Diversity of culturable bacterial endophytes of saffron in Kashmir, India. *Springerplus*. 2;4:661. doi: 10.1186/s40064-015-1435-3.
- Stackebrandt E., Goebel B. M. (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/00207713-44-4-846
- Stamp, N. (2003). Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 78: 23-55. doi: 10.1086/367580
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003
- 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. doi:10.1016/S0929-1393(00)00094-9
- Suckstorff I., Berg G. (2003). Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *Journal of Applied Microbiology*. 95(4):656-63 doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02021.x
- Sun, X., Guo, L. D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3, 1: 65-76. doi:10.1080/21501203.2012.656724

- Sülü, S. M., Bozkurt, İ. A., Soylu, S. (2016). Bacterial endophytes as plant growth promoting and biological control agents. *Ziraat Fakültesi Dergisi, Mustafa Kemal Üniversitesi*, 21(1), 103-111. doi:10.16955/bitkorb.597214
- Tamburini, E., Mastromei, G. (2000). Do bacterial cryptic genes really exist? *Research in microbiology*, 151(3), 179-182. doi: 10.1016/s0923-2508(00)00137-6
- 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. doi: 10.1007/s11743-999-0073-8
- Thomas, T. D., Mills, O. E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35: 255-273. doi:10.1111/J.1574-6968.1987.TB02464.X
- 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*, 60:249–266. doi: 10.1099/ijs.0.016949-0
- Tiwari, R., Awasthi, A., Mall, M., Shukla, A. K., Srinivas, K. S., Syamasundar, K. V., Kalra, A. (2013). Bacterial endophyte-mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*. *Industrial Crops and Products*, 43, 306-310. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.045
- Tucker, G. A., Woods, L. F. J. (1995). *Enzymes in Food Processing*. Springer, ISBN: 978-1-4615-2147-1, USA. 319.
- Verma, N., Sharma, R. (2017). Bioremediation of toxic heavy metals: a patent review. *Recent patents on biotechnology*, 11(3), 171-187. doi: 10.2174/1872208311666170111111631
- 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(2-3), 127-141. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00333-9
- 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. doi:10.1007/s002489900095
- Vijay, K., Kavitha, T. (2022). Inoculation of Medicinal Plant Resident *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Strain KE6 for Improved Plant Growth and Antagonism to *Pithomyces atro-olivaceus* in Groundnuts. *Asian Journal of Research in Biosciences*, 12-25.
- 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. doi: 10.17485/ijst/2016/v9i14/83143
- Wu, Q., Shou-Wei, D., Zhang, Y., and Zhu, Sh. (2015). Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. *Annual Review Phytopathology*, 53: 425-44. doi: 10.1146/yllik-phyto-080614-120030
- Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., Zhu, B. (2021). Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. *Frontiers in plant science*, 12, 646146. doi: 10.3389/fpls.2021.646146

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Rümeysa GÖK

Eğitim Bilgileri

Lisans : Mezun
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte : Fen Fakültesi
Bölüm : Moleküler Biyoloji Ve Genetik
Mezuniyet Yılı : 2019

Yüksek Lisans : Öğrenci
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü : Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı : Tarımsal Biyoteknoloji
Mezuniyet Yılı :

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih 30/05/2023

Tez Başlığı: ENDOFİT BAKTERİ G15S1 İZOLATININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ, BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI DUYARLILIĞININ İNCELENEMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 30/05/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %14 dır.

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 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van 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.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Rumeysa GÖK

Öğrenci No: 20910001215

Anabilim Dalı: Tarımsal Biyoteknoloji

Programı: Tarımsal Biyoteknoloji

Statüsü: (X) Yüksek lisans () Doktora

DANIŞMAN

ENSTİTÜ ONAYI

UYGUNDUR

UYGUNDUR