

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ 16S rDNA BÖLGELERİNİN
MOLEKÜLER VE BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU**

Hüsamettin AYGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Fikret UYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
Haziran 2012**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca; bana yol gösterdiği, beni teşvik ettiği, maddi ve manevi her konuda desteğini hiçbir zaman benden esirgemediği için değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Fikret UYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimini benimle paylaştığı ve değerli vaktini bana ayırdığı için değerli ek danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan, bilgi ve deneyimini benimle paylaşan Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŐ'e çok teşekkür ederim.

Bilgi ve birikimini benden esirgemeyen, çalışmamın doğru, düzenli ve sorunsuz bir şekilde yürütmesini sağlayan ve çalışmamda çok büyük emeği olan değerli Arş. Gör. Dr. Cem ÖZİÇ'e çok teşekkür ederim.

Gerek laboratuvarında gerekse tez yazımı esnasında desteğini bir an olsun benden esirgemeyen ve çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşım Emrah DEMİRAY'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
RESİM LİSTESİ.....	IX
KISALTMA VE SİMGELER.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. <i>Bacillus</i> Cinsi	3
2.1.1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.1.1.2. <i>Bacillus megaterium</i>	6
2.1.1.3. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	6
2.1.1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.1.1.4. Biyoinformatik.....	7
2.1.1.4. Biyoinformatiğin Tarihçesi.....	9
2.1.1.4. Biyoinformatiğin Önemi.....	9
2.1.1.4. Biyoinformatiğin Amaçları.....	10

- Veri Organizasyonu.....	10
- Sistemlerin Geliştirilmesi.....	10
- Sistemlerin Uygulanması.....	10
2.1.3. Filogeni.....	11
2.1.3.1. Filogenetik Sistematik.....	13
2.1.3.2. Filogenetik Ağaçlar.....	14
2.1.3.3. Filogenetikte Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar.....	15
-Konvergent Evrim.....	16
- Geriye Dönüş.....	16
- Melezlenme ve Yatay Gen Aktarımı.....	17
- Homolojiyi Homoplasiden Ayırmak.....	18
2.1.4. Moleküler Taksonomi.....	19
2.1.4.1. DNA-DNA Hibridizasyonu.....	19
2.1.4.2. Ribotiplendirme.....	20
2.1.4.3. Çok Lokuslu Dizi Tiplendirmesi (MLTS: Multi Locus Typing Sequence)..	20
2.1.4.4. Yağ Asidi Analizleri (FAME: Fatty Acid Methyl Ester).....	20
2.1.4.5. ITS-PCR Parmak İzi Tekniği.....	21
2.1.5. Filogenomik ve Evrimsel Kronometreler.....	21
2.1.5.1. Evrimsel Kronometreler Olarak Ribozomal RNA'lar.....	23
3. MATERYAL ve METOT.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Çalışma Organizması.....	27

3.1.2.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.1.3.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	27
3.1.4.	Çalışmada Kullanılan Kitler.....	28
3.2.	Metot.....	28
3.2.1.	Biyoinformatik Analizler.....	28
3.2.2.	Organizmaların Elde Edilmesi.....	28
3.2.3.	DNA İzolasyonu.....	28
3.2.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	30
3.2.5.	Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi.....	30
3.2.6.	PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması.....	31
3.2.7.	DNA Dizi Analizi.....	31
3.2.8.	DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi.....	31
4.	BULGULAR.....	33
4.1.	Kullanılan Mikroorganizmaların Morfolojik Özellikleri.....	33
4.2.	DNA İzolasyon Sonuçları.....	35
4.3.	PCR Sonuçları.....	35
4.4.	Dizi Analizi Sonuçları.....	36
4.5.	Filogenetik Ağaç.....	41
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
6.	KAYNAKLAR.....	47
	ÖZGEÇMİŞ.....	53

ÖZET

BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ 16S rDNA BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER VE BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüsamettin AYGÜN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

Canlılar sınıflandırılırken morfolojik ve biyokimyasal verilerin moleküler veriler ile desteklenmesi gerekmektedir. İki canlının yatay gen transferi veya konvergent evrim gibi olaylar nedeniyle de benzer özellikleri paylaşabilmesi canlıları sınıflandırmada morfolojik ve biyokimyasal verilerin çok da yeterli ve güvenilir olmadığını gösterir. Bu nedenle morfolojik ve biyokimyasal verilerin moleküler verilerle de desteklenmesi doğru bir sınıflandıma açısından son derece önem taşır. Moleküler yaklaşımlar özellikle bakteriyel taksonomide oldukça faydalı olmaktadır. Doğadaki bakteriyel çeşitliliğin büyük bir kısmını oluşturduğu düşünülen, kültüre alınamayan (veya zor üreyen) bakterilerin varlığı göz önüne alındığında moleküler temelli yaklaşımların önemi daha iyi anlaşılır. Ayrıca fenotipik yaklaşımların kimi zaman yetersiz kaldığı klinik tanı ve teşhis yöntemlerinde 16S rDNA gibi moleküler yaklaşımlara son dönemde sıkça başvurulmaktadır. Bakteriyel moleküler taksonomide en çok kullanılan yöntemlerden biri 16S rDNA sekans analizidir. Son zamanlarda bakteriyel teşhiste bazı protein genleri de kullanılmasına rağmen, 16S rRNA geninin (rDNA) bakteriler arasında evrensel olarak bulunması onu bakteriyel taksonomi için vazgeçilemez bir unsur haline getirmiştir.

Yaptığımız çalışmada daha önce morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre cins ve tür düzeyinde teşhis edilmiş *Bacillus* izolatlarını 16S rDNA bölgelerinin sekans analizi ile değerlendirdik. 16S rDNA bölgelerinin sekans analizi sonuçları gen bankasındaki verilerle %99-100 oranında homoloji gösterdi. Bu sonuçlar, fenotipik verilere göre *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis* ve kalan beş tanesi *B. subtilis*'in üyesi olarak

belirlenmiş olan sekiz izolatın tür düzeyini doğruladı. Ayrıca bu verilerden yola çıkarak bu izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiler de belirlendi.

Anahtar Kelimeler: 16S rDNA, PCR, *Bacillus*, Yatay gen transferi, Konvergent evrim

ABSTRACT

MOLECULAR AND BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF 16S rDNA REGIONS IN SOME *BACILLUS* ISOLATES

MSC THESIS

Hüsamettin AYGÜN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2012

Morphological and biochemical data must be supported by molecular data when organisms are classified. Two organisms may share similar features due to also such as lateral gene transferring and convergent evolution events. Therefore morphological and biochemical data usually are not sufficient and reliable in classifying organisms. Thus, supporting morphological and biochemical data by molecular data for true classification is very crucial. Molecular approaches are become very useful in particularly bacterial taxonomy. Importance of molecular approaches are better understood when existence of bacteria which form the majority of bacterial diversity in nature and that are uncultivated (or fastidious) is considered. Also recently those molecular approaches such as 16S rDNA are often applied where phenotypic approaches are become insufficient in clinical diagnosis and identification. 16S rDNA sequencing analysis is one of the most frequently used methods. Recently, although some protein genes also are used, since 16S rRNA (rDNA) gene is present universal among bacteria, it has been indispensable for bacterial taxonomy.

In our study, we evaluated that *Bacillus* isolate which has been identified in genus and species according to morphological and biochemical method by sequencing analysis of 16S rDNA regions. Sequencing results of 16S rDNA regions showed 99–100% homology with known sequence data in gene bank. These results confirmed species levels of eight isolates which identified as *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis* and the other five *Bacillus Subtilis* according to phenotypic data. Furthermore, phylogenetic relations among these isolates were also determined by using these data.

Key Words: 16S rDNA, PCR, *Bacillus*, Lateral gene transferring, Convergent evolution

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	<i>Bacillus</i> 'un 59 türü arasındaki filogenetik ilişkilerin fenotipik ve moleküler verilere dayalı olarak oluşturulan iki farklı ağaç topolojisinde gösterimi	5
Şekil 4.1.	<i>Bacillus</i> izolatların'dan klasik yöntemle elde edilen genomik DNA'ların agaroz jeldeki görüntüleri	35
Şekil 4.2.	<i>Bacillus</i> izolatlarından PCR ile elde edilen 16S rRNA geninin agaroz jeldeki görüntüsü	36
Şekil 4.3.	<i>Bacillus</i> izolatlarının 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları	40
Şekil 4.4.	<i>Bacillus</i> izolatlarının 16S rRNA genine ait hizalama sonuçları	41
Şekil 4.4.	<i>Bacillus</i> ailesi üyelerine ait ağaç analizi	42

RESİM LİSTESİ

<u>Resim No</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 4.1. <i>Paenibacillus polymyxa</i> 'nın katı besiyerindeki görünümü	33
Resim 4.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in katı besiyerindeki görünümü	33
Resim 4.3. <i>Bacillus megaterium</i> 'un katı besiyerindeki görünümü	33
Resim 4.4. <i>Bacillus subtilis</i> 1'in katı besiyerindeki görünümü	33
Resim 4.5. <i>Bacillus subtilis</i> 2'nin katı besiyerindeki görünümü	34
Resim 4.6. <i>Bacillus subtilis</i> 3'ün katı besiyerindeki görünümü	34
Resim 4.7. <i>Bacillus subtilis</i> 4'ün katı besiyerindeki görünümü	34
Resim 4.8. <i>Bacillus subtilis</i> 5'in katı besiyerindeki görünümü	34

KISALTMALAR ve SİMGELER

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bç: Baz Çifti

°C: Santigrat Derece

DNA: Deoksiribonükleik asit

EBI: (European Bioinformatics Institute) Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü

EDTA : Etilendiamintetrasetik asit

EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı

EtBr : Etidyumbromür

EtOH : Etanol

g : Gram

GC: Guanin/Sitozin

L : Litre

LB: Luria Broth

mm : Milimetre

mM: Milimolar

M : Molarite

Mb: Megabaz

NCBI: (National Center for Biotechnology Information) Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi

ng: Nanogram

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rRNA: Ribozomal Ribonükleikasit

R: Ribozom

RNA: Ribonükleikasit

rpm : (revolution per minute) Dakikadaki devir sayısı

SDS: Sodyum Dudesil Sülfat

TAE: Tris-baz Asetik Asit EDTA

U: Ünite

UV : Ultraviyole

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

μm : Mikrometre

μM : Mikromolar

1. GİRİŞ

Son zamanlarda bakterilerin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalardaki yerinin giderek artması ve klinik uygulamalardaki bakteriyel tanı ve teşhis metotlarının kimi zaman yetersiz kalması, bakterilerin etkin bir şekilde sınıflandırılmasını gerekli kılmıştır. Bununla birlikte, gen sekanslama projelerinden elde edilen genomik verilerin katlanarak büyümesi sıkı bir ekolojik ve evrimsel disiplin gerektirecektir.

Canlıları sınıflandırmada klasik sistematik ile filogenetik sistematik prensipleri arasındaki tartışma bir yana, canlılar arasındaki evrimsel akrabalık ilişkisi göz ardı edilse bile sadece morfolojik ve biyokimyasal verilere göre canlılar bazen yanlış sınıflandırılabilir. Bu kimi araştırmalarda da ortaya çıkmıştır (Delmas ve ark. 2006, Folmsbee ve ark. 2006). Ayrıca doğal süreçlerden biri olan kovergent evrim ve bakteriler arasında sıkça meydana gelen yatay gen transferi gibi olayların varlığı göz önüne alındığında canlıları sadece birtakım fenotipik karakterlere göre sınıflandırmak oldukça düşündürücüdür. Dolayısıyla morfolojik ve biyokimyasal verilerin moleküler verilerle desteklenmesi gerekir ve dahası; dünya üzerindeki biyoçeşitliliğin temelinde yatan evrim sürecinin önemi bugün birçok araştırmacı tarafından kabul görüyorsa bu verilerin aynı zamanda filogenetik sistematik prensiplere göre de değerlendirilmesi etkin bir sınıflandırma için en doğru yaklaşımdır.

PCR temelli yaklaşımlar ve özellikle gen sekanslama teknolojisi moleküler sistematığın temelini oluşturmaktadır. Moleküler temelli yaklaşımlar sistematığe yeni bir perspektif kazandırmıştır. Gen sekanslama teknolojisi ile canlıların DNA gibi ortak ve evrensel bir moleküle dayalı olarak sınıflandırılması araştırmacıları canlılar arasındaki filogenetik ilişkilerin moleküler düzeyde ne olduğu sorusuna da yöneltmiştir. Dolayısıyla canlıların DNA dizi benzerliğine dayalı olarak sınıflandırılması canlılar arasındaki evrimsel akrabalık ilişkilerinin moleküler düzeyde araştırılmasına ortam hazırlamıştır. Diğer taraftan bu gelişmeler ışığında canlılar moleküler filogenetik bir yaklaşımla sınıflandırıldığında filogenetik sistematik ile klasik sistematığın her zaman uyum göstermemesi canlıların etkin bir şekilde sınıflandırılmasını gerekli kılmıştır.

Son araştırmalar gen sekanslama verileri ile tanımlanmış *Bacillus* türlerinin ekolojik olarak tanımlanmış olanlarla her zaman uyum göstermediğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla *Bacillus* türlerinin etkin bir şekilde sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum diğer bazı araştırmalarda da ortaya çıkmıştır. Örneğin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* çomak şekilli hücrelerinden dolayı *Bacillus*'un türleri olarak sınıflandırılmıştır (Daegelen ve ark. 2009, Hugh ve Leifson 1964). Benzer durumlar sadece *Bacillus*'ta değil diğer cinslerde de gözlenir. Dolayısıyla bu konudaki çalışmalar, özelde *Bacillus* taksonomisi, genelde bakteriyel taksonomide biyolojik olarak anlamlı ve geçerli olan bir sınıflandırma için gereken; ekoloji ile moleküler veriler arasındaki sistematik uzlaşma yoluna önemli katkılar sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1 *Bacillus* Cinsi

Bacillus, aerobik olarak gelişen ve dormant endospor oluşturan farklı bir bakteri cinsidir. *Bacillus anthracis* ve *Bacillus subtilis* gibi *Bacillus* türleri, Alman biyologlar Ferdinand Cohn ve Robert Koch tarafından ilk defa sistematik bir şekilde tarif edilmiş bakteri türlerindedir (Cohn 1962, Koch 1962). Cohn ilk defa *Bacillus subtilis*'te sporulasyonu keşfetmiştir (Cohn 1962). Koch ise antrakis hastalığının etken ajanı *B. anthracis*'i kullanarak germ teorisini kanıtlamıştır (Koch 1962). *Bacillus* türleri bugüne kadar karakterize edilmiş ilk bakteri türlerinden olmalarına rağmen, birbirleri ile olan akrabalıkları hala bir bilmece gibidir.

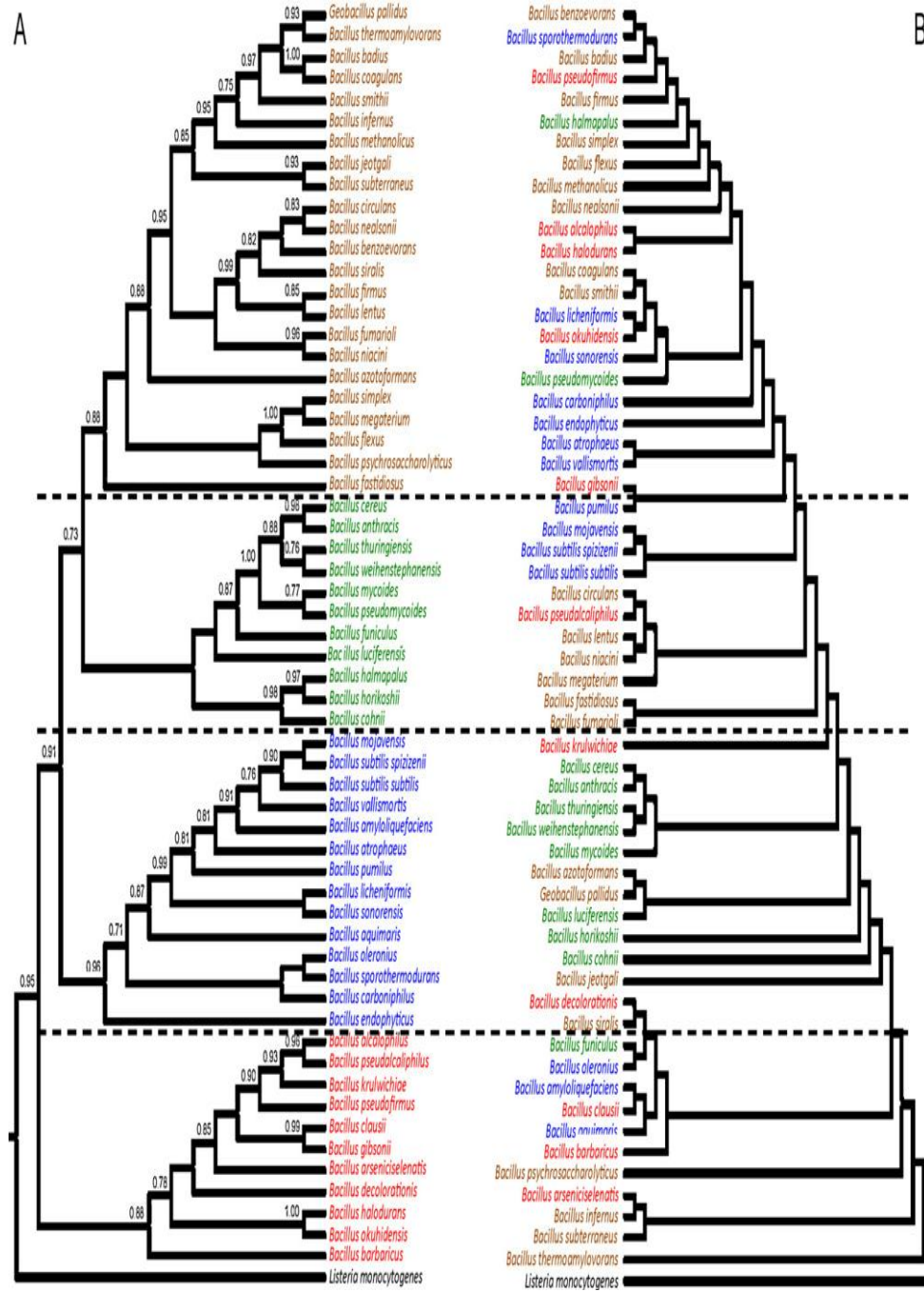
Bacillus cinsi G+C oranı düşük gram pozitif bakterilerden oluşur (Kingdom Bacteria; Phylum Firmicutes; Class Bacilli; Order Bacillales; Family Bacillaceae). En yakın ilişkili olduğu cinsler *Listeria*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus*'tur (Ciccarelli ve ark. 2006, Wu ve ark. 2009). Doğada her yerde bulunabilen *Bacillus* türleri tatlusu, tuzlusu, toprak ve hava gibi ortamların yanı sıra bitki ve hayvanlardan da izole edilebilir (Pignatelli ve ark. 2009). Fenotipik çeşitliliğe sahip *Bacillus* cinsinin üyeleri şaşırtıcıdır. Yüksek sıcaklık, aşırı tuzluluk, asidik şartlar gibi aşırı ortamlara uyum sağlayan türleri vardır (Holt 1986). Bazı türleri arsenik ya da selenyum gibi sıra dışı terminal elektron akseptörlerini kullanır (Blum ve ark.1998).

Bacillus'un bazı türleri patojen (*Bacillus cereus* ve *Bacillus anthracis* gibi) olmasına karşın metabolik sahası; endüstriyel enzimler, riboflavin, streptavidin, beta laktamaz ve çeşitli böcek ve nematod toksini gibi moleküllerin üretimi için endüstriyel olarak kullanılmaktadır (De Maagd ve ark. 2003, Zeigler ve Perkins 2009).

Ayrıca *B. subtilis* ve akrabalarının, kolay üremeleri, güvenli olmaları ve litre başına gramlarla ifade edilen miktarda proteini üredikleri ortama salgılayabilmeleri onların aynı zamanda gen ekspresyon çalışmalarında heterolog protein üretimi için kullanılmalarını

sağlar (Rygus ve Hillen 1991). *Bacillus*'un kullanılabilirliği ve uygulama alanları oldukça geniş olduğu için genomu ile ilgili çalışmaların önemi artmakta ve bu bakterilerin gen fonksiyonu, metabolik yol ve protein yapılarının anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Sinhaikul ve ark. 2002).

Yapılan bazı araştırmalar *Bacillus* izolatlarını sınırları iyi tanımlanmış tür olarak tanımlamanın kolay olmadığını göstermiştir. *Bacillus*'ta, moleküler ve fenotipik sınıflandırma metodları arasındaki tartışmanın uygun bir göstergesi olan soy, *B. cereus* grubudur. Bu grup aynı zamanda mevcut taksonomiye göre *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *B. anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* ve *Bacillus weihenstephanensis* ' ten oluşan ve birbiriyle çok yakın akraba olan altı türü içeren *Bacillus cereussensulato* olarak da isimlendirilir. Geride kalan yüzyıl boyunca bu altı tür, patojenik konakçı aralığı, koloni morfolojisi, metabolik özellikler, hareketlilik, penisiline dirençlilik ve gama fajına duyarlılık gibi ayırt edici kriterler ile *Bacillus* cinsinin bireysel türleri olarak tarif edilmiştir. Bununla birlikte moleküler yöntemler bu grubun üyeleri arasındaki tür sınırlarını belirlemenin zor olduğunu göstermiştir (Maughan ve Auwera 2011).



Şekil 2.1. Yukarıdaki şekilde *Bacillus*'un 59 türü arasındaki filogenetik ilişkilerin temsil edildiği iki ağaç topolojisi gösterilmiştir. Soldaki filogenetik ağaç (A) 16S rDNA sekans analizi ile maksimum olasılık yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Sağdaki ağaç (B) ise on bir farklı fenotipik karakterin evrimsel değişimi azaltacak şekilde soldaki ağaç topolojisine uygulanması ile elde edilmiştir. *Listeria monocytogenes* dış grup olarak seçilmiştir (Maughan ve Auwera 2011)

2.1.1.1. *Bacillus subtilis*

B. subtilis farklı sıcaklık değerlerinde yaşayabilen bir bakteri türüdür. Toprak, su, hava ve kaplıca suları gibi ortamlarda 20-50°C sıcaklıklarında yaşayabilirler. Isıya dayanıklı olmaları onların doğada yaygın bir grup olmalarını sağlar. Ayrıca non-patojenik olması genetik çalışmaların bu bakteri üzerinde yürütülmesi için iyi bir nedendir (Öner 1987).

2.1.1.2. *Bacillus megaterium*

Bacillus cinsinin bu türü toprak, deniz suyu, sediment, bal ve süt gibi çok çeşitli ortamlarda spor oluşturabilen bir bakteridir. Vitamin B₁₂ ve penisilin amidaz gibi biyomolekülleri sentezleyebildiği için ekonomik olarak önemlidir ve daha da önemlisi yabancı proteinleri parçalamadığı için protein ekspresyon çalışmaları için oldukça yararlıdır (Rygus ve Hillen 1991).

2.1.1.3. *Paenibacillus polymyxa*

Paenibacillus polymyxa birkaç ilginç niteliğe sahip, gelişimi teşvik edici bir bakteridir. Tarımsal sistemlerde, özellikle de bitki gelişimini teşvik etme ve bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde türün sahip olduğu bu özellikler birçok araştırma grubu tarafından çalışılmıştır. *P. polymyxa* ırkları biyoteknolojik uygulamalar için faydalı olan oksin, sitokinin ve antibakteriyel bileşikler gibi bazı sekonder metabolitler üretir. (Haggag ve Timmusk 2007, Timmusk ve ark. 1999).

2.1.1.4. *Bacillus thuringiensis*

Toprakta, böcek kavrularında ve bitki yüzeyi gibi ortamlarda bulunabilen ve spor oluşturabilen bu tür ayrıca sahip olduğu plazmit tarafından kodlanan ve pestisitlere biyolojik alternatif olarak sunulan bir toksin (Cry) üretir (Winder ve ark. 1989, Berry ve ark. 2002). Bu nedenle bu türün sahip olduğu toksin çevre dostu olduğu ve insan sağlığına zarar vermediği için yıllardır biyopestisidal formilasyonlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Brar 2006).

2.1.2. Biyoinformatik

Biyolojik bilimlerin çok hızlı gelişimi ve bu alandaki araştırma ve uygulamalar, büyük miktarda veri birikiminin yanında çözüm bekleyen birçok sorunun ortaya çıkmasına da sebep olmaktadır. Yalnız insan genomunun dizi analizi üzerine yoğunlaşılması önemli başarılar elde edilmesini sağlamıştır, fakat her şeyin dizi analizi ile bitmediği açıktır. Birkaç yıl öncesine kadar biyolojik olaylarla ilgili tahminde bulunabilmek için bilişim ve biyolojinin entegrasyonunun yeterli olabileceği sanılıyordu. Ancak zamanla diğer bilimlerin de katkısına ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır.

Biyolojik sistemler ve olaylar hakkında toplanan bilgilerin sağlıklı biçimde değerlendirilmesi, biyolojinin yanı sıra biyokimya, kimya ve tıp ile bilişim bilimleri, matematik ve istatistiğin entegrasyonunun sonucu ortaya çıkan yeni ve interdisipliner bir bilim dalı olan biyoinformatik sayesinde mümkündür (Hogue 2002). Biyoinformatik, bilişimin algoritma ve konseptlerini kullanarak karmaşık biyolojik olayların modellenmesini ve elde edilen verilerin etkin bir şekilde ve kısa bir sürede analizini sağlamaktadır. Son yıllarda virüs ve bakterilerden insanlara kadar birçok canlının tüm kalıtım bilgisi açığa çıkmakla beraber insan genomunun aydınlatılması daha ilk adım sayılır. Çünkü genlerin ortak davranışlarını anlamak ve bu bazda yeni ilaçlar geliştirebilmek için genler incelenip karakterize edilmeli ve fonksiyonları araştırılmalıdır. Bu işler DNA dizi analizinden çok daha karmaşıktır; biyoinformatik, bu karmaşık sorunların çözümü için belirleyici yaklaşımlar sunmaktadır (Jain 2002).

Biyoinformatik uygulamalı bir bilimdir. Modern moleküler biyoloji veri arşivlerinden bilgisayar programları kullanılarak sonuçlar çıkarılmakta ve bu sayede ilginç tahminler yapılabilmektedir. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) biyoinformatik için şu tanımı vermiştir:

Biyoinformatik; yaşam bilimleri (biyoloji, biyokimya, tıp), bilgisayar bilimleri, bilişim teori ve teknolojileri ve ayrıca matematik ve istatistiğe dayalı interdisipliner bir bilim dalıdır.

Biyoinformatiğin ana konuları aşağıdaki başlıklarda toplanabilir:

- Genom Projeleri: Genom sekansı, gen haritası
- Fonksiyonel Genomik: Mikroarray gen ekspresyon analizi, Farmakogenomik
- Yapısal Genomik: Fonksiyonel konformasyonun anlaşılması; ilaç hedeflerinin ve ilaç-hedef etkileşiminin anlaşılması
- Proteomik: Proteinlerin tüm komponentlerinin analizi (proteom); proteinlerin lokalizasyonu, modifikasyonu, etkileşimi, aktivitesi ve fonksiyonunun karakterizasyonu; 2-D PAGE, MS, two-hybrid tekniği, protein çipleri
- Kıyaslamalı Genomik: Gen keşfi, fonksiyon tahmini, gen ve genom düzeyinde evölüsyon, tür oluşumunun mekanizması
- Matematiksel Biyoloji: Yeni yöntemler, gen, fonksiyon ve metabolik yol tahmini için algoritma; matematik/biyolojik işlemler ve sistemler için istatistiksel modelleme
- Mikroraylar: Klinik tanı ve teşhis yöntemleri, transkriptomik analizler

Biyoinformatiğin üç önemli uğraşı alanı vardır:

1. Geniş veri tabanları arasındaki ilişkileri değerlendirmek için yeni algoritma ve istatistiklerin geliştirilmesi
2. Nükleotid ve aminoasit dizilerini, protein bölgeleri ve yapılarını kapsayan farklı tipteki verilerin analizi ve yorumlanması
3. Farklı tiplerdeki verilerin etkin kullanımı ve yönetilmesi için yeni araçların geliştirilmesi.

Biyoinformatikçi, değişik alanlarda çalışan ve farklı dilleri konuştuklarından işbirliği yapamayan bilim adamları arasında tercüman rolü oynayan kişi konumundadır (Harms 2002).

2.1.2.1. Biyoinformatiğin Tarihçesi

Biyoinformatiğin başlangıcını kesin olarak söylemek zordur. Pauling ve Corey'in proteinlerin sekonder yapılarının doğru tahmini için geliştirdikleri yaklaşım biyoinformatik için başlangıç kabul edilebilir. Kuantum mekaniği, mineroloji, kristalografi, yapısal kimya, anestezi, immunoloji, tıp ve evrim ile yakından ilgilenen geniş vizyon sahibi bir bilim adamı olan Pauling, biyoinformatikçilerin prototipi sayılır. Çağdaş anlamda biyoinformatik bilgisayarın yoğun desteğine gereksinim duyduğundan, bilgisayarla moleküler grafiklerin çizimine ait ilk makalenin 1966 yılında Scientific American dergisinde yayınlanmasını biyoinformatik için başlangıç saymak daha gerçekçidir.

Biyoinformatik terimi 1980'li yılların ortalarından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Temel moleküler ve genetik proseslerinin anlaşılmasında ve kompleks verilerin analizi ve yorumlanması için yeni yöntemler geliştirilmesinde en etkin kurum olan National Center for Biotechnology Information'nun (NCBI) kuruluş yasası 4 Kasım 1988'de zamanın ABD başkanı Ronald Reagan tarafından imzalanmıştır.

Biyoinformatik interdisipliner bir bilim dalı olduğundan, dayalı olduğu bilim dallarındaki önemli buluş ve ilerlemeler aynı zamanda biyoinformatiğin de gelişimine katkı sunar (Jain 2002).

2.1.2.2. Biyoinformatiğin Önemi

Biyoinformatik analizler üç tip veri setinde toplanabilir: Genom sekanslama, makromoleküler yapı ve fonksiyonel genomik deneyleri. Analizler diğer değişik verilerin hazırlanmasında da kullanılır (örneğin; taksonomi, metabolik yolların ilişkisi, bilimsel yayınlar, hasta istatistikleri).

Biyoinformatiğin en önemli özelliği; insan dahil tüm biyolojik türlerin genomlarına, protein sekanslarına ve üç boyutlu yapılarına, metabolik yol veri tabanlarına, hibridoma bilgilerine ve biyoçeşitliliğe bağlı bilgilerine ait kantitatif verilerin toplanmasıdır (Harms 2002).

Son yıllarda genom sekans projelerindeki yaygın uygulamaları sayesinde biyoinformatik büyük önem kazanmıştır. İnsan genomu projesinin başarı ile

tamamlanmasında biyoinformatik çok büyük rol oynamıştır. Biyoteknolojiye dayalı üretim ve yöntem geliştirmede de biyoinformatik ihtiyaç duyulan bir bilimdir. İlaç dizaynı ve geliştirilmesi pahalı ve zaman alıcı işlemlerdir. Biyoinformatik bu işlemlerin hem maliyetini hem de gerçekleşme süresini düşürmektedir. Büyük ilaç biyoteknolojisi şirketlerinin hemen hemen tamamı çok geniş bir Biyoinformatik-Araştırma-Geliştirme grubu oluşturmuşlardır. Son araştırmalar biyoteknolojinin en hızlı büyüyen üretim teknolojisi olduğunu göstermektedir. Biyoinformatiğin önemi elbette uygulamadaki başarıları ile ölçülecektir. Biyoinformatik temelli araştırmalar, ilaç dizaynı yanında medikal diyagnostik ve tedavi alanında da daha şimdiden önemli başarılar kazanmıştır (Hopkins 2006).

Biyoinformatik metodlar biyolojik araştırmaların vazgeçilmez unsuru haline gelmiştir. Biyoinformatik orijinal olarak biyolojik dizi analizleri için geliştirilmiştir. Ancak günümüzde; yapısal biyoloji, genomik ve gen ekspresyon çalışmaları gibi geniş bir konu aralığında hizmet vermektedir. Tüm biyoinformatik çalışmalarını destekleyen prensipçe iki yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi, biyolojik olarak anlamlı benzerliklere göre verilerin kıyaslanması ve gruplanması; ikincisi ise bir tip verinin analizlenerek, diğer bir tip verinin anlaşılması ve değerlendirilmesidir. Bu yaklaşımlar biyoinformatiğin temel amaçları ile uyum içindedir. Sonuç olarak biyoinformatik biyolojik araştırmalara bir derinlik ve farklı bir boyut kazandırmaktadır (Evans 1999).

2.1.2.3. Biyoinformatiğin Amaçları

Biyoinformatiğin ana amacı genomu verilen bir organizma ile ilgili tüm fonksiyonların anlaşılması ve yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Biyoinformatiğin amaçları üç ana başlık altında toplanabilir:

- Veri organizasyonu: Biyolojik veriler araştırmacıların kolayca ulaşabileceği ve yeni sonuçların kolayca aktarılabilmesi için her bilim adamı tarafından sorunsuz kullanılacak basit veri bankaları kurulmalıdır.
- Sistemlerin geliştirilmesi: Bu sistemler biriktirilen verilerin analizini yapmalı ve bu analizleri basitleştirmelidir. Sistemlerin geliştirilmesi değişik alanlardan

uzmanların işbirliğini gerekli kılmaktadır. Veri analizi için araç ve kaynak gelişimi sağlanmalıdır. Örneğin; dizisi analizlenmiş bir proteinin daha önce karakterize edilmiş diziler ile kıyaslanması durumunda ilgili tüm veri tabanlarını kullanmak gerekir.

- Sistemlerin uygulanması: Geliştirilen sistemler ile biyolojik bakış açısıyla toplanan veriler analizlenmeli ve yorumlanmalıdır.

Bugün protein yapıları ve nükleik asit zincir dizilerinin saklandığı yüzden fazla veri bankası vardır. Evrim DNA da kodlanan proteinleri zamanla değiştirmektedir. Bilgisayar destekli dizi analizleri ve bu değişimlerin sınıflandırılması ile akraba türlerin belirlenmesi ve filogenetik ağaç denen soy ağacının ortaya çıkarılması mümkün olmaktadır.

Genler DNA düzeyinde proteinleri kodlayıp özelliklerini belirler. Her gen hücrelerde belirli bir tip proteinin ekspresyonunu sağlar. Tek bir DNA çipi ise belirli bir tip hücrede binlerce hatta yüzbinlerce genin konsantrasyonunu veya ekspresyon düzeyini ölçer. Aynı hücre tipinde sağlıklı ve hasta hücreler bu sayede belirlenebilir. Bu çalışmalardan elde edilen çok geniş kapsamlı bilgiler, tanı ve tedavide biyokimya laboratuvar bulgularına alternatif olması açısından önemli bir rol oynamakta olup gelecekte bu rol daha da artacaktır (Eklin 2003).

Biyoinformatiğe destek veren jel elektroforezi ve PCR gibi moleküler biyoloji yöntemlerinin kompleks matematik problemlerinin çözümüne uygulanması biyo-hesaplama sayesinde mümkün olacaktır; ki bu alan gelişmeye çok açıktır (Critchlow 2001).

2.1.3. Filogeni

Günümüzde yaklaşık olarak 1.8 milyon kadar hayvan türü ile 900 bin kadar bitki türünün varlığı bilinmektedir. Bunun yanında henüz sınıflandırılmamış canlı türlerinin sayısının 3-10 milyon olduğu ve 500 bin kadar türün de yok olduğu tahmin edilmektedir. Tüm bu çeşitlilik göz önüne alındığında taksonomi ve sistematik adını verdiğimiz bilim dallarının önemi anlaşılabilir.

Taksonomi, dünya üzerinde var olan organik çeşitliliğin tanımını yapan tek bilim koludur ve dünyadaki biyoçeşitlilik krizine çok önemli bir yaklaşımdır. Bu açıdan

düşünüldüğünde taksonomi; canlılığın kökeninin açıklanması için gerekli bilgileri verir, evrim süreci içerisinde gerçekleşen olayları açıklar ve bu bilgilerin biyolojinin diğer kollarında kullanılmasına olanak sağlar. Canlıları sınıflandırarak biyokimya, immünoloji, ekoloji ve etoloji gibi biyolojinin birçok kolunda yapılan çalışmaların açıklayıcı ve keşfe yarayan değerde olmasına katkıda bulunur. Tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan organizmalar üzerindeki araştırmalara yön verir. Dünyadaki canlıların şu ana kadar sadece çok az bir kısmı taksonomik olarak araştırılmıştır. Tüm bu katkıları göz önüne alındığında taksonomi, biyolojinin genişlemesinde büyük payı olan ve bir bütün olarak biyoloji bilimi içinde dengenin kurulmasına yardımcı olan bir bilim koludur (Felsenstein 1983).

Aristo'dan günümüze kadar beş farklı sınıflandırma teorisinin ileri sürüldüğü görülmektedir. Bunlardan Amprikçilik, taksonomik sınıflandırmayı gerek görmezken, Esasçılık, organik çeşitliliği morfolojik karakterleri dikkate alarak sınıflandırır. İsimcilik, bireyleri esas alarak sınıflandırma yapar. Kladizm, organik çeşitliliği filogenetik ağacın dallanma noktalarına göre sınıflandırır. Evrimsel sınıflandırma ise, tür ve tür üstü grupların var olma nedenleri ile bunların yanıtlarını esas alarak sınıflandırma yapar. Modern sınıflandırma sistemleri ise filogenetik sistematik yöntemlerine dayanılarak yürütülür. Filogenetik sistematik, biyolojinin canlıları atasal akrabalıklarına göre sınıflandırılan bir çalışma alanıdır (Hennig 1950).

Filogenetik sistematik; kapsamı, kavramları ve uygulama yönleri ile oldukça yeni bir alandır. Filogeni özellikle son birkaç yılda yoğunlaşılacak bir alan olduğundan, konu ile ilgili çok zengin bir literatüre rastlanır. Son on yıllık periyot içerisinde böceklerin sistematik durumları üzerine yapılan çalışmaların filogenetik akrabalıkların tespitine dayalı yöntemlerle yürütüldüğü görülmektedir (Iranpour ve ark. 2004, Khan ve ark 2000). Filogenetik sistematik, biyolojinin canlıları atasal akrabalıklarına göre sınıflandıran bir çalışma alanıdır.

Filogeni, en kısa deyim ile evrimsel secere (soy) ilişkisi olarak tanımlanabilir. Tür ve tür üstü kategoriler jeolojik dönemlerde türleşme süreçleri ile oluşmuşlardır. Bu türleşme süreçlerinin açıklanması ile taksonlar arasındaki evrimsel ilişki (akrabalık) açıklanmış olunur. Bir takson veya takson grubunun filogenilerinin belirlenmesi demek,

zamansal olarak (önce-sonra) onların birbirleri ve diğer taksonlarla ortak ata temelinde durumlarının ortaya konması demektir (Hennig 1950).

Doğal bir sistem oluşturmak için taksonların secere (soy) ilişkisinin (filogenilerinin) sınıflandırmaya yansıtılması gerekir. Günümüzde filogeninin taksonomi açısından zorunluluğu hemen hemen tüm taksonomistlerce kabul edilmektedir. Filogenetik sistematığın iki temel prensibinin ortaya çıktığı görülmektedir. Bunlar; yalnızca paylaşılan türemiş karakterler (sinapomorfi) organizmaların gruplandırılması için uygundur ve filogenetik sistematik monofiletik grupların üzerine evrimsel tarihi yeniden oluşturmaya çalışmalıdır.

Filogenetik sistematik uygulaması, filogenetik hipotez olarak saptanan ağaç üzerinde kümeleme yoluyla organizmaların soya ait akrabalık tanımına yani sinapomorfiye rehberlik eder ve filogenetik ağaç, monofiletik sınıflandırma gruplarının hiyerarşik olarak şemaya dönüştürülmesini sağlar (Hennig 1966).

2.1.3.1. Filogenetik Sistematik

Filogenetik sistematik Hennig'in araştırmasının İngilizceye tercüme edilmesinden sonra popüler olmuştur. Hennig tarafından yapılan bu çalışma yeni bir keşif olmamasına rağmen, Hennig filogenetik sistematığın prensiplerini analiz eden ve filogeninin esasının tahmini için yöntemler öneren ilk sistematikçidir (Hennig 1950).

Hennig organizmaların evrimsel tarihinin, türleşme sırasındaki evrimsel gelişimin sonuçları olduğunu ve eğer sonuçlar doğru bir şekilde belirlenebilirse evrimsel gelişim tarihinin gözler önüne serilebileceğini kabul etmektedir. Bu yaklaşım filogenetik sistematığın iki temel prensibinin ortaya çıktığını göstermektedir: Yalnızca apomorfik karakterler, yani paylaşılan türemiş karakterler, organizmaların gruplandırılması için uygundur ve filogenetik sistematik, monofiletik grupların üzerine evrimsel tarihi yeniden oluşturmaya çalışmalıdır. Hennig'in düşüncesine göre monofilinin "monofiletik bir grup tek bir türden soylanmış türün bir grubudur" tanımı ilk taksonomistlerin kullandığı "monofiletik gruplar evrimsel olarak akraba gruplardır ve bu grupların tüm soylarının araştırılmasına gerek yoktur." tanımından farklıdır. Hennig monofili teriminin bu

karışıklığından uzaklaşmak için yeni bir terim olan “Holofili”yi önermiştir, ama monofili terimi genel bir kabulle Hening’in terimi olarak kladistik literatüre adapte olmuştur. Birçok monofiletik taksa, monofili üzerine Hening’in kriterlerinin ışığında yeniden yapılandırılmaya ihtiyaç duymuştur. Bu duruma en iyi örnek “Sürüngenler”dir. Bu grup, Memeli ve Kuş gibi soyların dışında kaldığı için “parafiletiktir”. Burada yalnızca “Sürüngen üyeleri tarafından paylaşılan sinapomorfiler bilinmemektedir ve diğer gruplarda da bulunamamıştır, fakat bu arada üç taksada da bazı sinapomorfiler paylaşılmaktadır ve bir takson olarak düşünülmemelidirler (Hennig 1950).

Filogenetik sistematikte kullanılan hiyerarşik sistem, orjinleri ile günümüzdeki durumu arasında zamanla farklılıkların olduğu, bir diğer grubun etkisinde kalan monofiletik gruplardan oluşturulmuştur; hiyerarşik sistemdeki zincirlerin etki altında kalması “Ortak Ata Düşüncesi” ile uyum göstermektedir (Hennig 1966).

2.1.3.2. Filogenetik Ağaçlar

Daha öncede bahsedildiği gibi filogeni türlerin evrimsel tarihi veya evrimsel soy ilişkisi olarak adlandırılır. Filogenetik ağaçlar da türlerin evrimsel tarihi boyunca çeşitlenmesini, organizmaların soy hatlarının açığa çıkış sırasını ve hangi organizmanın birbiriyle yakın, hangilerinin ise uzak akraba olduklarını belgeleyen grafiksel gösterimlerdir. Canlıların evrimsel tarihi konusunda doğrudan bilgi sahibi olmak mümkün olmadığından filogenetik ağaçlar oluşturulurken, verilere gereksinim duyulur (Freeman ve Herron 2009).

Filogenetik çıkarsamada temel mantık, filogenetik bir ağaç oluştururken sadece belli tip homolog karakterleri kullanarak işe başlamaktır. Homoloji, ortak bir atadan türeme yoluyla özelliklerin benzerliği olarak tanımlanır. Yani ortak bir atadan paylaşılan karşılaştırılabilir özelliklerdir. Homolog karakterler fenotipik (morfolojik, fizyolojik, davranışsal vb.) veya genotipik (genom, gen düzenlemeleri, kromozom sayısı nükleik asit sekansı vb.) olabilir (Hall 2007). Filogenetik bir ağaç oluştururken kullanılacak olan homolog karakterlerde aranan en önemli kriter, karakterin homolog olmakla beraber türemiş bir özelliğe sahip olması gerektiğidir. Ortak türemiş özelliklere sahip homoloji

tiplerine sinapomorfi denir. Bir sinapomorfi belli türler arasında paylaşılan ve ortak bir atadan değiştiği için benzer olan homolog bir özelliktir. Mesela genetik şifre bugün yaşayan bütün organizmalar tarafından paylaşılan homolog bir özelliktir. Yaşayan bütün organizmaları aynı ortak atadan türeyen tek bir soy hattında gruplayan bir sinapomorfidir.

Sinapomorfiler kullanılarak türler belli bir soy hattında toplanır ve iç içe kümelenirler. Bu oluşum bir ata ve onun bütün türevlerini oluşturan grupları verir ve bu grupların her birine monofiletik grup denir. Eğer grup ortak ata ve onun bazı türevlerini barındırıyor ise parafiletik grup ve eğer değerlendirilen grup en yakın bir ortak ataya sahip değil ise o zaman bu gruba da polifiletik grup denir. Bakteriler ve arkeler hücre çekirdeğine sahip olmamalarına göre parafiletik bir grup oluştururken, kuşlar ve memeliler sıcakkanlı olmalarına göre polifiletik bir grup oluştururlar. Bu son iki grup, tüm soy hatlarında bulunmayan veya farklı grup soy hatlarında bulunmakla beraber en yakın ortak atayı vermeyen karakterlerin sinapomorfik karakter seti ile oluşturulmuş bir soy hattında temsil edilmesi ile ortaya çıkar. Bunlardan filogenetik taksonomi için kabul gören tek grup monofiletik gruptur. Çünkü bu grup, bir türden farklılaşarak meydana gelen tüm türlerle birlikte bu ata türü de içine alan gruptur. Ek olarak belli sinapomorfik karakterler sadece belli tipte monofiletik gruplar oluşturur. Mesela genetik şifre bakteri ve memelilerin aynı monofiletik grubun üyeleri olduklarını tanımlamak için işe yarar, ancak bize bakteri ve ökaryotları ayırmada yardımcı olmaz. Bunun yerine, bakteri ve memelilerin herbiri, bugün yaşayan bütün türleri içeren monofiletik grup içinde, kendilerini ayrı bir monofiletik grup olarak tanımlayan sinapomorfilere sahiptirler. Bakteriler peptidoglikan olarak adlandırılan bir bileşen içeren hücre duvarı gibi sinapomorfilerle tanımlanır; ökaryotlar çekirdek zarı gibi sinapomorfilere sahiptirler. Filogenetik ağaç oluştururken tüm bu prensipleri kullanan yaklaşıma kladistik yaklaşım denir (Freeman ve Herron 2009).

2.1.3.3. Filogenetikte Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Filogenetik analiz için temel verileri elde etmede çeşitli sorunlar ortaya çıkabilir. Örneğin, anatomik özellikler, sistematikte önemlidir ve tipik olarak yok olmuş olan canlılar için elde olan tek veri çeşididir. Canlıların aynı özellik durumuna sahip olup olmadıklarına

karar vermek çoğu kez anatomik ayrıntılar hakkında geniş bilgi sahibi olmayı gerektirir; zor olan ve dikkat gerektiren bir iştir (Futuyma 2008).

Filogenetik bir ağacı doğru bir biçimde oluşturmak için homolog özelliklerin analiz edilmesi ve yukarıda da anlatıldığı gibi sinapomorfik karakteristiklerin tanımlanması gerekir, çünkü benzer özelliklerin farklı grup türlerde tamamen bağımsız olarak türemesi de olasıdır (Felsenstein 2001).

Konvergent evrim

Benzer ortamları paylaşan farklı soy hatlarında, birtakım morfolojik benzerlikler bağımsız bir şekilde evrimleşir. Böyle benzerlikler benzer ortamlar tarafından yaratılan problemlere çözüm oluşturmak amacıyla, doğal seçim benzer yapılar lehine işlediği zaman açığa çıkarlar. Bu şekilde meydana gelen evrime konvergent evrim denir. Eğer konvergent evrim açığa çıkmışsa, benzer özellikler homolog değildir ve sinapomorfi olarak nitelenemezler. Örneğin timsah ve su aygırlarında gözlerin tepede bulunduğu kafatası yapısı veya balina ve köpek balıklarının aerodinamik şekli gibi benzerlikler ortak atadan alınmış olan özellikler değildir. Bu yapılar aynı gelişimsel yolu takip ettiklerinden dolayı değil seçim baskısı, benzer ortama uyum sağlayan benzer yapıların gelişimi lehine işlediği için sonuç böyle olmuştur. Yine penguen ve fokların ön üyeleri incelendiğinde farklı soy hattında bulunmalarına rağmen bu yapıların benzer olduğu görülebilir. Bu yapılar da konvergent evrim nedeniyledir. Yukarıda karşılaştırılmış olan tüm canlıların verilen benzer özellikleri hariç tutulup diğer özellikleri karşılaştırıldığına, bu canlıların farklı soy hatlarına ait oldukları kolayca anlaşılabilir (Freeman ve Herron 2009).

Geriye Dönüş

Aynı tip benzerlikler moleküler düzeyde de açığa çıkabilir. Moleküler düzeyde evrim, nükleotid dizisinde oluşan mutasyonlar yoluyla gerçekleşir. Yeni nükleotid dizileri paylaşılan türemiş özellikler olarak türev soy hatları tarafından miras alınır. Ancak türler ortak atadan başka nedenlerle de nükleotid dizisi paylaşabilirler. Bunun nedeni bazı dizilerde ortak atadan itibaren meydana gelen baz değişimlerinin tekrar ortak atayla benzer dizilime dönüşebilecek duruma gelebilmesidir. Buna geriye dönüş (reversal) denir. Eğer

geriye dönüş oluşmuşsa benzer özellikler homolog değildir yani bu özellikler ortak atadan miras alınmış özellikler değildir ve dolayısıyla bu özellikleri sinapomorfik olarak değerlendirmek yanlış olur.

Konvergen ve geriye dönüş; bu olayların ikisinin de ortak özelliği evrimsel hikâyeyi oluştururken yanılığa yol açabilecek sonuçlara sahip olmalarıdır. Her iki durum da homoplasi kavramında birleşir. Eğer özelliklerde benzerlikler homoloji nedeniyle değillerse, homoplasi nedeniyledirler. Homoplasi, doğru evrimsel ilişkilerin yanlış bir biçimde yansıtılmasına neden olur ve doğal süreçte meydana gelebilen bir durumdur (Felsenstein 2001).

Melezlenme ve Yatay Gen Aktarımı

Konvergent evrim ve geriye dönüş' ün yanında filogenetik uyumsuzluğa neden olan iki durum daha vardır; bunlardan biri özellikle bitkilerde görülen melezlenme diğeri ise bakteriler arasında sıkça gerçekleşen yatay gen aktarımıdır.

Birçok bitki türü ve kimi hayvan türü, iki atasal türün melezlenmesiyle (türler arası üreme yoluyla) ortaya çıkmıştır. Böyle durumlarda, filogeninin bir kısmı, dallanma yerine bir ağ şeklinde olacaktır ve melez toplumdaki bazı genler, iki ayrı türe ait soy hattında birine yakın akraba olacaktır. Diğer bir deyişle, farklı genlere dayanan tür filogenileri farklı olacaktır (birbirine uymayacaktır). Bu nedenle, böyle bir uyumsuzluk, başka nedenlerle de ortaya çıkabilmesine karşın, ağsı evrim denilen melezlenme yoluyla evrim için geçici kanıt sağlayabilir.

Genomun çoğunu kapsayan melezlenmenin tersine, yatay gen aktarımı, bir türün birkaç genini başka bir türün genomuna ekler. Ölü hücrelerden salınan çıplak DNA'nın alımı ya da köprüleşme yoluyla, uzak akraba türler arasında genlerin, faj (veya plazmid) tarafından taşındığı yatay gen aktarımı bakterilerin evriminde çok önemlidir (Ochman ve ark. 2000). Bu durum yapılan bazı çalışmalarda da ortaya çıkmıştır. Mesela 2009 yılında, *Bacillus* cinsi ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Bacillus* cinsine ait *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* ve *Bacillus mycoides* türleri arasında yatay gen aktarımının olduğu ortaya çıkmıştır (Donnarumma ve ark. 2009). Filogenetik uyumsuzluk ve çeşitli yollardan elde

edilen diğer kanıtlar, yatay gen aktarımının çeşitli bakterilere, antibiyotik direnci, konak canlılara saldırma ve hastalığa neden olma yeteneği, sıcak su kaynakları gibi aşırı çevre koşullarına uyum sağlama gibi özellikler kazandırdığını göstermiştir (Futuyma 2008).

Homolojiyi Homoplasiden ayırmak

Filogenetik veri setlerinin birçoğu yukarıda bahsedilmiş olan konvergent evrim ve geriye dönüş gibi doğal faktörlerin neden olduğu homoplasik karakterler içerir. Doğru filogenetik ilişkileri oluşturmak için homoplasik karakterlerin, homolog karakterlerden ayırt edilmesi gerekir.

Homolojiyi homoplasiden ayırmanın en etkili yolu evrimsel akrabalıkları oluştururken sadece bir veya birkaç özellik yerine, çok sayıda özelliği analiz etmektir. Homoplasik bir özellik daha büyük bir karakter setinde incelendiğinde büyük bir olasılıkla zorluklarla karşılaşır.

Homoplasik karakterleri ortaya çıkaran bu yöntem parsimoni (parsimony) yani en yalının yeğlenmesi kavramıyla yapılır (Futuyma 2008). Parsimoni yönteminde en yalın, filogeni ile uyumu en yüksek evrimsel ağaç bulunmaya çalışılır. Bu yöntemle artan veri seti ile birlikte sayısı binleri bulabilen çok sayıda ağaç topolojisi değerlendirilir (Felsenstein 1983). Parsimoni birçokları arasından hangi dallanma örüntüsünün olası olduğunu tanımlamak, homoplasinin karşılıklı etkisini azaltmak ve gerçek evrimsel hikayeyi oldukça doğru bir biçimde yansıtmak için bir yol sunar. Parsimoni filogeni çıkarsamaya uygulandığında tercih edilen ve toplam evrimsel değişim miktarını azaltan ağaçtır. Filogeni çıkarsamasında neden parsimoni yöntemi kullanılır sorusunun cevabı oldukça açıktır. Birçok durumda kovergens ve geriye dönüşler ortak bir atadan değişim yoluyla oluşan benzerliklere göre daha nadir meydana geldiklerine göre, parsimoni uygulanmış filogenetik çıkarsama ile oluşturulan filogenetik ağacın, evrimsel hikayeyi daha doğru bir biçimde yansıtan ağaç olduğunu kabul etmek gerekir. Parsimoni, homolojiyi homoplasiden ayırmanın ve sinapomorfileri tanımlamanın mantıksal bir yoludur. Ancak, yanılmaz değildir. Bu bağlamda parsimoninin yanında, maksimum olasılık, bayesiyan çıkarımı ve uzaklık metotları gibi yöntemler de kullanılır (Felsentein 1983).

Maksimum olasılık metodunda olası filogenetik ağaçlarda dağılım ihtimallerini anlamak için standart istatistiksel teknikler kullanılır. Bayesiyen yaklaşımlarında da olasılık metodunda uygulananlara ek olarak, belli bir veri ve araştırma altındaki özelliklerin zaman içinde nasıl değiştikleri modeli altında, belli bir ağacın doğru olma olasılığının ne olduğu sorusuna da cevap aranır (Freeman ve Herron 2009). Uzaklık metotları ise filogeni çıkarsamada diğer metotlardan oldukça farklı bir yaklaşıma sahiptir. Uzaklık metodunda morfolojik bir özelliğin varlığı ya da yokluğu veya bir genin homolog bir pozisyonundaki nükleotidin kimliği gibi ayırık karakter verileri uzaklık değerine dönüştürülür. Bu uzaklık değerinin ölçüsü karşılaştırılan guruplar arasındaki akrabalık derecesini verir. Birbirleri arasındaki uzaklık değeri en küçük olanlar birbirleriyle en yakın akraba olacak şekilde kümelenirler (Swofford ve ark. 1996).

2.1.4. Moleküler Taksonomi

Moleküler taksonomi canlıları hücredeki moleküler yapıtaşlarının analizine dayalı olarak sınıflandıran bilim dalıdır. Moleküler taksonomide son dönemde birçok teknik geliştirilmesine rağmen en çok kullanılan yöntemler DNA-DNA hibridizasyonu, ribotiplendirme, çok lokuslu dizi tiplendirmesi, yağ asidi analizi (FAME) ve ITS-PCR parmak izi gibi tekniklerdir (Stackebrandt 2006).

2.1.4.1. DNA-DNA Hibridizasyonu

DNA hibridizasyonu, moleküler sistematığın temelini oluşturur ve tür teşhisinde kullanılan ilk moleküler metotlardan biridir. Bu yöntem prensip olarak karşılaştırılan iki canlının DNA'ları arasındaki hibridizasyon kinetiğine dayanır. DNA-DNA hibridizasyonu organizmaları tür seviyesinde ayırt etmede kullanılan hassas bir yöntemdir. İki canlıyı aynı türe dahil etmek için hibridizasyon değeri ile ilgili kesin bir oran olmamakla beraber genelde iki canlının aynı türe ait olduğunu söyleyebilmek için önerilen DNA hibridizasyon oranı %70 ve üzeridir. Organizmaların aynı cinse ait olduğunu söyleyebilmek için ise bu oranın en az %25 olması önerilir (Swofford ve ark.)

2.1.4.2. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme metodunda organizmaların 16S rDNA bölgelerine odaklanılır ancak bu yöntemde dizi analizi yapılmaz. İlgilenilen organizmaların 16S rDNA'larındaki restriksiyon enzimi kesim bölgelerine bakılır. 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılarak restriksiyon enzimi ile muamele edildiğinde her canlıya ait 16S rDNA bölgesi agaraoz jelde kendine özgü eşsiz bir desen verir. Jelde oluşan bu desenler sayısal verilere dönüştürülür ve veri tabanında mevcut referans organizmaların verileri ile karşılaştırılır. Ribotiplendirme bakteriyel teşhiste kullanılan hızlı ve spesifik bir yöntemdir (Madigan ve Martinko 2010).

2.1.4.3. Çok Lokuslu Dizi Tiplendirmesi (MLTS: Multi Locus Typing Sequence)

Aynı anda birden fazla gen bölgesi ile ilgilenmesi bakımından 16S rDNA dizilemesi ve ribotiplendirme yöntemlerine göre daha avantajlı bir yöntemdir. Canlıları tür seviyesinde ayırmada oldukça hassastır. Hatta çok yakın suşları bile ayırt edebilme gücüne sahip bir yöntemdir. Bu yöntemde yaşamsal faaliyetlerden sorumlu olan birden fazla gene ait dizi bilgileri ve bunlara ait allel sayıları karşılaştırılır. Her bir genin dizilimi ve bu gene ait allel sayıları türe özgüdür. Dolayısıyla bu yöntem organizmaları tür seviyesinde başarı ile ayırt edebilir (Madigan ve Martinko 2010).

2.1.4.4. Yağ Asidi Analizleri (FAME: Fatty Acid Methyl Ester)

Bu yöntemde hücre membranında bulunan yağ asidi tiplerine ve bunların oranlarına bakılır. Özellikle prokaryotlarda yağ asidi içeriği oldukça çeşitlidir (zincir uzunluğu, halka yapısı, çift bağ sayısı, hidroksil grubu içerip içermemesi gibi). Dolayısıyla bu çeşitlilik türden türe değişiklik arz eder ve tür teşhisinde kullanılan bir araçtır. Ancak bir organizmanın yağ asidi profili fiziksel koşullardan (sıcaklık gibi) ve fizyolojik değişikliklerden (büyüme fazı, besiyeri içeriği gibi) etkilendiği için bu koşulların standardizasyonu sağlanmalıdır. Bunun için veri tabanında yağ asidi profili ile ilgili mevcut veriler hangi koşullar altında elde edilmişse ilgilenilen organizmaların büyüme koşulları da (fizyolojik ve/veya fiziksel) o koşullarla aynı olmalıdır (Madigan ve Martinko 2010).

2.1.4.5. ITS-PCR Parmak İzi Tekniği

Tür düzeyinde ayırım sağlayan bir diğer teknik ITS-PCR parmak izi tekniğidir. Bakteriler arasında rRNA geni, genellikle rRNA operonunda 16S-23S-5S şeklinde (ökaryotlarda bu 18S-5.8S-28S şeklindedir) organize olmuştur (Klappenbach ve ark. 2000). Ribozomal RNA (rRNA) operonunun kopya sayısı bakteri genomu başına 1-15 arasında değişir. Örneğin *E. coli* rRNA operonu 5 kopya içerirken, *B. subtilis*'teki kopya sayısı 10'dur. Ribozomal RNA operonunda ITS (Internal Transcriber Spacer) bölgeleri olarak adlandırılan ve 16S-23S ve 23S-5S bölgelerinin herbirinin arasında yer alan DNA segmentleri bulunur. 16S-23S rDNA ITS' nin, bakteriyel türler arasında sekans boyu ve nükleotid sayısı önemli derecede değişebilir ve 23S-5S rDNA ITS'ye göre daha çok çalışılmıştır. Bu bölge evrensel olarak yüksek derecede korunmuş olan rRNA genlerinin arasında bulunan değişkenliği yüksek DNA sekanslarından oluşur. Aynı zamanda bu bölge bakteriler arasında tür içi çeşitlilik göstermez, dolayısıyla 16S-23S rDNA ITS bölgelerinin değişkenliği türe özgüdür ve bu bölgeler türe özgü olduğundan bakterilerde tür karakterizasyonu için güçlü birer araçlardır. ITS bölgelerinin nükleotid boy ve sayısına dayanan karşılaştırmalı analizi, bakterilerin filogenetik sınıflandırması için faydalıdır.

ITS DNA' ların PCR ile amplifikasyonu, hızlı ve doğru bakteriyel identifikasyon için başarılı bir şekilde kullanılabilir. Evrensel olarak korunmuş 16S ve 23S bölgelerinden elde edilen primerler kullanılarak herhangi bir bakteri izolatının tüm 16S-23S ITS bölgesi PCR ile ampifiye edilebilir. Tür-spesifik ITS sekanslarının boyu ve rRNA operonlarının çoklu kopya sayıları agaroz jelde kendine özgü eşsiz bir desen verir (Dingman 2009). Mesela ITS-PCR parmak izi tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada 8 cins ve 28 türü içeren 300'ün üzerinde bakteri ırkı teşhis edilmiştir (Jensen ve ark. 1993).

2.1.5. Filogenomik ve Evrimsel Kronometreler

DNA'nın keşfi ve moleküler biyolojide hızlı bir şekilde meydana gelen değişim ve dönüşüm sürecinden önce biyologlar, nesiller boyunca, adaptasyonu fenotip düzeyinde çalışmakla sınırlı kalmışlardır. Fenotip temelli çalışmalar hangi morfolojik veya davranışsal özelliğin, neden bireylerin belli bir ortamda yüksek uyum gücü elde etmesine izin verdiğini

anlatmayı konu edinmekteydi. Durum araştırmacıların hücrelerin, embriyoların ve döllerin fenotipleri üzerine çalışmaya odaklandıkları hücre biyolojisi, gelişim biyolojisi, genetik ve diğer alanlardakine benzerdi.

Kalıtısal materyal olarak DNA'nın keşfi ve hücrede belli bir işlev görmek üzere proteinler ve RNA moleküllerini genlerin şifrelediğini gösteren verilerin ortaya konulmasıyla hızlı bir değişim süreci başlamıştır. Bu anlayış, nükleik asit ve proteinlerin içeriklerini çalışmak için tekniklerin gelişmesine ilham kaynağı oldu. Nükleik asit sekanslama teknolojisinin gelişimi ve nükleik asit, protein gibi bilgi taşıyıcı makro moleküllerin tanımlanması ve bunların tarihsel bilgiyi içeren "moleküler saat" olarak kullanılması 1970' in sonlarında ribozomal RNA küçük alt birimi sekans verilerinin karşılaştırılmasına dayanan üç domainli modelin (Archea – Bacteria – Eucarya) gelişimine yol açmıştır. (Oren ve Papke 2010). Evrim alışan biyologlar adaptasyonları gen düzeyinde çalışma olanağı elde etmiş ve özellikle evrim çalışan moleküler biyologlar, nükleotid ve aminoasit dizilerindeki değişimin oran ve örüntüsü hakkındaki soruları derinlemesine araştırma fırsatı bulmuşlardır. Tüm bu gelişmeler ışığında genom dizi verilerinin evrimsel analizine odaklanan filogenomik kavramı ortaya çıkmıştır (Freeman ve Herron 2009).

Belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler (moleküler kronometreler) olup, evrimsel değişimi ölçerler. Diđer bir deyişle işlevsel olarak benzer (homolog) makromoleküllerin nükleotid ve aminoasit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıklarının bir sonucudur. Moleküler dizileme ile evrimsel uzaklıkların ölçülmesi amacıyla yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküllerin sečilmesi şarttır.

Kusursuz bir moleküler kronometreyi tanımlayan birtakım kriterler mevcuttur;

- Moleküler bir kronometre, çalışmak için seçilen grup içerisinde evrensel olarak yaygın olmalıdır. Bu ilgilenilen gruptaki tüm organizmaların karşılaştırılabilmesini sağlar
- Molekül her organizma için işlevsel olarak homolog olmalıdır. İşlevselliği farklı olan moleküllerin dizi benzerliği göstermesi beklenmez.
- Analizler için dizileri sıralamak amacıyla

korunmuş dizi bölgelerine sahip olmalıdır ki bu çok önemli bir kriterdir.

- Seçilen molekül dizisinin, organizmadaki evrimsel değişimi bir bütün olarak yansıtması gerekir.

Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmektedir. Ancak, bunlar arasından ribozomal RNA'ları kodlayan genler, translasyonel sistemdeki temel bileşenler, ATPaz proteinleri, ATP sentezleyen veya hidrolizini yapan enzim kompleksleri, genetik rekombinasyona yardımcı olan *RecA* enzimi, DNA giraz'ın β alt ünitesini kodlayan *gyr β* , RNA polimeraz δ faktör 70' i kodlayan *rpoD* en çok kullanılanlar arasında gösterilebilir (Madigan ve Martinko 2010, Cullen ve ark. 1998).

2.1.5.1. Evrimsel Kronometreler Olarak Ribozomal RNA'lar

Ribozomal RNA'lar, mükemmel evrimsel kronometreler olmalarını sağlayan çeşitli özelliklere sahiptirler. Ribozomal RNA'lar oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotit dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri; 5S, 16S ve 23S ('S', 'Svedberg' i simgeler ve bir partikülün santrifüj edildiğinde çökmesini esas alan bir kütle ölçüsüdür) olan 3 çeşit ribozomal RNA molekülü vardır. Ökaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük olan 18S molekülü üzerine odaklanmıştır. 16S ve 18S rRNA'ları ribozomun küçük alt biriminin (30S veya 40S) bir parçası olduklarından SSU (small subunit) dizilemesi kısaltması, 16S veya 18S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir. Ribozomal RNA dizilerine ait çok geniş bir veritabanı mevcuttur. Örneğin Ribozomal Veritabanı Projesi (RDP) şu an sayısı 100.000'i aşan bu tür dizilere ait çok büyük bir koleksiyona sahiptir.

16S rRNA dizisi bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi açıklamada kullanılan güçlü bir araçtır. SSU rRNA'ların filogenetik bir araç olarak kullanımına 1970'lerde Illinois Üniversitesi'nden Carl Woese öncülük etmiştir ve bu yöntem günümüzde tüm biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko 2010).

16S rRNA dizisi (veya 16S rDNA) ilgi çekicidir çünkü ribozomal RNA, bakteriler arasında hem evrensel dizilere, hem de ulusal veritabanıyla karşılaştırıldığında bakterileri

tür ya da cins düzeyinde tanımlamayı mümkün kılabilen tür-spesifik dizilere sahiptir (Mignard ve Flandrois 2006). Genel olarak kabul gören şekliyle 16S rRNA dizisinde, diğer tüm organizmalardan %3' ten fazla farklılık gösteren bir prokaryotun (diğer bir deyişle veri tabanındaki diğer tüm dizilere %97' den az benzerlik gösteren) yeni bir tür olduğu düşünülebilir. Bu rasgele seçilmiş bir rakam değildir. Bu öneriyi destekleyen en önemli gözlem, 16S rRNA dizisinde %3' ten fazla farklılık gösteren iki prokaryotun genomik DNA'larının %70' ten az (iki organizmanın aynı tür olduğunu söylemek için %70 veya üzerindeki hibridizasyon değerine sahip olunması önerilir) hibridize olduğudur (Madigan ve Martinko 2010).

Taksonomik ilişkilerin gösteriminde, 16S rDNA temelli çıkarımlar ve fenotipik çıkarımlar farklı olabilir. Bununla birlikte şöyle bir sonuca varılabilir; 16S rDNA'ları benzer ırk/türlerin fenotipik karakterleri de muhtemelen benzerdir. Fakat benzer fenotipli ırk/türlerin 16S rDNA' larının benzer olması gerekmez (Maughan ve Auwera 2011).

16S rRNA geni özellikle mikrobiyal moleküler sistematik için karakterize edilmiş çok iyi bir molekül olmasına karşın protein kodlayan diğer genlerin de bu amaç için kullanılmasına ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Çünkü rRNA geni yavaş evrimleşir ve ancak tür ve cins düzeyini belirlemek için iyi bir araçtır. Unutulmaması gereken bir diğer nokta da rRNA geninin tür düzeyinde her zaman ayırım sağlamayabileceği ve çoğunlukla alt-tür düzeyinde ayırım yapmadığıdır (Rosselló-Mora ve Amann, 2001). Tür içi varyasyonda sekans varyasyon değeri yüksek olan ve protein kodlayan genler yakın akraba grupların ayırımı için kullanılır. Bu genlerin bir diğer avantajı da genom başına bir kopya halinde bulunmalarıdır. Bu açıdan bakıldığında bu genler rRNA geninden daha güvenilirlerdir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) ve EMBL (European Molecular Biology Laboratory) gen bankalarında verileri mevcut bu genlerden bazıları; DNA giraz' ın β alt ünitesini kodlayan *gyr β* , ve analogu *parE*, RNA polimeraz δ faktör 70' i kodlayan *rpoD* ve flagellin'i kodlayan *fliC* gibi genlerdir (Hirsch ve ark. 2010). Örneğin 2008 yılında yapılan bir çalışmada yine böyle bir molekül olan RNA polimeraz β alt ünitesi (*rpB*) gen dizisi' nin *Bacillus* türlerini ayırma gücü araştırılmış ve araştırmadan

elde edilen veriler, *rpB* gen dizisi' nin *Bacillus* türlerini ayırt etmede 16S rRNA' dan yaklaşık 4.5 kat iyi olduğunu göstermiştir (Ki ve ark. 2009).

Bunun yanında, rRNA dizilemesinin ayırım sağlayamadığı çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde, daha önce de değinilen DNA:DNAhibridizasyonu, Ribotiplendirme, Çok lokuslu dizi tiplendirmesi (MLTS) gibi moleküler yöntemlere de başvurulabilir .

16S rRNA dizinlemesi bazı durumlarda DNA hibridizasyonu ve diğer moleküler yöntemlere göre organizmaları tür seviyesinde ayırt etmede yetersiz kalabilir, ancak evrensel olması ve birbirinden farklı türlerin amplifikasyonunda kullanışlı olmasından moleküler filogenetik sistematik için çok değerli bir araçtır (Madigan ve Martinko 2010).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma organizması

B. subtilis, Bacillus megaterium, Paenibacillus polymyxa, Bacillus thuringiensis

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

EDTA (AppliChem), Sarkosyl (Merck), Proteinaz K (Merck), Tris-HCl (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck), Sodyum Asetat (Merck), Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (Sigma-Aldrich), İzopropanol (Sigma-Aldrich), Etidyum bromür (Sigma), 1XTAE, MgCl₂ (Merck), Agaroz (Fluka), PBS (Sigma), Tris (Merck), ve Kloroform (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Otoklav (Hirayama)
Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)
PCR Cihazı (Bio Rad)
Elektroforez (Biolab)
Hassas Tartı (GEC Avery)
pH Metre (Mettler MP220)
Etüv (Heraeus)
Derin Dondurucu (Ugur)
Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad)
Laminar Kabin (Telstar AV 100)
Mini Santrifüj (E.S-6)
Magnetik Karıştırıcı (Stuart)
Vorteks (VWR) Güç kaynağı (Bio-Rad)
+4 °C dolap (Sanyo)
28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)
Su banyosu (Grant LTD 66)

Isıtıcı (Heildoph)

Mikropipet (Pipetman ve eppendorf)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler

SIGMA jelden saflaştırma kiti

3.2. Metod

3.2.1. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizler NCBI (National Center for Biotechnology Information) ve EBI (European Bioinformatics Institute) veritabanları kullanılarak yapıldı. PCR temelli çalışmalarda primer tasarlanır. Bu işlem için öncelikle NCBI veritabanında ‘search’ kutucuğuna ‘16S rRNA’ yazılıp birkaç organizmadan sıra ile bilgiler alındı. ‘Display settings’ ten ‘fasta’ ile dizi bilgileri sırayla alınıp bir word dosyasına kaydedildi. Daha sonra word dosyasına kaydedilen bilgiler EBI veritabanından ‘sequence analyses’ ile ‘clustalw2’ den açılan sayfaya kopyalandı. Son olarak ‘Submit’ butonuna tıklanarak ortak bazlar kontrol edildi. Bu analizler sonucu universal bir 16S rRNA geni primeri oluşturuldu.

3.2.2 Organizmaların Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan bakteriler, Dicle üniversitesi kampüs alanındaki topraktan izole edildi. Alınan toprak örneği 70°C’de 10 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 10^6 - 10^7 oranında sulandırılarak nutrient agar besiyerine tek koloni düşecek şekilde yayılıp 37°C’de 24 süreyle inkübe edildi. Morfolojik görünümüne dayanılarak seçilen bakteriler stok kültür şeklinde saklandı.

Bakteriler spor boyama, gram boyama ve biyokimyasal analiz sonuçlarına göre *Bacillus* sp. olarak tanımlandı.

3.2.3. DNA İzolasyonu

İzolatlar LB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (220 rpm) 37°C’de 24 saat üretildi. Daha sonra her bir örnekten 1.5 ml alınıp eppendorf tüplere aktarıldı ve 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerine;

200 µl dH₂O
50 µl 0,5M EDTA
10 µl %20 sarkosyl
10 µl proteinaz K (10mg/ml)
10 µl 1M Tris- HCl (pH:8)
5 µl 5M NaCl eklendi.

Karışım 5 dakika boyunca vortekslendi.

Daha sonra 2 saat boyunca 65°C'deki su banyosunda bekletildi. Bu süreçte her 20 dakikada bir vortekslendi.

Bu aşamadan sonra her bir tüpteki karışım miktarı kadar fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenip 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

Fenol: kloroform: izoamil alkol işlemi 3 defa yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Her adımda santrifüj sonunda elde edilen ürünlerden üst sıvı alındı ve temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı.

Yeni ependorfa alınan üst sıvıya hacminin 1/10'u kadan 3M NaAc (sodyum asetat) ve hacminin 2 katı kadar absöüt etanol eklenip -20°C'de 1 gece bekletildi.

Süre sonunda örnek 10 dakika 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Süpernatant uzaklaştırılmış, pelet kurutulmuştur.

Peletin üzerine 200µl dH₂O eklenip pelet çözülmüştür.

Çözülen peletin üzerine 1/10 hacminde 0,3M NaAc ve 440µl etanol eklenip -20°C'de 1 gece bekletilmiştir.

Süre sonunda örnek 10 dakika 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Pelet kurutulup 50µl dH₂O ile çözülmüştür.

DNA'nın saflığını kontrol etmek için;

DNA örneklerinin nanodrop'ta 260 nm (nanometre) dalga boyunda ölçümü yapıldı. Bu ölçümlerde DNA örneklerinin peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör

olarak kullanıldı. Spektrofotometrede okunan değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak DNA miktarı saptandı.

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD}_{260} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 50 \mu\text{l/ml}$$

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Reaksiyon için her bir tüpe;

2.5 μl 10X tampon (pH: 8.4, Tris-HCl)

2.5 μl MgCl_2

2 μl dNTP

2.5 μl primer R (Reverse: geri primer)

2.5 μl primer F (Forward: ileri primer)

11.75 μl dH_2O

1 μl kalıp DNA

0.25 μl taq polimeraz

eklendi.

Hazırlanan tüpler PCR aletine konularak cihaz şu değerlere ayarlandı:

1 döngü; 94°C.....2 dakika (Denatürasyon)

94°C.....1 dakika

52°C.....1 dakika 30 döngü (Bağlanma)

72°C.....1 dakika

72°C.....10 dakika (Uzama)

4°C.....Süresiz

Döngü 30 kez tekrarlanmıştır.

3.2.5 Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi

Agaroz jelde yürütülen DNA'nın UVP transilluminator cihazında oluşan bantların varlığı kontrol edildi ve UV fotometer jel dökümantasyon aleti (UviTec) ile veriler kaydedildi.

3.2.6 PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması

PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar uygun marker (λ DNA *EcoRI* / *HindIII*) kullanılarak tespit edildi. Bu tespit edilen bantlar jelden kesilerek elde edildi ve İllustra GFX PCR DNA ve Gel Band Purfication kit protokolüne uygun olarak saflaştırma işlemi yapıldı.

3.2.7 DNA Dizi Analizi

Çalışmamızda kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PCR ürünlerinin etanolle çöktürülüp saflaştırılması yapıldı. 1.5 ml' lik steril ependorf tüpleri isimlendirildi. Tüplere 4 µl stop solüsyonu ve 1 µl glikojen (Kit' ten) eklendi. Stop solüsyonu: 3M NaOAc (ph: 5.2) ile 100 mM Na₂EDTA (pH: 8.0) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım oda sıcaklığında yapıldı ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. Yukarıda hazırlanmış solüsyon PCR ürünlerine eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. Taze olarak hazırlanmış ve - 20°C 'de bekletilmiş %95' lik etanolden 60 µl alınıp pelete zarar vermeden yavaşça eklendi. Tüpler 4°C 'de 14.000 rpm' de 15 dk. santrifüjlendi ve dipte oluşan pelete dokunmadan süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırıldı. Taze olarak hazırlanmış ve - 20°C 'de bekletilmiş %70'lik etanolden 200 µl alınıp pelete zarar vermeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakıldı. Tüpler 14.000 rpm' de 2 dk. santrifüjlendi ve dipte oluşan pelete zarar vermeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Süpernatant dökülüp, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40°C 'de 10 dk konsantre edildi. Pelete 40 µl SLS (Sample Loading Solution) eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Son olarak pelet iyice pipetlenerek çözüldü ve santrifüjde kısa bir spin işlemine tabi tutulduktan sonra 4°C' de saklandı.

3.2.8 DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi

Cihazın içinde örnek ve tampon tablası olmak üzere iki aparat bulunmaktadır. Örnek tablasına 40 µl SLS içeren örnekler sırasıyla eklendi ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatıldı. Tampon tablasına da yine kit içinden ayırma tamponu, kuyucukların %70' ini dolduracak kadar eklendi ve kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza

3. MATERYAL ve METOD

takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlandı. Dizi analizi sonucunda cihaz tarafından okunan veriler bir metin belgesine kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. Kullanılan Mikroorganizmaların Morfoljik Özellikleri

Çalışmada kullanılan izolatların katı besiyerindeki görünüşleri Resim 4.1- 4.8.'de verilmiştir.



Resim 4.1. *Paenibacillus polymyxa*



Resim 4.2. *Bacillus thuringiensis*



Resim 4.3. *Bacillus megaterium*



Resim 4.4. *Bacillus subtilis* 1

4. BULGULAR



Resim 4.5. *Bacillus subtilis* 2



Resim 4.6. *Bacillus subtilis* 3



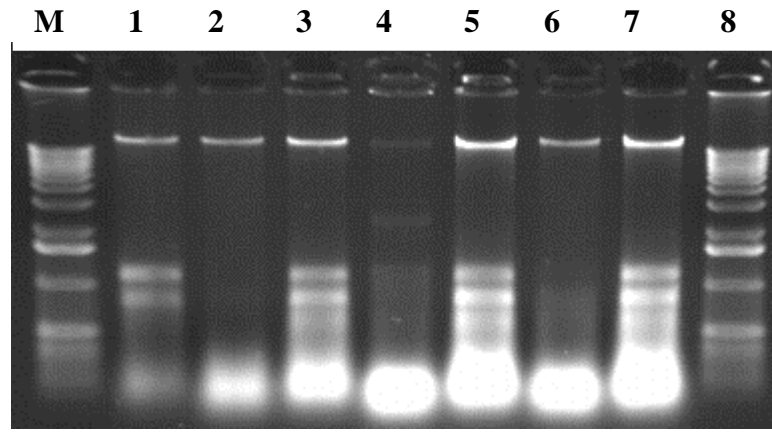
Resim 4.7. *Bacillus subtilis* 4



Resim 4.8. *Bacillus subtilis* 5

4.2. DNA İzolasyon Sonuçları

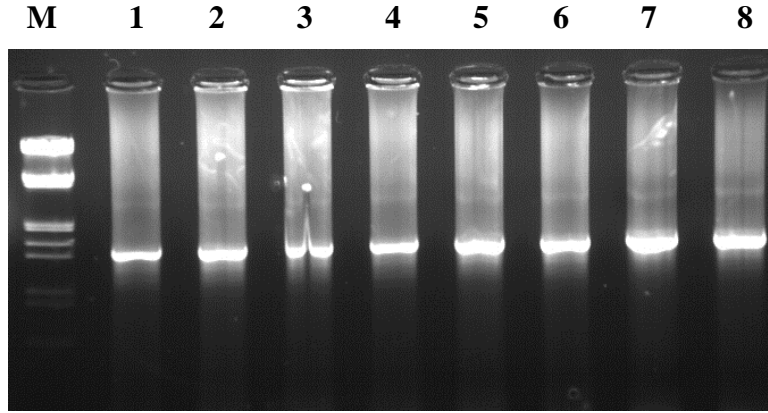
Bacillus izolatlarının genomik DNA izolasyonu bölüm 3.2.3’de belirtilen protokolde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre deney sonuçları Şekil 4.1’de belirtilmiştir. Bu sonuçlar içinde elde edilen genomik DNA izolasyon ürününün spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin 213 ng/μl yoğunlukta DNA içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Bacillus* izolatların’dan klasik yöntemle elde edilen genomik DNA’nın agaroz jelden görüntüsü. **M ve 8)** λDNA *EcoRI/Hind III* Marker, **1)** *Paenibacillus polymyxa* genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü. **2)** *Bacillus megaterium* genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü **3)** *Bacillus thuringiensis* genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü. **4-7)** *Bacillus subtilis* genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü (örnekler, %0.8’ lik agaroz jel’e 3μl λDNA *EcoRI/Hind III* marker ile birlikte yüklenmiş ve 90V 45dakika yürütülmüştür).

4.3. PCR Sonuçları

Bacillus izolatlarından elde edilen genomik DNA’lar kullanılarak kurulan PCR reaksiyonları sonucu beklenen büyüklük olan 1800 bp (1,8kb)’lik 16S rRNA geni olduğu düşünülen gen jelde görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Bacillus* izolatlarından 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. **M)** λ DNA *EcoRI/Hind III* Marker, **1)** *Paenibacillus polymyxa* 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. **2)** *Bacillus megaterium* 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü **3)** *Bacillus thuringiensis* 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. **4-8)** *Bacillus subtilis* 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü (%0.8' lik agaroz jel'e 3 μ l λ DNA *EcoRI/Hind III* marker ile birlikte yüklenmiş ve 90V 45dakika yürütülmüştür)

4.4. Dizi Analizi Sonuçları

PCR sonucunun gerçekten 16S rRNA genine ait olup olmadığını belirlemek için dizi analizi (sekanslama) yapılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler Şekil 4.3'te belirtilmiştir.

> *Paenibacillus polymyxa*

GTCGAGCGGGATTATGTAGAAGCTTGCTTCTACATAACCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCA
ACCTGCCCCACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTTCTGCATGG
GAGAAGGAGGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGG
TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAAGTCT
ACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTGTTTAATCC
CGAGGCTCAACTTCGGGTGCGACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCG
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGC
TAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGACCTTTCCCTTCGGGACAGA
GGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGC
AACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCGGTAC
AACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA
ACTCGCTACATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAA

> *Bacillus megaterium*

CGTGGCGGGCGGCCTATCATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGG
ATAGGATCTTCTCCTTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCG
TGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCACCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTT
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGA
AGAGAAAAGCGCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTTT
TTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGAT
AGAGCGTTCCCTTCCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGA
GTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCTAAGGTGACAGTG

4. BULGULAR

> *Bacillus thuringiensis*

TGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACATGCAT
GGTTCGAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAAGGCTTTTCGGGTGCTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAAT
AAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAACACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATTC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTG
ACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
GTAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA
GCAACCGGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGACCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTAC
AAAAGACTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
CTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACC GCCCGTACACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCA

> *Bacillus subtilis* 1

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAAGTTTTTCGGATCGTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCCTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCC
CCCGGCTCAACAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGC
TGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA
GCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGG
GCAGAGTGACAGGTGCATGGTTGTCGTGACCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC
AAAGGGCAGCGAAAACCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA
CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACC GCCCGTACACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGGAC
CAGCCCGGAAAGTGGGACAGATGATTGGGGGAA

> *Bacillus subtilis* 2.

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
 ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGG
 TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
 CGCGTGAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCCAATAGGGC
 GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCT
 CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGC
 GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA
 GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGC
 CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCA
 ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCA
 GAGTGACAGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAG
 GGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
 ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCCGGTGAAGTAACTTTTTAGGAGCCAGC
 CGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGAA

> *Bacillus subtilis* 3.

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
 ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGG
 TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCAACTGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCCAATAGGG
 CGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
 CCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCGA
 CGTGTAGCGGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGA
 CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
 TGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGG
 GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA
 GAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT
 GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCCGGTGAAGTAACTTTTTAG
 GAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGAA

4. BULGULAR

> *Bacillus subtilis* 4.

```
TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAACCCTCCGGGAAACCCTGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTG
ACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACG
GTGCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGG
AGGGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA
ACAAAAGGCAGCGAAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGC
AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTACACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTAACCTTTTAGGA
GCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGAA
```

> *Bacillus subtilis* 5.

```
TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAACCCTCCGGGAAACCCTGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACG
CTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACG
GTGCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGG
AGGAAGGTGGGGGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA
ACAAAAGGCAGCGAAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGC
AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTACACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTAACCTTTTAGGA
GCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGAA
```

Şekil 4.3. *Bacillus* izolatlarından 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları.

4.5. Filogenetik Ağaç

Bacillus izolatlarının 16S rRNA genine ait dizi bilgisi dbcluster ile dikey hizalanmıştır. Hizalama sonuçları Şekil 4.4'te görüldüğü gibidir.

```

Bacillus subtilis 1.      TCCC--TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus subtilis 2.      TCCC--TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus subtilis 3.      TCCC--TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus subtilis 4.      TCCC--TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus subtilis 5.      TCCC--TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus thuringiensis  TCTTA--TGAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
Bacillus megaterium      TTCTA--TGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACTGC
Paenibacillus polymyxa  TTCTACATAAC-CTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACTGC
*          * *          ***** **

```

```

Bacillus subtilis 1.      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG
Bacillus subtilis 2.      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG
Bacillus subtilis 3.      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG
Bacillus subtilis 4.      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG
Bacillus subtilis 5.      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG
Bacillus thuringiensis  CCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACAT
Bacillus megaterium      CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGAT
Paenibacillus polymyxa  CCACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACCGGTAGCTAATACCGGATACATC
*          ***** *          ***** *          ***** **

```

```

Bacillus subtilis 1.      TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
Bacillus subtilis 2.      TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
Bacillus subtilis 3.      TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
Bacillus subtilis 4.      TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
Bacillus subtilis 5.      TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
Bacillus thuringiensis  TTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCATTATG
Bacillus megaterium      CTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTCGGCTATCACTTACA
Paenibacillus polymyxa  CTTTTCCTGCATGGGAGAAAGGAGGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTGTG
**          *          *****          ***** **          **          *****

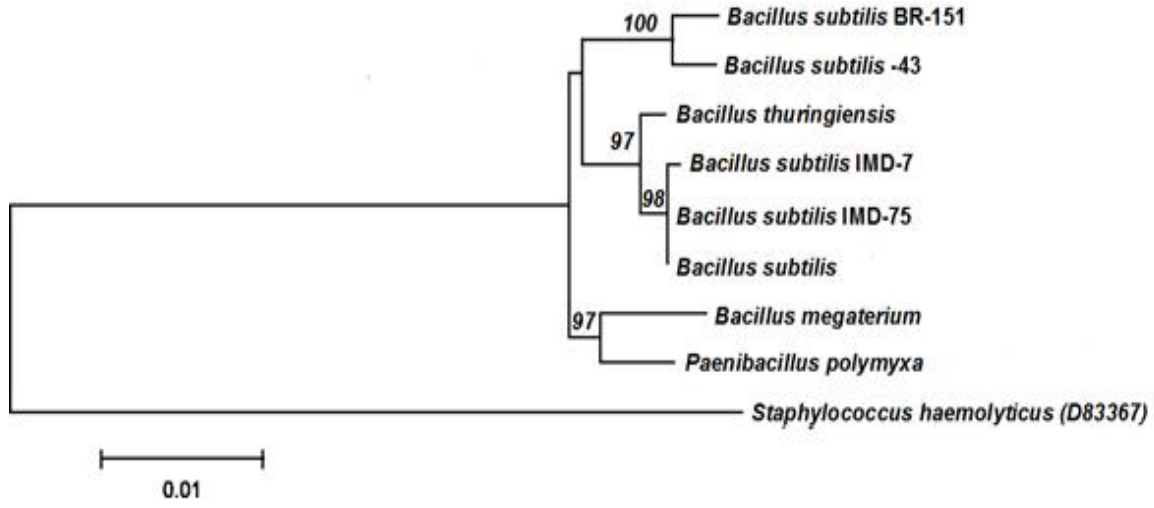
```

Şekil 4.4. *Bacillus* izolatlarından 16S rRNA genine ait hizalama sonuçları (ClustalW programı kullanılmıştır)

16S rRNA genine ait hizalama sonuçları kullanılarak *Bacillus* türlerinin evrimsel analizi yapıldı. *Bacillus* türlerinin evrimsel yakınlıklarını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 4.5'de görülen filogenetik ağaç oluşturuldu ve dış grup olarak da *Bacillus* ailesine yakın *Staphylococcus haemolyticus* türü seçildi.

Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; *Bacillus* ailesi üyelerinden *Bacillus subtilis*'ler kendi içinde kümelenmiştir. *Bacillus subtilis*'lere yakın olduğu bilinen *Bacillus thuringiensis* ise *Bacillus subtilis* ailesi içinde köken almıştır. Birbirlerine yakın olduğu bilinen *Bacillus megaterium* ve *Paenibacillus polymyxa* ise kendi içinde kümelenmiştir.

4. BULGULAR



Şekil 4.5. *Bacillus* ailesi (*B. subtilis* IMD-7: *Bacillus subtilis* 2'yi, *B. subtilis* IMD-75: *Bacillus subtilis* 3'ü, *B. subtilis* -43: *Bacillus subtilis* 4'ü ve *B. subtilis* BR-151: *Bacillus subtilis* 5'i belirtmektedir.) üyelerine ait ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile *Bacillus* türlerinden 16S rRNA'sının dizi bilgisi elde edilerek, biyoinformatik karakterizasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu ve ardından PCR işlemleri ile elde edilen sonuçlara göre beklenen büyüklük olan 1800 bp 16S rRNA genleri olduğu düşünülen genler jelde görülmüştür. PCR sonucunun gerçekten 16S rRNA genine ait olup olmadığını belirlemek için dizi analizi yapılmıştır. Yapılan sekanslama sonucunda elde edilen genin 16S rRNA geni olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında *Bacillus* türlerine 16S rRNA genlerine ait dizi bilgileri karşılaştırılmış ve %100'e yakın benzerlik gösterdiği görülmüştür.

2000 yılında yapılan bir çalışmada 16S rRNA geni sekans analizi kullanılarak üç spiral şekilli organizma teşhis edildi. *Campylobacter fetus*, *Flexispirarappinive* *Borrelia burgdorferi* olarak teşhis edilen bu organizmaların her birine ait rDNA sekansı veri tabanındaki veriler ile %99-100 oranında homoloji göstermiştir (Hayden ve ark. 2000). 2001 yılında İtalya'daki Eolyan Adaları'nda termofilik *Bacillus* türleri ile ilgili yapılan polifazik taksonomik bir çalışmada termofilik, aerobik, spor-oluşturan 82 bakteri izole edilmiş ve bu izolatların fenotipik karakteristikleri geniş bir aralıkta test edilmiştir. Seçilmiş 89 özelliğe sahip termofilik *Geobacillus* ve *Bacillus* referans ırkları ve bu izolatlar üzerinde polifazik taksonomik bir çalışma yapılmıştır. Grup analizleri ile bu izolatların birçoğu (%83'ü) *Geobacillus thermodenitrificans* ile zayıf bir şekilde ilişkili 7 guruba ayrılmıştır. Kalan 18 izolat genotipik karakterizasyona tabi tutulmuş yapılan 16S rDNA sekans analizi ve DNA:DNA hibridizasyon çalışmaları sonucu 7 izolat *Geobacillus thermodenitrificans*, iki izolat *G. thermoleovorans* ve bir izolat ise *Bacillus pallidus* olarak tanımlanmış ve yine bu çalışmalar sonucu 4 izolat *Bacillus*' un yeni türleri olarak ortaya çıkarken, kalan 4 izolat ise *Geobacillus*' un yeni türü *Bacillus vulcani* DSMZ 13174 T olarak tarif edilmiştir (Maugeri ve ark. 2001). Kuş tüyünü parçalayan farklı bakterilerdeki keratinolitik aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan kuş tüyü ile zenginleştirilmiş bir topraktan bakteri izole edilmiştir. Yapılan 16S rDNA gen sekanslama çalışmaları ile keratinolitik aktivitesi yüksek *Bacillus pumilus* FH9 ırkı teşhis

edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler ırkın en çok *B. pumilus* AF526896 ve AF526898 ırkları ile yakın olduğunu göstermiştir (El-Refai ve ark.2004). Çin, Yunnan’ da ormanlık bir alandaki topraktan alınan bir izolat ile ilgili yapılan gözlemler ve 16S rDNA sekans verilerine dayanan filogenetik analizler izolatın *Bacillus* cinsine ait olduğunu belirlemiştir. Ayrıca izolatın *Panagellus redivius* nematoduna karşı önemli bir nematotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan 16S rDNA analizleri, bakterinin en yakın komşuları *Bacillus vallismortis* ile %99.79, *B. subtilis* ile %99.43, *Bacillus Atrophaeus* ile %99.43, *Bacillus amyloliquefaciens* ile %99.36 ve *B. Licheniformis* ile %98.0 oranında benzerlik gösterdiğini ve *Bacillus* cinsindeki diğer ırklar ile %97’ den az benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Polifazik taksonomik veriler temelinde izolat yeni tür *Bacillus nematodica* B-16^T ırkı olarak önerilmiştir (Huang ve ark. 2004). 2006’ da Fransa’ da 240 klinik *Enterobacter* izolatının teşhisi için internal *gyrB* sekansının kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada *gyrB* genine dayalı tür teşhisinde fenotipik yöntemle kıyaslandığında, *Citrobacter* ve *Enterobacter* cinsleri arasında birtakım uyumsuzlukların olduğu gözlenmiştir. Fenotipik yöntemle *Enterobacter cloacae* olarak teşhis edilen ırkların birçoğu, *gyrB* gen bölgesi kullanılarak yapılan moleküler yöntemde *Enterobacter hormaechei* olarak teşhis edilmiştir. Çalışmada *gyrB* gen bölgesinin klinik *Enterobacter* izolatlarının teşhisinde tamamlayıcı bir araç olarak faydalı olabileceğini vurgulanmıştır (Delmas ve ark. 2005). 2005’ te Amerika’ da yapılan bir çalışmada *Bacillus* JF-2 ırkının (ATCC 39307) diğer *Bacillus* türleri ile olan akrabalığı araştırılmıştır. Halotolerant olan ve biyosümfaktant üreticisi olan bu ırk fenotipik karakteristiklerine göre başlarda *B. licheniformis*’ in üyesi olarak tanımlanmıştır. Çalışmada bu ırkın 16S rRNA ve *gyrA* gen sekans analizleri yapılmış ve *AluI* dizilerine ait restriksiyon motifine bakılmıştır. Yapılan bu moleküler çalışmalar ırkın aslında *B. licheniformis*’ in değil *Bacillus mojavensis* türünün üyesi olduğunu göstermiştir. (Folmsbee ve ark. 2005). Macaristan’ da *Phragmites australis* bitkisinin yoğun olarak bulunduğu iki ayrı sulak alandan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada örneklerdeki mikrobiyal kominite araştırılmıştır. Yapılan geleneksel morfolojik ve biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi ile 40 *Bacillus* ve akraba ırkı belirlenmiştir (Borsodi ve ark.2006). Bir ay boyunca klinik örneklerden elde edilen 683 izolatın teşhisi için yapılan bir çalışmada 16S rDNA sekans analizi ile izolatların 568’ i

(%83.1' i) tür düzeyinde teşhis edilirken, 108 izolat (%15.8' i) cins düzeyinde teşhis edildi. Yedi izolat (%1'i) ise tanımlanamadı (Mignard ve Flandrois 2006). 2007 yılında Fransa' da yapılan bir çalışmada *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Comamonas*, *Delftia*, *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Herbaspirillum huttiense* ve *Pseudomonas butanovora* bakteri ırklarının protein kodlayan *rpoB*, *gyrB* ve 16S rRNA' yı kodlayan genlerine dayanan bir filogenetik analiz çalışmasında her üç gene ait filogenetik ağaçlar çizilmiş ve her üç ağacın da genellikle birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Tayeb ve ark. 2007). Farklı sucul ortamlardan alınan *Bacillus* izolatları ile yapılan bir çalışmada 16S rRNA sekans analizi ile *B. aquaemaris*, *B. badius*, *B. cereusgroup*, *B. firmus*, *B. halmapalus*, *B. hwajinpoensis*, *B. litoralis*, *B. sporothermodurans* ve *B. vietnamensis* olmak üzere 9 tür teşhis edildi. Bunların dışında üç izolat ise ancak cins düzeyinde kalabildi (Ki ve ark. 2008). Tunus' ta bir güneş tuzlasında yapılan bakteri tarama çalışmasında %5-15'lik tuzlu su ortamında gelişebilen 40 bakteri izole edildi. Daha sonra bu izolatlar 16S rRNA gen sekanslama işlemiyle filogenetik olarak karakterize edildi. Çalışma ile iki gurup teşhis edildi. 36 ırk *Gamma-Proteobacteria* (%90), 4 ırk ise *Firmicutes* (%10) gurubuna ait olarak tanımlandı. Bununla birlikte daha önce tanımlanmış türler ile karşılaştırıldığında, 16S rRNA gen sekans benzerliği %97' den az olan ve 183ZD08, 191ZA02 ve 191ZA09 olarak adlandırılan üç yeni tür bulunmuştur (Baati ve ark. 2009). İtalya Sardinya'da 5 yıl boyunca *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*' nin (Btk) insektisidal bir preparasyonuna tabi tutulmuş mantar meşesi alanlarında Btk' dan *Bacillus*' un diğer türlerine gen transferi ile ilgili yapılan bir çalışmada Btk'dan farklı bir morfolojiye sahip iki koloni izole edilmiş ve bu koloniler yapılan 16S rDNA analizi ve fenotipik (morfolojik ve fizyolojik) karakterlerine bakılarak *Bacillus mycoides* olarak teşhis edilmiştir (Donnarumma ve ark. 2010). Yeni bitki koruyucuları ile ilgili Hindistan' da yapılan bir araştırmada topraktan izole edilen bir bakterinin, 16S rDNA analizi ile *B. subtilis* türüne ait olduğu belirlenmiştir (Holzinger ve ark.2010). *Photorhabdus* bakteri cinsi ile yapılan bir çalışmada cinsin bilinen üç türü olan *P. temperata*, *P. luminescens* ve *P. asymbiotica* arasındaki filogenetik ilişkiye bakılmıştır. 16S rRNA, *gyrB*(giraz) ve *glnA*(glutamin sentaz) genlerine dayanılarak yapılan bu filogenetik çalışma sonucu HIT ve JUN olarak adlandırılan iki yeni ırk bulunmuş ve bu ırklar *P. asymbiotica* türü içinde gösterilmiştir (Peat ve ark. 2010). Polifazik taksonomik bir

çalışmada Çin, Kenya ve Tanzanya' daki üç ayrı hipersalin ve alkalin gölden *Bacillus* benzeri yedi ayrı bakteri izole edildi. Bu bakterilerin karşılaştırmalı 16S rRNA gen sekans analizi izolatların *Bacillus* cinsine ait olduğunu gösterdi. Yedi izolat %97.7-99.9 oranında 16S rRNA gen sekans benzerliği gösterdi ve *Bacillus* cinsine ait diğer türlerden ayrı bir dal oluşturdu. En yakın ilişkili oldukları tür, %92.6-93.8 16S rRNA sekans benzerliği ile *Bacillus agaradhaerens* DSM 8721^T idi. Bu yedi izolat arasındaki DNA:DNA hibridizasyon değeri %85-100 arasındaydı. Polifazik karakterizasyona göre bu ırklar yeni bir türü temsil ediyordu ve bu türün ismi *Bacillus locisalis* sp. nov. olarak önerildi (Márquez ve ark. 2011).

Bazı türlere ait 16S rRNA genleri dizi bilgileri ile elde edilen dizi analizi sonucu karşılaştırılınca, 16S rRNA genlerinin türler arasında ne kadar iyi korunduğu görülmüştür. Elde edilen tüm sonuçlar morfolojik sistematik çalışmalarının genetik temelli çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu çalışmada uygulanan yöntemlerin diğer *Bacillus* ailesi üyelerinde, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve elde edilen profiller sayesinde türlerinin teşhisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Baati, H., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A., Ammar, E. 2010. Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from Tunisian solar saltern. *Curr Microbiol.*, 60: 157-161.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A., Murphy, L., Quail, M., Holden, M., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pB toxins, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5082-5095.
- Borsodi, A. K., Makk J., Rusznya'k A., Vajna B., Taba, G., M a'rialigeti, K. 2007. Phenotypic characterization and molecular taxonomic studies on *Bacillus* and related isolates from *Phragmites australis* periphyton. *Aquatic Botany*, 86: 243-252.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Vale'ro, J.R. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41: 323-342
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311: 1283-1287.
- Cohn, F. 1962. Studies on the biology of the bacilli. Brock, T.D. *Milestones in Microbiology*. Prentice-Hall, p 49-56 , Englewood Cliffs, N.J.
- Critchlow, T., Musick, R., Slezak, T. 2001. Experiences applying meta-data bioinformatics, *Information. Sciences*, 139: 13-17.
- Cullen, D.W., Hirsch, P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 983-993.
- Daegelen, P., Studier, F.W., Lenski, R.E., Cure, S., Kim, J.F. 2009. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21 (DE3). *J.Mol.Biol.*, 394: 634-643.

Delmas, J., Breysse, F., Devulder, G., Flandrois, J.P., Chomarat, M. 2006. Rapid identification of Enterobacteriaceae by sequencing DNA gyrase subunit B encoding gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 55: 263-268.

De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 37: 409–433.

Dingman, D.W. 2009. DNA fingerprinting of *Paenibacillus popilliae* and *Paenibacillus lentimorbus* using PCR-amplified 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions. *J. Invertebr. Pathol.*, 100: 16–21

Donnarumma, F., Paffetti, D., Stotzky, G., Giannini, R., Vettori, C. 2010. Potential gene exchange between *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* and *Bacillus spp.* in soil in situ. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 1329-1337.

Eklin P.L. 2003. Primer on Medikal. Genomics; Bioinformatics. *Mayo Clin Proc.*, 78:57-64.

El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballab, El-Araby, A.M., AbdelFattah. A.F. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40: 2325–2332.

Evans, W.E., Relling, M.V. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286: 487-91.

Felsenstein J. 1983. Parsimony in systematics: biological and statistical issues. *Ann Rev Ecol System*, 14: 13-33.

Felsenstein, J. 2001. The troubled growth of statistical phylogenetics. *Systematic Biology*, 50: 465–467.

Folmsbee, M., Duncan, K., Han, S.O., Nagle, D., Jennings, E., McInerney, M. 2006. Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus Mojavensis* strain JF-2. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 645–649.

Freeman, S., Herron, J.C. 2009. *Evolutionary Analysis*. Pearson Ed. Inc., pp 112-130, Washington.

Futuyma, D.J. 2008. *Evolution*. Sinauer Assoct. Inc., pp 22-29, U.S.A.

- Haggag, W., Timmusk, S. 2007. Colonization of peanut roots by biofilm forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.*, 104: 961–969.
- Hall, B.K. 2007. Homoplasy and homology: Dichotomy or continuum?. *Journal of Human Evolution*, 52: 473-479.
- Harms, J., Schulenzen, F., Zarivach, R. 2002. Protein Structure: experimental and theoretical aspects. *FEBS Letters*, 525: 176-178.
- Hayden, R.T., Kolbert, C.P., Hopkins, M.K., Persing, D.H. 2001. Characterization of culture-derived spiral bacteria by 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39: 55–59.
- Hennig, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*. Berlin, Deutscher Zentralverlag.
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic systematics*. Urbana, University of Illinois Press
- Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Clark, I.M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 878-887.
- Hogue, C.W.V. 2002. Bioinformatics for Beginners. *Trends Biochem. Sci.* 27; 542-543.
- Holt, J.G., 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. Gram-positive bacteria other than Actino- mycetes. Williams & Williams, Baltimore, M.D.
- Holzinger, A., Nagendra-Prasad, D., Huys, G. 2011. Plant protection potential and ultrastructure of *Bacillus subtilis* strain 3A25. *Crop Protection*, 30: 739-74.
- Hopkins MM, Ibarreta D, Gaisser S, Enzing CM, Ryan J, Matin PA. 2006. Putting pharmacogenetics into practice. *Nat Biotechnol.*, 24:403-10.
- Huang, X.W., Niu, Q.H., Zhou, W., Zhang, K.Q. 2005. *Bacillus nematocida* sp. nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 323–327.
- Hugh, R., Leifson, E. 1964. The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, 14: 69–84.

Iranpour, M., Schurko, A. M., Klassen, G. R., and Galloway, T. D. 2004. DNA fingerprinting of tabanids (Diptera: *Tabanidae*) and their respective egg masses using PCR-restriction fragment profiling. *Canadian Entomologist*, 136: 605–619.

Jain, E. 2002. A practical introduction to bioinformatics. *Trends Biotechnol.*, 20: 226.

Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 945–952

Khan, S.A., Razafimandimbison, S.G., Bremer B., Liede-Schumann, S. 2008. *Sabiceae* and *Virectarieae* (Rubiaceae): one or two tribes? New tribal and generic circumscriptions of Sabiceae and biogeography of Sabicea, *Taxon* 57: 7–23.

Ki, J.S., Zhang, W., Qian, P.Y. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*, 77: 48–57.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1328–1333.

Koch, R., 1962. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. Brock, T.D. *Milestones in Microbiology*. Prentice-Hall, pp.89–95, Englewood Cliffs, N.J.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. *Brock of microorganism*. Pearson Ed. Inc., pp 309–328, U.S.A.

Márquez, M.C., Carrasco, I.J., Haba, R.R., Jones, B.E., Grant, W.D., Ventosa, A. 2011. *Bacillus locisalis* sp. nov., a new haloalkaliphilic species from hypersaline and alkaline lakes of China, Kenya and Tanzania. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 424–428.

Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. 2001. A Polyphasic taxonomic study of thermophilic Bacilli from shallow, marine vents. *System. Appl. Microbiol.*, 24: 572–587.

Maughan, H., Auwera, G.V. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 789–797.

Mignard, S., Flandrois, J.P. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 574–581.

Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and nature of bacterial innovation. *Nature*, 405: 299-304.

Oren, A., Papke, R.T. 2010. *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Caister Ac. Press., p 1-2. U.K.

Öner, M. 1987. *Mikrobiyal Ekoloji*. Ege Üniv. Basım Evi, İzmir.

Peat, S.M., Constant, R.H., Waterfield, N.R., Marokházi, J., Fodor, A., Adams, B.J. 2010. A robust phylogenetic framework for the bacterial genus *Photorhabdus* and its use in studying the evolution and maintenance of bioluminescence: A case for 16S, *gyrB*, and *glnA*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 728–740.

Pignatelli, M., Moya, A., Tamames, J. 2009. Env. DB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1: 191– 197.

Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39-67.

Rygus, T., Hillen, W. 1991. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization Operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 594-599.

Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Topanuruk, S., Juan, H.F., Phutrakul, S., Chen, S. 2002. Bioinformatics, functional genomics, and proteomics study of *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography B*, 771: 261–287.

Stackebrandt, E. 2006. *Molecular Identification, systematic and population structure of prokaryotes*. Springer, pp 23-25, Germany.

Switzer Blum, J., BurnsBindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S. 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp.nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp.nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.*, 171: 19–30.

Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddel, P.J., Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. 1996. *Phylogenetic interference*. *Molecular Systematic*. Sinauer, 407-514, Sanderland.

Tayeb, L.A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P. 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related

organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159: 169-177.

Timmusk, S., Wagner, E.G. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12: 951–959.

Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N.N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M., Tindall, B.J., Hooper, S.D., Pati, A., Lykidis, A., Spring, S., Anderson, I.J., D’Haeseleer, P., Zemla, A., Singer, M., Lapidus, A., Nolan, M., Copeland, A., Han, C., Chen, F., Cheng, J.F., Lucas, S., Kerfeld, C., Lang, E., Gronow, S., Chain, P., Bruce, D., Rubin, E.M., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P., Eisen, J.A. 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462: 1056–1060.

Zeigler, D.R., Perkins, J.B. 2009. The genus *Bacillus*. Goldman, E., Green, L.H. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, FL.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Hüsamettin AYGÜN

Doğum Yeri: DİYARBAKIR

Doğum Tarihi: 03-05-1986

Medeni Hali: BEKAR

Yabancı Dili: İNGİLİZCE

EĞİTİM DURUMU (KURUM VE YIL)

İlköğretim: HASAN PAŞA İLKÖĞRETİM OKULU-2002

Lise: ZİYA GÖKALP LİSESİ-2003

Lisans: DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ-2009