

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

**VAN GÖLÜ'NÜN FARKLI BÖLGELERİNDEN TOPLANAN SU VE
SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN L-ASPARAGİNAZ VE ÜRİKAZ ENZİMİ
ÜRETEN ALKALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Firdevs ESEN
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

VAN-2018

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

**VAN GÖLÜ'NÜN FARKLI BÖLGELERİNDEN TOPLANAN SU VE
SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN L-ASPARAGİNAZ VE ÜRİKAZ ENZİMİ
ÜRETEN ALKALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Firdevs ESEN
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

VAN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'ün danışmanlığında, Firdevs ESEN tarafından sunulan “**Van Gölü'nün Farklı Bölgelerinden Toplanan Su ve Sediment Örneklerinden L-Asparaginaz ve Ürikaz Enzimi Üreten Alkalofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 26.01.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Hasan SOLMAZ

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr. Erdal ÖĞÜN

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr. Necati ÖZOK

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun/... .. /..... gün vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Firdevs ESEN



ÖZET

VAN GÖLÜ'NÜN FARKLI BÖLGELERİNDEN TOPLANAN SU VE SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN L-ASPARAGİNAZ VE ÜRİKAZ ENZİMİ ÜRETEN ALKALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ESEN, Firdevs
Yüksek Lisans Tezi, Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN
Ocak 2018, 53 Sayfa

Bu araştırmanın materyalini, Van Gölü'nden toplanan su ve sediment örnekleri oluşturdu. Çocukluk çağında görülen Akut Lenfoblastik Lösemi tedavisinde kullanılan L-Asparaginaz enzimi ile gut hastalığının teşhis ve tedavisinde kullanılan ürikaz enzimi yönünden pozitif izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri belirlenerek 16S rRNA analizine dayalı teşhisleri gerçekleştirildi.

İzolatların L-Asparaginaz enzimi üretme kabiliyeti, % 1 oranında L-asparajin ve fenol kırmızısı içeren M9 ortamında test edildi. Ürikaz enzimi üretiminin belirlenmesi için içerisinde % 0.5 oranında ürik asit bulunan alkalofil ortamı kullanıldı.

Halomonas F1 izolatı, ürikaz üretimi yönünden pozitif özellik gösterirken; Halomonas F2 izolatının, L-asparaginaz üretimi yönünden pozitif özellik gösterdiği belirlendi. Her iki izolatın ılımlı haloalkalofilik gruba ait olduğu tespit edildi.

Karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizisi analizi sonucunda F1 izolatının % 98.5 benzerlik ile *Halomonas variabilis* ve F2 izolatının % 99.2 benzerlik ile *Halomonas meridiana*'ya benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: L-Asparaginaz, Halomonas, Ürikaz, Van Gölü

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALOPHILIC BACTERIA PRODUCING L-ASPARAGINASE AND URICASE ENZYME FROM WATER AND SEDIMENT SAMPLES COLLECTED FROM DIFFERENT REGIONS OF LAKE VAN

ESEN, Firdevs
M. Sc. Thesis, Biological Science
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Erdal ÖĞÜN
January-2018, 53 Pages

The material of this study was water and sediment samples collected from Lake Van. The morphological, biochemical and physiological characteristics of positive isolates in terms of L-asparaginase used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in childhood and uricase enzyme used in diagnosis and treatment of gut disease were determined and diagnoses based on 16S rRNA analysis were performed.

The ability of the isolates to produce L-Asparaginase enzyme was tested in the M9 medium containing % 1 L-asparagine and phenol red. The alkalophylic medium containing % 0.5 uric acid was used to determine the production of the uricase enzyme.

Halomonas F1 isolate showed a positive characteristic for uricase production, while Halomonas F2 isolate showed positive for L-asparaginase production. It was determined that both isolates belong to the moderate haloalkalophilic group.

A comparison of the 16S rRNA gene sequence analysis revealed that F1 isolate had % 98.5 homology with *Halomonas variabilis* and F2 isolate had % 99.2 homology with *Halomonas meridiana*.

Keywords: L-Asparaginase, Halomonas, Uricase, Lake Van

ÖN SÖZ

Mikrobiyal enzimlerin bir kısmı hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bakteriyel L-asparaginaz (L-Asparagine amido hidrolase, E.C.3.5.1.1), insanlarda akut lenfoblastik lösemi ve lenfosarkoma tedavisinde son 25 yıldır kullanılan kemoteröfik bir ajandır. Diğer bir tedavi edici enzim olan ürikaz enzimi, klinik teşhiste ve ürik asit metabolizması ile ilgili olarak gelişen metabolizma hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu tez konusunu bana öneren ve çalışmalarım sırasında benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'e ve moleküler yöntemlerdeki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR, Dr. Metin ERTAŞ ve yüksek lisans öğrencisi Nevroz ASLAN'a teşekkür ederim. Ayrıca Van Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Veteriner Hekim Sayın Mehmet CAMBAZOĞLU, Mikrobiyoloji bölümünde birlikte çalıştığım çalışma arkadaşlarım Adem MİS, Kasım HANCI ve Fatih ARSLAN'a çalışmalarımındaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve tez çalışmalarım esnasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli eşim Zafer Sinan ESEN, değerli kızlarım Emine İrem ESEN, Safiye Elif ESEN, ve canım aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Firdevs ESEN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
EKLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. L- Asparaginaz Enzimi.....	3
1.1.1. L-Asparaginaz enziminin tarihçesi.....	3
1.1.2. L- Asparaginaz Enziminin etki mekanizması.....	3
1.1.3. L- Asparaginaz Enzimi'nin uygulamaları.....	4
1.1.3.1. Anti-tümör ilaç olarak.....	4
1.1.3.2. Aminoasit metabolizmasındaki rolü.....	5
1.1.3.3. Biyosensör yapımındaki rolü.....	6
1.1.3.4. Besin Proseslerindeki Rolü.....	6
1.1.4. L- Asparaginaz Enzimi'nin kaynakları.....	6
1.2. Ürikaz Enzimi.....	7
1.3. Araştırma Alanının Tanıtımı.....	9
1.4. Halomanas Genusunun Özellikleri.....	10
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Alkalofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeri.....	20
3.1.1.1. Alkalofil besiyeri.....	20

	Sayfa
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve boyalar.....	20
3.1.2.1. Kristal Viyole boyası.....	20
3.1.2.2. Safranin boyası.....	21
3.1.2.3. Lügol çözeltisi.....	21
3.1.2.4. Sülfanilik asit çözeltisi.....	21
3.1.2.5. %3'lük H ₂ O ₂ çözeltisi.....	21
3.1.2.6. Rhodamin B boyası.....	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Sediment ve su örneklerinin toplanması.....	21
3.2.2. Su ve sediment örneklerinden alkalofilik bakterilerin izolasyonu.....	21
3.2.3. Alkalifilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi.....	22
3.2.4. Alkalifilik bakteri suşlarının koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi.....	22
3.2.5. M9 agarda L-Asparaginaz enzimi üretiminin belirlenmesi.....	22
3.2.6. Alkalofil agarda ürikaz enzimi üretiminin belirlenmesi.....	22
3.2.7. Alkalofilik izolatların identifikasyonu.....	23
3.2.8. İzolatların gram boyama yöntemi ile boyanması.....	23
3.2.9. Hareket testi.....	23
3.2.10. Katalaz testi.....	23
3.2.11. Oksidaz testi	23
3.2.12. Voges - Proskauer (VP) Testi.....	24
3.2.13. Ornitin dekarboksilaz testi.....	24
3.2.14. Nitrat indirgenmesi testi.....	24
3.2.15. Karbonhidrat oksidasyon/fermentasyon testleri.....	24
3.2.16. Nişasta hidroliz testi.....	25
3.2.17. Tween 80 hidroliz testi.....	25
3.2.18. Kazein hidroliz testi.....	25
3.2.19. Genomik DNA izolasyonu.....	25
3.2.20. 16S rRNA'nın PZR amplifikasyonu.....	27
3.2.21. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi.....	29

	Sayfa
4. BULGULAR.....	31
4.1. Alkalofilik İzolatların Saf Kùltürleri.....	31
4.2. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	32
4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi.....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	41
EKLER.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	53



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelgeler	Sayfa
Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar.....	28
Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları.....	28
Çizelge 4.1. F1 ve F2 izolatlarının biyokimyasal özellikleri.....	32





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. L-asparaginaz enzimi ile L-asparajin aminoasidinin yıkımı.....	4
Şekil 1.2. Normal hücrede Asparajin sentezi.....	5
Şekil 3.1. Van Gölünden su örnekleri.....	20
Şekil.3.2. Su ve sediment örnekleri.....	20
Şekil 4.1. F1 izolatına ait saf kültür.....	31
Şekil 4.2. F2 izolatına ait saf kültür.....	31
Şekil 4.3. F1 izolatı tarafından ürikaz üretimi.....	31
Şekil 4.4. M-9 ortamında F2 izolatı tarafından ürikaz üretimi.....	32
Şekil 4.5. Oksidaz testi.....	33
Şekil 4.6. Nitrat redüksiyon testi.....	33
Şekil. 4.7. F1 izolatına ait katalaz testi.....	33
Şekil 4.8. F2 izolatına ait katalaz testi.....	33
Şekil 4.9. F1 izolatına ait KH fermantasyon testleri.....	34
Şekil 4.10. F2 izolatına ait KH fermantasyon testleri.....	34
Şekil 4.11. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre F1 ve F2 izolatı için 16S.... rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.	35



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

Simgeler	Açıklamalar
μ	Mikron
bç	Baz çifti
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
μg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
sp.	Tür (tek)
spp.	Türler
subsp.	Alttür
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre



EKLER DİZİNİ

Ek	Sayfa
Ek 1. Besiyerleri.....	44
Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar.....	47
Ek 3. Kullanılan Çözelti ve Boyalar.....	49





1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere birçok alanda hayata girmiştir.

Enzimler kimyasal reaksiyonlarda değişikliğe uğramazlar ve reaksiyon hızını artırır. Enzimler olmadığı takdirde, reaksiyonların çoğu biyolojik sistemler de var olandan daha yüksek sıcaklık ve enerji düzeylerine ihtiyaç duyarlar (Lerner ve Lerner, 2002).

Mikrobiyal enzimlere ilginin artma sebebi bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamamasıdır. Mikroorganizmalar geniş biyolojik çeşitliliği ve genetik manipülasyonlara uygunluğu sebebiyle mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao ve ark., 1998). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikroorganizmalardan üretilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Kıran ve ark., 2006).

Mikrobiyal enzimler endüstriyel biyoproseslerin gelişmesinde büyük önem taşımaktadır. Kağıt hamuru ve kağıt, deri, deterjan, tekstil, kimya, gıda ve içecek, biyoyakıtlar, hayvancılık yemleri ve kişisel bakım gibi alanlarda mevcut uygulamalar ile birçok farklı pazara odaklanmıştır. Bugün yeni geliştirilmiş veya daha çok yönlü enzimler geliştirilerek daha yeni, sürdürülebilir ve rekabetçi üretim süreçlerine ihtiyaç vardır. Mikrobiyal çeşitlilik, metagenomik ve genomik gibi modern moleküler teknikler, katalitik özellikleri rasyonel, yarı rasyonel ve rasgele yönlendirilmiş evrim üzerine kurulu farklı stratejilerle geliştirilebilir yeni mikrobiyal enzimleri keşfetmek için kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğu bakteri ve mantarların rekombinant formlarından üretilmektedir (Adrio, 2014).

Endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmaların çoğu ekstrasellüler özelliğe sahiptirler. Endüstriyel enzimler farklı pazarlarda dünya çapında kullanılmaktadırlar. Proteazların kullanıldığı deterjan endüstrisi; amilazlar, amiloglukosidazlar ve glikoizomerazların kullanıldığı nişasta endüstrisi bunlardan en önemlileridir. Enzimler ayrıca bira sanayinde, mandırada, fırıncılıkta, tekstil ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır (Vroemen, 1983). Tarihsel gelişim içerisinde enzimler farklı kaynaklardan elde edilmiştir. Mikrobiyal yolla üretilen fungal enzimler ilk defa 20. yüzyılın başlarında ticari olarak kullanılırken, bakteriyel enzimlerin kullanımının ise I. Dünya Savaşı sırasında başladığı bilinmektedir. Yaşayan hücreden aktif enzimin ayrılabilceğini ilk kez 1897 yılında Buchner tarafından gösterilmiştir. Bu işlemi, mayanın alkol fermentasyonunun başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya ekstraktından yararlanılmak suretiyle göstermiştir (Topal, 1985).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Kıran ve ark., 2006).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığında zaman; alkaliproteaz % 25, diğer proteazlar % 21, Amilaz % 18, Renin % 10, Trypsin % 3, Lipaz % 3 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) % 10, analitik ve farmasötik enzimler % 10 şeklinde bir dağılım göstermektedir (Rao ve ark., 1998).

Ekstrasellüler hidrolitik enzimlerden örneğin; amilazlar, proteazlar, lipazlar, deoksiribonükleazlar, pullulanazlar ve ksilenazlar; gıda endüstrisi, yem sanayi, biyomedikal ve kimya endüstrisi gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır (Sanchez-Porro ve ark., 2003).

Bakteriyel L-asparaginaz insanlarda akut lenfoblastik lösemi ve lenfosarkoma tedavisinde son 25 yıldır kullanılan kemoterapik bir ajandır (Talluri ve ark., 2014).

Ürikaz enzimi, klinik teşhiste ve ürik asit metabolizması ile ilgili olarak gelişen metabolizma hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Ertan ve Öksüz, 2000).

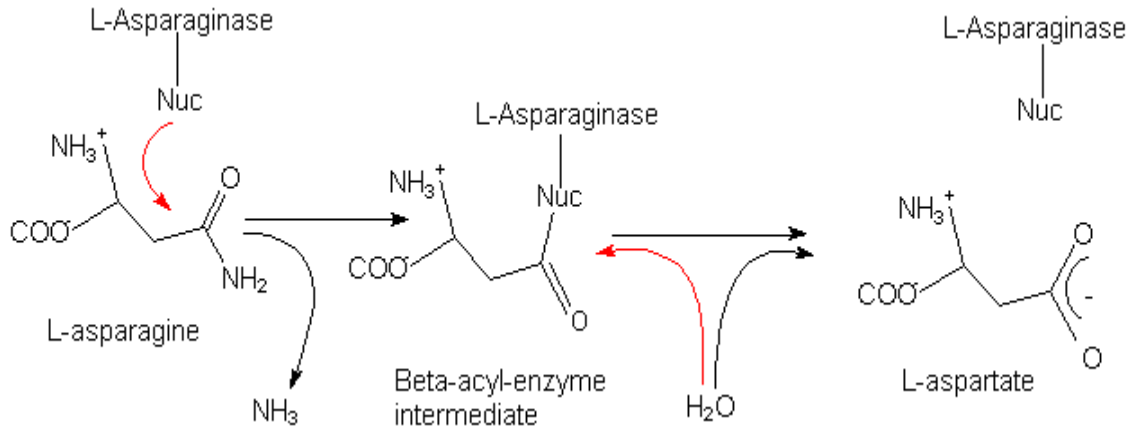
1.1. L-Asparaginaz Enzimi

1.1.1. L-asparaginaz enziminin tarihçesi

Talluri ve ark. (2014), tarafından bildirildiğine göre Kidd 1953 yılında, sıçanlarda anti tümör aktiviteye sahip serumda bulunan bir madde fark etmiştir. Broome, 1963 yılında tümör inhibitör aktivitenin serumda bulunan L-asparaginaz enziminden kaynaklandığını ilk defa tanımlamıştır. De Lowery 1966'da L-asparaginaz enzimini kobay serumundan saflaştırmış, akut lenfoblastik lenfoma hastası bir çocuğa uygulamış ve pozitif sonuç almıştır. L-asparaginaz; L-asparajin'i aspartat ve amonyağa dönüştürür. Amonyanın yüksek konsantrasyonlarda bulunması merkezi sinir sistemine zarar verir. L-asparaginaz; bakteriler, bitkiler ve az sayıdaki bazı hayvanlar tarafından üretilir. L-asparaginaz üretiminde en sık kullanılan bakteriler *Erwinia caratovora*, *Bacillus spp*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas stutzeri* ve *E. coli*'dir. *E.coli*'den elde edilen L-asparaginaz tümör hücrelerinin aktivitesini inhibe etmekte mükemmel sonuç verir ayrıca *E. chrysanthemi*'den elde edilen enzimde teröpatik etkiye sahiptir. L-asparaginaz enzimi çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılmaktadır.

1.1.2. L-asparaginaz enziminin etki mekanizması

Sinha ve ark (2013), bildirildiğine göre L-asparaginaz enzimi; vücutta metabolik ara ürünlerden sentez edilebilen (esansiyel olmayan) bir aminoasit olan L-asparajin'i aspartat ve amonyağa dönüştürür. Tümörlü hücreler büyümek ve bölünmek için L-asparajin aminoasidine ihtiyaç duyarlar. Sağlıklı hücreler için L-asparajin esansiyel bir aminoasit değildir bu yüzden L-asparaginaz enziminin muamelesinden etkilenmezler. Çünkü; normal hücreler kendileri için gerekli olan L-asparajin aminoasidini aktif şekilde üretmeyi sağlayan asparajin sentetaz enzimine sahipken kanserli hücreler bu L-asparajin amino asidini başka bir kaynaktan almak zorundadırlar. Kanserli hücreler dışarıdan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından yapılarak kana verilen L-asparajin aminoasidine bağımlıdırlar. Akut Lenfoblastik Lösemi hastalarına, L-asparaginaz enzimi enjekte edildiğinde tümör hücreleri asparajin amino asitinden yoksun kalırlar ve bölünüp çoğalamazlar. Bundan dolayı L-asparaginaz enzimi anti tümör veya anti lösemik ilaç olarak kullanılmakta önem arz etmektedir.

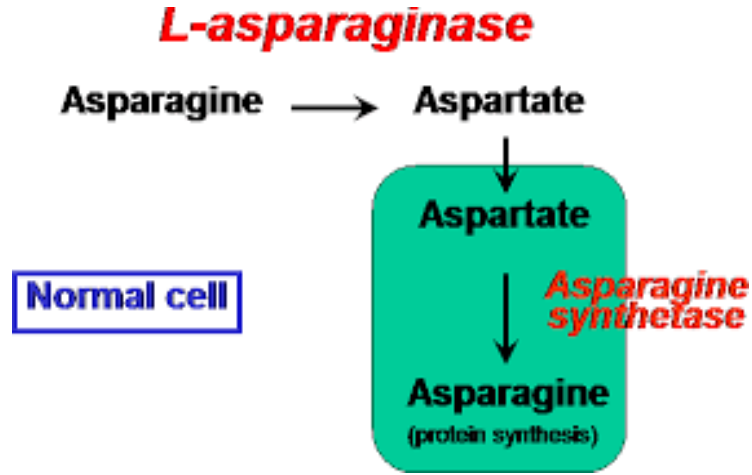


Şekil 1.1. L-asparaginaz enzimi ile L-asparajin aminoasidinin yıkımı.

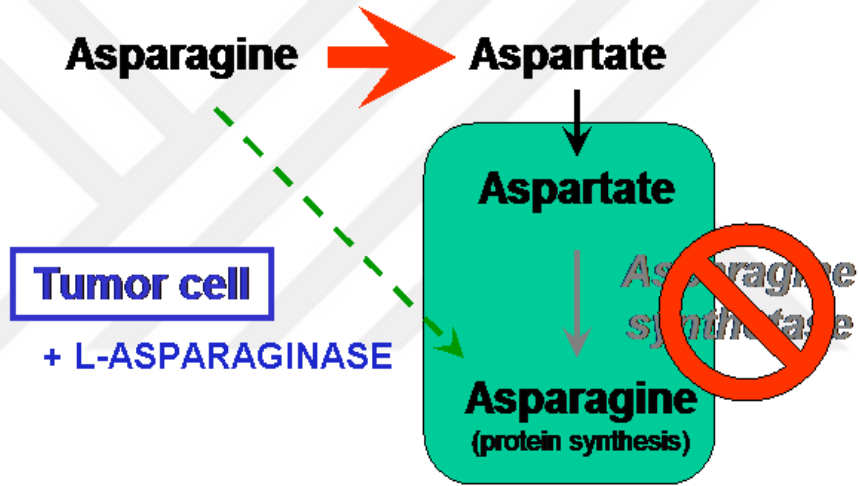
1.1.3. L- asparaginaz enzimi'nin uygulamaları

1.1.3.1. Anti-tümör ilaç olarak

L-asparaginaz enzimi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde diğer ilaçlarla birlikte kullanılabilen önemli bir protein kombinasyonuna sahiptir. Özellikle çocukluk çağında görülen akut lenfoblastik lösemi (ALL), Hodkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, akut miyelomonositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, lenfosarkom tedavisi, retikülosarkom ve dokuları saran melanosarkom gibi kanser türlerinin tedavisinde L-asparaginaz enzimi kullanılmaktadır. İlk çalışmalar; yüksek miktarda L-asparaginaz enzimi içeren kobay serumunun Gardner lenfosarkoma olan bir fareye intraperitoneal enjeksiyonundan sonra tümörde belirgin şekilde gerileme olduğunu göstermiştir. Daha sonra *Escherichia coli* potansiyel bir L-asparaginaz kaynağı olarak bulunmuştur. *E.coli* E.C.2 suşundan elde edilen L-asparaginaz enzimi insan habis tümörlerinin tedavisinde kullanılmıştır (Asthana ve ark., 2003).



Şekil 1.2. Sağlıklı hücrede L-asparajin sentezi.



Şekil 1.3. Tümör hücresinde L-asparajin sentezi.

1.1.3.2. Aminoasit metabolizmasındaki rolü

L-asparaginaz aspartik familyasındaki aminoasitlerin biyosentezinde çok önemli bir rol oynar. *Corynebacteria*, endüstriyel açıdan önemli aminoasitleri sentezlediği için büyük önem taşır. Lizin, trionin ve methionin ticari açıdan önemli aminoasitler olup *C.glutamicum* tarafından üretilir. Bu aminoasitler aspartik asitten elde edilir. Normal koşullar altında aspartik asit lizin ve trionin biyosentezi için sınırlayıcıdır. Krebs döngüsünün (glutamik asit kullanılarak) dışında aspartik asit asparajinin L-asparaginaz ile hidrolizi sonucu oluşur. L-asparaginazın bir rolü de lizin ve threonin aminoasidinin doğrudan öncülü olan aspartik asit oluşumu için asparajin aminoasidini parçalamaktır.

C. glutamicum bakterisinde lizin üreten fermantasyon durumunda aktif halde L-asparajin bulunur (Sinha ve ark., 2013).

1.1.3.3. Biyosensör yapımındaki rolü

L-asparaginazın etkisiyle oluşan amonyak miktarı, bir hastanın kanındaki L-asparajin miktarı ile doğru orantılı olduğundan teşhis amaçlı biyosensör olarak da kullanılır (Sinha ve ark., 2013).

1.1.3.4. Besin proseslerindeki rolü

L-asparaginaz enzimi gıda sanayinde de kullanılır. Gıda teknolojisinde ki son çalışmalar kızartılmış ve pişirilmiş yiyeceklerde (çoğunlukla patates kızartması) asparajinin indirgenmiş şekerlerle reaksiyona girerek akrilamid oluşturduğunu göstermiştir. Akrilamid kansorejen bir maddedir. Patates dilimleri ve ekmek hamurunun kızartmadan veya fırınlamadan öce L-asparaginaz ile muamele edilmesi akrilamid oluşumunu engeller. *Aspergillus oryzae* ve *A. niger*'den elde edilen L-asparaginaz enzimi bu amaçla fırınlama endüstrisinde kullanılır. Bu enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı 40-60 °C ve pH 6.0-7.0'dir. Fırınlama esnasında sıcaklık 120 °C'ye kadar çıktığı için geniş sıcaklık ve pH aralığında çalışan enzimler tercih edilmektedir. Bu yüzden L-asparaginaz üretimi için farklı kaynaklar (bakteriler, funguslar, bitkiler ve hayvanlar) araştırılmaktadır. Dolayısı ile L-asparaginaz hem terapötik hem de endüstriyel aktiviteye sahiptir (Mahajan ve ark., 2014).

1.1.4. L-asparaginaz enzimi'nin kaynakları

Sinha ve ark (2013), bildirildiğine göre L-Asparaginaz enziminin ilk defa *E.coli* bakterisinden izole edildiği bildirilmiştir. Bakteriler, küf, maya, aktinomisetler ve alglerden de L-asparaginaz üretilmiştir. Bitki ve hayvanlardan da L-asparaginaz üretilmesine rağmen bakteriler en iyi enzim üretme yeteneğine sahiptirler. Bakterilerde L-asparaginaz enzimini üretim kapasitesinin yüksek olması, ekonomik olması, istenilen özelliklere sahip enzimlerin elde edilebilmesinin kolay olması ve enzimi saflaştırmanın daha basit olmasından dolayı tercih edilmektedirler.

L-asparaginaz enzim kaynağı olarak; bakterilerin büyük bir kısmı, mayalar, funguslar, algler, aktinomisetler, *Withnaria somnifera*, *Sphagnum fallax*, *Lupine*

araboreuse ve *Lupina mgustplus* gibi yüksek yapılı bitkiler kullanılmaktadır. Bunların yanında L-asparaginaz; *Pinus pinaster* ve *Pinus radiata*'nın köklerinde ektomikorizal funguslar tarafından üretilmektedir. L-asparaginaz genellikle *E. coli* ve *Achromobacteriaceae* familyası gibi diğer gram negatif bakterilerde bulunur. *Pseudomonas fluoresces* bakterisinden L-asparaginaz üretildiği rapor edilmiştir. *Mycobacterium phlai*, *Erwinia cartovara*, *Thermis aquaticus* bazı nitrobakteriler, homodimer L-asparaginaz üreten *Rhodosprrium toruloides* ve *Rhodotorula sp.* *Aspergillus nidulanus* ve *A. terreus* da L-asparaginaz enzimi üretirler. L-asparaginaz bir deniz algi olan *Chlamydomonas*'tan üretilen ilk enzimdir. Aktinomisetlerde L-asparaginaz üretimi için iyi birer kaynaktır. *Streptomyces*'ler, *actinomyces*'ler de önemli oranlarda L-asparaginaz üretme yeteneğine sahiptirler (Sabu, 2003).

1.2. Ürikaz Enzimi

Ürikaz (ürat oksidaz E.C.1.7.3.3); oksidoredüktazlar sınıfına ait bir enzim olup, ürik asidi allantoin, karbondioksit ve hidrojen peroksit katalizler. Bu enzim pürin metabolik yolunda hayati önem taşır. Ürik asit antioksidan özelliklere sahiptir ve plazmada önemli bir antioksidan olduğu öne sürülmüştür. Ürik asidin parçalanması ile oluşan allantoin ürik aside göre beş ile on kat daha fazla çözünürdür ve böbreklerden çok daha hızlı süzülerek vücuttan atılır. Ürik asidin kandaki oranının aşırı yükselmesi hiperürisemi, idrarda ürik asit miktarının yüksek olması hiperürikosuri olarak adlandırılır ve ağırlı bir eklem hastalığı olan gut ile böbrek yetmezliğine yol açabilir. Ürik asidin kan serumunda ki normal konsantrasyonu yetişkin erkeklerde 7.0 mg/dL'den yetişkin kadınlarda ise 6.8 mg/dL'den az olmalıdır. Ürik asit; hipertansiyon, vasküler hastalık ve böbrek hastalıklarının gelişiminde patojen bir role sahip olabilir. Ürikaz enzimi; kan ve serumdaki ürik asit konsantrasyonlarının saptanması, immobilize edilmiş formunda biyosensör olarak kullanılması gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi birçok canlı grubu ürikaz enzimi üretme yeteneğine sahiptir fakat mikrobiyal kaynaklardan elde edilen ürikazın yüksek miktarlarda üretilebilmesi, optimizasyonunun kolay olması üretim maliyetinin uygun olması gibi avantajları vardır. Kuşların dışkıları ürik asit bakımından zengin olduğundan kanatlı atıkları mikrobiyalizasyon için ideal bir kaynaktır. Kanatlı dışkıları % 63 ile %

87 oranında ürik asit içerir ki buda aerobik bakteriler tarafından kullanılan tek azot kaynağıdır (Raval ve ark., 2016).

Pürinler nükleik asitlerin yapısına katılan önemli organik bileşiklerdir. Pürin bazları adenin, guanin, ksantin ve hipoksantindir. Adenin ve guanin DNA ve RNA'nın yapısında bulunur. Hipoksantin ve ksantin nükleik asit yapısında yer almazlar; ancak pürin nükleotitlerinin sentez ve yıkımında önemli ara ürünlerdir. Pürin nükleotitleri, kendisini oluşturan bileşenlerin sırasıyla ayrılması sonucu yıkılır. İnsanlarda pürinlerin katabolizması sonucu oluşan son ürün 'ürik asit'tir. Primatların dışındaki memelilerde ürik asit allantoin'e yükseltgenir. Allantoin ise bazı memelilerde üre hatta amonyağa kadar parçalanabilir. İnsanlarda 1 nolukromozom üzerinde bulunan urat oksidaz (ürikaz) geni iki non-sense mutasyon sonucunda etkisizdir. Ürik oksidaz aktivitesinin olmaması evrim basamağında geri adım olarak görülse de yüksek ürik asit konsantrasyonu veya azalan urat oksidaz aktivitesi insana önemli avantajlar sağlamaktadır (Wu ve ark., 1992).

İnsan vücudunda oluşan ürik asidin 2/3'lük kısmı idrarla atılır (Wright, 1995). Geri kalan miktarı gastrointestinal sistemden elimine edilir. Ürik asidin % 98'i plazmada sodyum-urat şeklinde serbest olarak dolaşır ve glomerüler filtrasyona tabidir; % 5'ten azı da proteine bağlıdır (Roch, 1999).

İnsanlarda ürikaz enziminin kan plazmasındaki seviyesi, yaşam boyunca farklılıklar gösterir, 36-38 haftalık gelişimini tamamlamış bebeklerde 310 µM iken, bu oran birkaç gün içerisinde 140 µM seviyesine iner. İlerleyen yıllarda seviye cinsiyet ayırımı gözetmeksizin artar ve ergen erkek bireylerde daha yüksek bulunur. Biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı bazı hastalıkların teşhisinde önem taşımaktadır (Bhargava, 1999). Bu hastalıklar gut hastalığı, böbrek hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu ve organik asidemi gibi hastalıklardır. Ayrıca ürik asit kuvvetli bir antioksidandır. Bu özelliği sayesinde ürik asit oksijen radikallerini yok eder ve başta lipid peroksidasyonu olmak üzere doku hasarlarını önlemede önemli rol oynar (Hiteman, 1996).

Ürikaz enzimi klinikte sadece teşhis enzimi olmayıp, aynı zamanda ürik asit metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak meydana gelen hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ürikaz, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında yer almıştır. Ayrıca ürikaz enzimi, kozmetik alanında saç boyama ve dalgalandırmada işlemlerinde kullanılır (Nakagava ve ark., 1995). Son yıllarda yapılan pek çok

çalışmalarda ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır (Kan ve ark., 1996; Miland ve ark., 1996; Hasebe ve ark., 1998; Nakanimani ve ark., 1999).

1.3. Araştırma Alanının Tanıtımı

Dünya genelinde, çeşitli kıtalara yayılmış farklı büyüklüklerde birçok soda gölü mevcuttur. Soda gölleri arasında Magadi Gölü, Van Gölü, Büyük Soda Gölü ve Mono Gölü en fazla bilinen göllerdir (Grant, 2004).

Soda Gölleri, dışarıya drenajı olmayan kapalı göllerdir. Bu göllerin su kimyasındaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının eksikliği ve CO_3^{-2} ve Cl^{-} iyonlarının fazlalığı sebebiyle pH oranları 9-12 arasında değişmektedir (Jones ve ark., 1998).

Kempe ve ark. (1991), tarafından bildirildiğine göre, Van Gölü; 1648 m rakıma sahip olup, $576 km^3$ 'lük hacmi, $3.522 km^2$ 'lik alanı ve 450 m derinliğiyle dünyanın en büyük dördüncü kapalı gölü ve aynı zamanda en büyük soda gölüdür. Göl suyunun pH'sı 9.7-9.8 arasında değişmektedir. NaCl, sodyum karbonat, sülfat, potasyum ve magnezyum içeren gölün tuzluluk oranı % 21.7'dir. Ancak kalsiyum oranı oldukça düşüktür (4.6 mg/l).

Soda göllerinde yayılış gösteren, haloalkalofilik bakteriler tuz stresine iki farklı strateji ile cevap verirler. Bu stratejilerden biri tuz biriktirme stratejisidir. Bu bakteriler artan Na^{+} konsantrasyonuna karşı sitoplazmalarında K^{+} iyonunu biriktirirler. İkinci strateji de ise sitoplazmada hücre içi osmotik basıncı yükselten tuz hariç osmolit sentezi veya biriktirilmesi stratejisidir. glisinbetain, ektoin, diğer amino asit türevleri, şekerler ve polioller hücre içi osmotik basıncın yükselmesine yardımcı olur (Boltysanskaya ve ark., 2005). Alkalofilik bakteriler, yüksek alkali pH'ya, proton motive güçten elde edilen ATP enerjisini kullanarak Na^{+}/H^{+} iyonlarının ters taşınması ile adaptasyon gösterirler (Ulukanlı ve Dığrak, 2002).

1.4. Halomanas Genusunun Özellikleri

Halomonadaceae ailesi, 16S rRNA gen dizisi analizine göre Gammaproteobacteria içerisinde ayrı bir filogenetik soy oluşturur ve çoğunlukla halofilik bakterilerden oluşur. 1988'de kuruluşundan bu yana (Franzmann ve ark., 1988) ailenin taksonomisi sürekli revize edilmiştir.

Arahal ve ark. (2002), *Halomonadaceae* ailesi türlerinin filogenisini, 23S ve 16S rRNA genlerinin karşılaştırmalı sekans analizini kullanarak o sırada geçerli olarak yayınlanmış (toplam 25) bir çalışma yürüttü. O zamandan bu yana, 49 yeni tür tanımlanmış ve bazı vakalarda filogenetik ilişkileri açık bir şekilde ortaya konmamıştır.

Halomonadaceae familyasındaki 23S rRNA gen dizisinin çözünürlüğü genel olarak 16S rRNA sekansının çözünürlüğünden daha büyük olmasına rağmen, çok yakından ilişkili türlerin filogenetik ilişkilerinin çözülmesine hala izin vermediğini buldu. Dahası, bu aile içindeki cins ve tür sayısının sürekli ve hızlı bir şekilde artması onu daha da karmaşık hale getirmektedir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, çok odağa dayalı sıralama analizi (MLSA) ile sonuçlanan daha fazla oda temizleme genlerinin dahil edilmesi, bu heterojen ailenin üyeleri arasındaki filogenetik ilişkileri açıklığa kavuşturmaya yardımcı olabilir.

16S rRNA geni, işlevsel olarak stabil, yüksek oranda korunmuş ve horizontal gen transferinden uzak olduğu için taksonomik çalışmalar için etkili bir moleküler işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Arke ve bakterilerde gözlemlenen 16S rRNA gen sekansı varyasyonu, prokaryotların sınıflandırılması için omurga olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, 16S rRNA geninin filogenetik analizi çeşitli taksonomik düzeylerde bakteriyel izolatların sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Ramasamy ve ark., 2014).

Prokaryotik tür tanımına göre, bir izolatın yeni bir tür olması için % 3 ve üzeri 16S rRNA gen bölgesi nükleotit farklılığına sahip olması ya da % 70'in altında DNA-DNA homoloji değeri vermesi, bunu belirli derecede fenotipik farklılıklar ile desteklemesi gerekmektedir (Vandamme ve ark., 1996; Coenye ve ark., 2005).

Ribozomal RNA genleri, universal ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunmuş yapıya sahip olduğu için filogenetik çalışmalarda en iyi sonuç veren hedef yapılarıdır (Woose, 1987). Modern mikrobiyal taksonomide filogenetik ilişkileri belirlemede en çok tercih edilen 16S ve 23S rRNA gen dizilerinin dışında tür içi sıkı ilişkileri çözümleme de Ad Hoc komite tarafından önerilen diğer protein kodlayan gen bölgelerinin de (en az üç ya da dört gen bölgesinde *rpoB*, *recA*, *rpoD* ve *gyrB*) analizlerinin yapılması gerekmektedir (Coenye ve LiPuma, 2002; Romanenko ve ark., 2002)

Bu araştırmada, Van Gölü'nün bazı bölgelerinden toplanan su ve sediment örneklerinden izole edilen bakterilerin, L-asparaginaz ve ürikaz enzimi yönünden taranması hedeflenmiştir. İlave olarak izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri belirlenerek 16S rDNA analizine dayalı teşhislerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

L-asparaginaz enzimi; çocukluk çağında görülen akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde kullanılan önemli bir ajandır. Ayrıca besin endüstrisinde akrilamid oluşumunu engellemek amacı kullanılırken biyosensör yapımında da kullanılmaktadır. Bunlardan dolayı L-asparaginaz ile yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır.

Ghoshoon ve ark. (2008), İran'ın Shiraz bölgesindeki atık suların ve Khoshk nehrinden topladıkları numunelerden ve Namazi Hastanesinden sağladıkları klinik örneklerden izole ettikleri *E.coli* izolatlarının L-asparaginaz enzimi ürettiğini belirlediler. Farklı karbon kaynakları kullanarak L-asparaginaz enziminin optimizasyonunu gerçekleştirdiler.

Gupta ve ark. (2009), Bu çalışmayı daha önce Orissa sahilinin Bhitarkanika mangrove ormanlarından izole edilen *Streptomyces* mikroorganizması ile yaptılar. *Streptomyces*'lerin % 56.75'i L-asparaginaz aktivitesi gösterdi. Tüm izolatların L-asparaginaz üretimi açısından birbirinden farklı olduğunu bildirdiler. 74 izolat arasında 27 *Streptomyces* cinsinin L-asparaginaz aktivitesi gösterdiğini tespit ettiler.

Saleem ve ark. (2009), Hindistan'ın Tamilnadu ve Kerala bölgesinin farklı alanlarından 20 deniz sediment örneği topladılar, buradan izole ettikleri mikroorganizmaların L-asparaginaz üretilmediğini test ettiler. Bu örneklerin 10 tanesi besiyeri ortamında çoğalma gösterdi ve bunların *Streptomyces*'lere ait olduğunu saptadılar. Bu örneklerden de 3 tanesinin L-asparaginaz ürettiğini tespit ettiler. Ayrıca Mg^{+2} iyonunun enzim üretimini aktive ettiğini; Cu^{+2} , Zn^{+2} ve EDTA'nın ise inhibitör etki yaptığını buldular.

Kumar ve ark. (2010), Hindistan'da yaptıkları bir araştırmada Umman Denizi'nin Mumbai sahilinden izole ettikleri, halotolerant *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* AK5 suşunun ekstraselüler enzim (proteaz, amilaz, lipaz, esteraz, glutaminaz, asparaginaz, ksilanaz ve inulinaz) üretme kabiliyetini araştırdılar. AK5 suşunun ürettiği esteraz, asparaginaz ve glutaminaz enzimlerinin çeşitli biyoteknolojik yöntemlerde uygulama potansiyeline sahip olduğunu vurguladılar.

Moorthy ve ark. (2010), Hindistan'ın Belgaluru bölgesinde, 30 cm derinlikten toprak örnekleri aldılar. M9 besiyeri ortamına 2 g L-asparaginaz ve birkaç damla

indikatör boya olan fenol red ilave ettiler ve ekim yaptılar. İzole edilen kolonilere morfolojik ve biyokimyasal testler uygulayarak L-asparaginaz üreten bakterilerin *Bacillus* genusuna ait olduğunu tespit ettiler.

Kumari ve ark. (2011), Hindistan'ın Tamilnadu, Tuticorn bölgesinden deniz sedimenti örnekleri aldılar. İzole edilen 67 *Actinomyces* kolonisinden 32 tanesinin L-asparaginaz enzim aktivitesi gösterdiğini buldular. Morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda L-asparaginaz enzimi aktivitesine sahip cinsin *Streptomyces*'lere ait olduğunu saptadılar. Elektron mikroskobu çalışmaları, 16S rDNA çalışmaları sonucunda *Streptomyces griseoluteus* WS3/1 türünün L-asparaginaz üretiminde enzim aktivitesi yönünden en yüksek suş olduğuna dair ilk raporu sundular.

Dharmaraj (2011), Bu çalışmada; Hindistan'ın Kerala Kovalam kıyısının 5-10 m derinliğinden örnekler aldılar. Deniz süngeri olan *Callyspongia diffusa*'dan L-asparaginaz enzimi üreten *Streptomyces noursei*'yi izole ettiler. Ayrıca; marin aktinomiteslerden özellikle *Streptomices*'lerin L-asparaginaz enzimi açısından potansiyel bir kaynak olabileceğini önerdiler.

Usha ve ark. (2011), Hindistan'ın güneydoğu sahili boyunca yer alan Pitchavaram mangrove ekosisteminden sediment örnekleri aldılar ve marine aktinomisetleri izole ettiler. Aktinomisetlerin en yoğun olduğu bölgenin rizosfer olduğunu belirttiler. İzole edilen izolatların yaklaşık % 38'inin L-asparaginaz ürettiğini belirttiler. *Streptomyces parvulus* KUA106 suşunun yüksek seviyede L-asparaginaz ürettiğini tespit ettiler. L-asparaginaz üretiminde en iyi besiyeri içeriğinin asparajin, tripton, dextroz ve NaCl olduğunu bildirdiler.

Kamble ve ark. (2012), Bu araştırmacılar Hindistan'ın farklı alanlarından (Akola, Akot, Katepurna, Balapur, Dongergaon) su, çiftlik ve tuzlu toprak örneklerinden L-asparaginaz üreten bakterileri araştırdılar. % 1 pepton, % 0.6 et ekstratı, % 0.33 KH_3PO_4 , % 0.1 L-asparajin ve fenol içeren besiyeri kullandılar. Bakterilerin 37 °C, pH 7'de optimal enzim ürettiğini saptadılar. L-asparaginaz enzimi bakımından, *E. coli*, *Aeromonas* ve *Proteus* türlerinin yüksek aktivite gösterdiğini tespit ettiler. Ayrıca; tuzlu topraklardan izole ettikleri *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri ve tarım topraklarından izole ettikleri *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Serratia* türlerinin, L-asparaginaz enzimi ürettiklerini belirlediler.

Jha ve ark. (2012), Farklı alanlardan hastane atıkları ile kontamine edilmiş toprak örnekleri aldılar. 15 toprak izolatu, 12 farklı kültür koleksiyonundan bakteri izolatları aldılar. % 10 toprak süspansiyonu (1 g toprak, 10 ml steril su) hazırladılar. L-asparaginaz üreten kolonileri belirlemek amacı ile Modifiye M9 besiyeri kullandılar. İndikatör boya olarak besiyerine fenol red ilave ettiler. Elde edilen bakteri kültürlerini morfolojik, kültürel ve biyokimyasal olarak araştırdılar. *Bacillus spp.* (ITBHU 01, ITBHU 02), *Proteus spp.* (ITBHU 05), *Pseudomonas* (ITBHU 08) türlerini L-asparaginaz pozitif olarak tespit ettiler.

Upadhyay ve ark. (2012), Bahçe toprağı, kompost ve orman toprağından 103 bakteri izolatu elde ettiler. Bu bakterilerden 49 tanesi M9 besiyeri ortamında L-asparaginaz pozitif olarak sonuç verdi. 5 gün sonunda 10 bakteri izolatının daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini bildirdiler. Çalışmanın sonunda L-asparaginaz enzim aktivitesi yüksek olan izolatu *Aspergillus spp.* olduğunu bildirdiler.

Akshatha ve ark. (2013), Bu çalışmada; Hindistan'ın Batı Gat, Shimoga bölgesi ve Karnataka bölgesinden alınan toprak örneklerinden 48 aktinomiset örneğı izole ettiler ve bu örneklerin L-asparaginaz üretilip üretilmediğine baktılar. 5 izolatu enzim aktivitesi gösterirken bunlardan 2 izolatu yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini saptadılar. Bu izolatlar için besiyeri optimizasyon çalışmaları yaptılar. En uygun besiyeri ortamını; % 1 L-asparaginaz, % 1 malt ekstrakt, % 1 yeast ekstrakt, % 1 potasyum nitrat, % 0.1 tuz solüsyonu, pH 8, sıcaklık 27 °C, inkübasyon zamanını 10 gün olduğunu bildirdiler.

Nazemi ve Miri Nargesi (2013), Bu çalışmada ekstraselüler olarak L-asparaginaz enzimi üreten *Bacillus spp.* türlerini araştırdılar. Proteince zengin toprak örneklerinden *Bacillus spp.* izole ettiler, M9 besiyeri ortamında kültürünü yaptılar ve ürettikleri enzimin aktivitesinin yüksek olduğunu bildirdiler.

Makky ve ark. (2013), Bu çalışma; *Bacillus spp.* KK2S4 suşunun L-asparaginaz enzimi üretimi ve optimizasyon çalışmalarını içermektedir. Mısır koçanı atığını substrakt olarak kullanarak 39 bakteri izolatu elde ettiler. *Bacillus sp.* KK2S4 suşunun L-asparaginaz enzim aktivitesi ve protein içeriğinin en yüksek olduğunu bildirdiler. Enzim üretiminin pH 5.0, laktoz ve NaNO₃ varlığında olduğunu tespit ettiler.

Selvam ve Vishnupriya (2013), Güney Hindistan bölgesindeki 10 farklı deniz alanından deniz sedimenti örnekleri aldılar ve 56 aktinomites izole ettiler. *Aspergillus*

terreus, *Vibrio succinogenes*, *Streptomyces noursei* MTCC 10469 türlerinin L-asparaginaz ürettiğini tespit ettiler.

Talluri ve ark. (2013), Bu çalışmada; Hindistan'ın Vishakhapatnam bölgesinde yüzeyden 30-40 cm derinlikten 6 adet toprak örneği aldılar. Seri dilüsyonlar hazırlayıp nutrient agara ekim yaptılar ve saf koloniler elde ettiler. Czapek dox agar kullandılar içerisine 2 g L-Asparagine (1 g/1000 ml) ve % 0.09 (V/V) oranında indikatör boya olan fenol red kattılar. Ekimi yapılan 64 bakteri izolatından 21 tanesinin koloni etrafında pembe zon oluşturduğunu, zon oluşturan bu izolatların Mushburn&Briston metodu ile enzim aktivitelerine bakılarak 7 izolatın enzim aktivitesinin yüksek olduğunu bildirdiler.

Deshpande ve ark. (2014), Hindistan'ın farklı lokasyonlarından nehir sediment örnekleri aldılar. 7 izolatın L-asparaginaz üretilip üretilmediğini araştırdılar. Petri yöntemi ile saf aktinomiset kolonileri elde ettiler. Kusur besiyeri kullandılar ve indikatör olarak fenol red ilave ettiler. Farklı besiyeri ortamlarında *Streptomyces ginsengisoli* tarafından üretilen L-asparaginaz enzim aktivitesini ölçtüler ve enzim üretimini en yüksek Asparajin Dextrose Salt Agar (ADS) besiyerinde olduğunu saptadılar. İnkübasyonun 5. gününde, ağırlıklı olarak hücre dışında, pH. 8, 30 °C'de, karbon kaynağı olarak glikoz, azot kaynağı olarak pepton, 120 rpm enzim üretimi için en uygun koşullar olduğunu saptadılar.

Dhanam Jayam ve Kannan (2014), Mannar Körfezi bölgesinden alınan toprak örneklerinde L-asparaginaz üreten *Streptomyces*'leri araştırdılar. Saflaştırma işleminde nişasta kazein agar ve gliserol asparagin agar (ISP-S besiyeri) kullandılar. Besiyerine bakteri ve fungusların çoğalmasını engellemek için streptomisin ve sikloheksimid ilave ettiler. 22 koloni izole ettiler sadece 5 koloni L-asparaginaz için pozitif sonuç verdi. Koloni etrafında pembe zon oluşumunu L-asparaginaz pozitif olarak değerlendirdiler.

Dhanam Jayam ve Kannan (2015), Hindistan'ın Madurai Kamaraj Üniversitesi kampüsü Termit dağından toprak örnekleri aldılar. 22 koloni izole ettiler sadece 5 koloni L-asparaginaz pozitif sonuç verdi. Bu bakterilerin *Actinomycetes spp.* olduğunu tespit ettiler.

Narasaiah ve ark. (2015), Hindistan'ın Prades, Kandukur bölgesinden aldıkları toprak örneklerinden 10 aktinomiset izole ettiler. L-asparaginaz enziminin *Streptomyces albus* CN-4'den üretimini ve optimizasyonunu yaptılar. Ayrıca bu mikroorganizmanın selüloz, pektinaz, proteaz, lipaz, üreaz, DNaz, nitrat redüktaz ürettiğini tespit ettiler.

Wakil ve Adelegan (2015), Bu çalışmada; Farklı toprak örneklerinden L-asparaginaz üreten bakteri türlerini tespit ettiler. Optimum enzim üretimi için gerekli ortam koşullarını araştırdılar. Farklı bakteri türlerinin farklı pH, sıcaklık, karbon kaynağı ve azot kaynağı varlığında L-asparaginaz üretiminin maximum olduğunu gösterdiler. Buna göre; *Bacillus firmus*; pH 7, 45 °C, glikoz 1 g/L, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt 4 g/L; *Streptococcus spp.* D1; pH 8, 45 °C, mannitol 1 g/L, NaNO₃ 2 g/L; *Streptococcus spp.* D2; pH 8, 25 °C, mannitol 2 g/L, yeast ekstrakt 8 g/L; *Bacillus polymyxa* pH 8, 35 °C, mannitol 4 g/L, kazein 4 g/L; *Bacillus circulans*; pH 6, 45 °C, laktoz 2 g/L, kazein 6 g/L; *Paenibacillus validus*; pH 6, 35 °C, sükröz 3 g/L, KNO₃ 2 g/L besiyeri ortamının enzim üretim aktivitesini artırdığını tespit ettiler.

Bhargavi ve Jayamadhuri (2016), Kerela kıyı (Shangumugham Sahili, Veli Back suyu) bölgesinden 10 cm derinlikten 2 tane deniz suyu örneği aldılar ve 10 bakteri izole ettiler. 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda bir bakteri izolatının yüksek L-asparaginaz enzim aktivitesi gösterdiğinin tespit ettiler. Bu bakteri izolatının *Lactobacillus salivarius* olduğunu bildirdiler.

Raj ve ark. (2016), Hindistan'ın Tamil Nadu bölgesinin farklı lokasyonlarından 10 deniz sedimenti örneği, 9 karasal toprak örneği, 3 deniz suyu, 1 tatlı kaynak su numunesi aldılar. Bu numunelerden 537 bakteri izole ettiler. Bakterilerin L-asparaginaz ve L-glutaminaz üretilip üretilmediğini araştırdılar. Sadece 118 bakteri izolatının enzim aktivitesi gösterdiğini belirttiler.

Rajguru Shubhangi ve Deshmukh Padma (2016), Araştırmacılar; Farklı sucul ve karasal habitatlardan L-asparaginaz üreten bakterileri izole etmek amacı ile örnekler aldılar. Üç farklı sucul habitat, beş farklı karasal habitatından alınan örneklerden 384 bakteri izole ettiler. Bunlardan 211 bakteri izolatının L-asparaginaz ürettiğini gördüler Rapid Plate Semi-Quantitative assay yöntemi ile daha yoğun enzim üreten bakteri kolonilerini gözlemlədiler.

Salimath ve Onkarappa (2016), Hindistan, Karnataka, Agumbe Eyaleti, Batı Ghats bölgesinden toprak örnekleri aldılar ve 25 *Streptomyces* kolonisi izole ettiler. Bu mikroorganizmalardan 23 tanesinin L-asparaginaz ürettiğini tespit ettiler. V17 suşunun enzim üretiminin yüksek olduğunu bildirdiler. Test edilen izolatların % 92'lik kısmından üretilen L-asparaginaz enziminin anti-kanser etki gösterdiğini tespit ettiler.

Thandeeswaran ve ark. (2016), Tamilnadu Tarım Üniversitesi (Coimbatore) çiftliğinden toprak örnekleri aldılar. Bu toprağın kil ve potasyumlu bileşikler yönünden zengin, siyah pamuk yetiştirilen nötral alkali verimli bir toprak olduğunu belirttiler. L-asparaginaz üreten bakterileri izole ettiler enzim aktivitesini ölçtüler.

Ürikaz enzimi; kan ve serumdaki ürik asit konsantrasyonlarının saptanması, immobilize edilmiş formunda biyosensör olarak kullanılması gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Ürikaz enzimi ile ilgili fazla bir çalışma bulunmamaktadır.

Lehejčková ve ark. (1986), Kuş ve kaplumbağa dışkıları bulunan toprak örneklerinden ürikaz enzimi üreten bakteri, maya ve küfleri araştırdılar. *Alternaria spp.*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Candida lipolytica* ve *Candida utilis*'in ürikaz aktivitesi bulunduğunu tespit ettiler.

Azab ve ark. (2005), Bu çalışmada; araştırmacılar *Proteus vulgaris*'in 3 suşunu ((1753, B-317-C ve U7),); *Streptomyces*'lerin de 2 türünü (*Streptomyces graminofaciens* ve *S. albidoflavus*) ürikaz aktivitesi yönünden incelediler ve optimizasyon çalışmaları yaptılar ve çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Proteus vulgaris* U7'nin ürikaz aktivitesi göstermediğini saptadılar.

Zhou ve ark. (2005), Bu çalışmada araştırmacılar; Çin, Zhejiang eyaletinin başkenti Hangzhou şehriden alınan toprak örneklerinde ürikaz üreten bakterileri araştırdılar. İzole ettikleri 40 bakteri kültürü % 8 ürik asit içeren besiyeri ortamında gelişim gösterdi fakat sadece 5 bakteri kültürünün ürikaz enzim aktivitesini yüksek oranda gösterdiğini tespit ettiler. Yaptıkları çalışmalar sonunda *Mikrobakterium* cinsine ait bakterinin yüksek sıcaklığa dayanıklı ürikaz enzimi ürettiğini saptadılar. 70 °C de 30 dakika sıcaklık etkisinde enzim aktivitesinin % 100 olduğu ve 37 °C'de pH 8.5'da borat buffer içerisinde bekletildiğinde enzim aktivitesinin 40 gün boyunca devam ettiğini ayrıca; karbon ve azot kaynağı olarak en iyi sonuç veren maize milk besiyeri ortamı olduğunu saptadılar.

Anderson ve Vijayakumar (2011), *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinden ürikaz enzimini saflaştırdılar ve maximum enzim aktivitesi için gerekli olan ortam koşullarını çalıştılar. *P.aeruginosa* bakterisini kanatlı atıklarından izole ettiler. Ürikaz enzimini % 70 amonyum sülfat konsantrasyonu ile çöktürdüler ve pH 8.5, 35 °C sıcaklığın en uygun koşullar olduğunu belirttiler. Ayrıca; Ca⁺² enzim aktivitesini % 126

arttırırken, Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} nin enzim aktivitesini düşürdüğünü tespit ettiler.

Aly, ve ark. (2013), Suudi Arabistan, Cidde şehrinin farklı alanlarından toprak, atık su, deniz suyu ve kanatlı atıklarından örnekler aldılar. 49 bakteri izolatu elde ettiler. % 0.5 ürik asit içeren besiyeri ortamına ekim yapıp ürikaz üreten bakterileri tespit ettiler. Yapılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler sonucunda *Streptomyces exfoliatus* UR10 suşunun hücre içi ürikaz enzimi ürettiğini ve enzim aktivitesinin yüksek olduğunu bildirdiler

Honarbaksh ve ark. (2014), Bu araştırmada daha önceden tespit edilmeyen ve ticari olmayan ürikaz enzimi üreten kaynakların araştırılmasını hedeflediler. İran'da tuzlu göl ve sulak alanlardan örnekler aldılar. 65 halotolerant bakteri suşu izole ettiler ve bu suşların ürikaz enzimi aktivitesini test ettiler. *Halomonas* ve *Paracoccus* cinsine ait bazı türlerin ürikaz enzimi ürettiğini tespit ettiler

Ghosh ve ark. (2014), Kanatlı çiftliğindeki topraktan izole edilen 6 bakteri suşunun ürikaz aktivitesini çalıştılar. Azot kaynağı olarak sadece ürik asit kullandılar. Bu bakterilerden *Comamonas sp.* BTUA' nın ürik asidi daha hızlı kullandığını buldular. 37 °C, 33 saatte ürik asidin % 99'unu kullandığını tespit ettiler. *Comamonas sp.* BT UA suşunun hücre dışı ürikaz enzimi ürettiğini bildirdiler. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE elektroforezde tek bant oluştuğunu gözlemlədiler (35 Kda). Böylece yüksek duyarlılıkta, stabil ve biyosensör olarak kullanılacak bir enzim elde ettiler.

Nanda ve ark. (2014), Araştırmacılar; Hindistan'ın Karnataka, Mulky bölgesinde bulunan kanatlı çiftliğinden dışkı ve çöp örnekleri aldılar. İzole edilen 3 bakteri türünün extraselüler ürikaz enzimi ürettiğini, fakat bu bakterilerden ürikaz aktivitesi en yüksek olanın *Bacillus cereus* DL3 suşu olduğunu saptadılar. Besiyeri ortamında karboksimetil selülozun en iyi karbon kaynağı; asparaginin ise en iyi azot kaynağı olduğunu tespit ettiler.

Abdullah ve Flayyih (2015), Irak'ın Bağdat şehrindeki farklı hastanelerden 150 klinik örneği (yanık, idrar, kan, balgam, beyin omirilik sıvısı) aldılar. 43 izolatu *Pseudomonas aeroginosa* olarak teşhis ettiler. 38 izolatu ürikaz pozitif sonuç verirken; sadece 5 izolatu ürikaz üretmediğini tespit ettiler. Qualitative ve semi quantitative metod kullanarak ürikaz üretimi üzerinde iki metod arasındaki farkı araştırdılar. Her iki

metodun da aynı sonucu verdiğini fakat; semi quantitative metot da ortama azot ve karbon kaynağı olarak sadece ürik asit eklendiğinden daha duyarlı olduğunu bildirdiler.

El-Naggar (2015), Bu çalışmada; Mısır'ın farklı bölgelerinden aldığı toprak örneklerinden ürikaz üreten *Aktinomyces*'leri nişasta nitrat agar kullanılarak izole etti. Toprakta izole edilen 130 *Aktinomyces* örneğinin enzim aktivitesine baktı. Ürikaz enzimi üreten türleri saptamak amacıyla ürik asit içeren besiyeri hazırladı. Ürikaz üreten kolonilerin etrafında şeffaf bir zon oluştuğunu gözlemledi. Araştırmacı, *Streptomyces rochei* NEAE-25'in ürikaz enzimi aktivitesinin yüksek olduğunu tespit etti ve enzim optimizasyon çalışmaları yaptı. pH 8, inkübasyon zamanı 5 gün, sıcaklık 35 °C olduğunda enzim üretiminin en iyi şekilde olduğunu saptadı.

Ravichandran ve ark. (2015), Hindistan'ın Chidambaram, Tamilnadu bölgesindeki bir ördek çiftliğinden toprak örnekleri aldılar. Bu örneklerden ekstraselüler ürikaz enzimi üreten bir bakteri saflaştırdılar ve 16S rRNA analizi ile bu bakteriyi *Sphingobacterium thalpophilum* olarak teşhis ettiler.

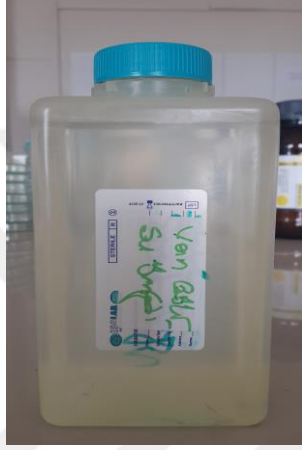
Jagathy ve ark. (2016), Kanatlı çiftliğinden izole ettikleri bakterilerin ürikaz üretme yeteneğini araştırdılar. *Bacillus subtilis*'in iyi bir ürikaz kaynağı olduğunu tespit ettiler. Ayrıca; optimizasyon çalışmaları sonunda pH 7, sıcaklık 30 °C, sükröz % 1 ve pepton % 0.2 ve inkübasyon zamanı 24 saat olduğunda enzim üretiminin maksimum olduğunu bildirdiler.

Raval (2016), Hindistan'ın Manglore kentindeki kanatlı çiftliğinden çöp örnekleri aldılar. Besiyeri olarak ürik asit içeren kanatlı atıklarını kullandılar. Ürikaz pozitif olarak 4 bakteri izolatu elde ettiler. Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonunda bu izolatları; *Comamonas testosteroni* ATCC 11996(T)(SR), *Bacillus flexus* IFO 15715(T)(LR), *Staphylococcus capitis* (SD), *Bacillus aryabhatai* B8W22(T)(LD) olarak teşhis ettiler. Bu türlerden ürikaz enzim üretiminin en yüksek olduğu bakterinin *Comamonas testosteroni* ATCC 11996(T)(SR) olduğunu bildirdiler ve enzim üretimi için optimizasyon çalışmaları yaptılar.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmanın materyalini, Ağustos 2016 tarihinde Van Gölü'nden sağlanan sediment ve su örnekleri oluşturdu. Numuneler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi sahilinden açıktan alındı.



Şekil 3.1. Su örnekleri.



Şekil 3.2. Sediment örnekleri.

3.1.1. Alkalifilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerleri

3.1.1.1. Alkalofil besiyeri

Besiyeri içeriği distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dk süre ile sterilize edildi. Bu besiyeri alkalifilik bakterilerin izolasyonunda kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan çözelti ve boyalar

3.1.2.1. Kristal viyole boyası

Kristal viyole boyası havanda dövüldü. Üzerine 10 ml % 96'lık fenol kristali ve distile su ilave edildi. 24 saat bekletildi ve filtre kağıdından geçirilerek gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.2. Safranin boyası

Safranin etil alkolde çözüldü, distile su ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.3. Lügol çözeltisi

Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.4. Sülfanilik asit çözeltisi

Nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.5. %3'lük H₂O₂ çözeltisi

% 3'lük H₂O₂ çözeltisi katalaz testi için kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.6. Rhodamin B boyası

Rhodamin B (% 0.001'lik) boyası lipaz testinin belirlenmesinde kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.2. Yöntem

3.2.1. Su ve sediment örneklerinin toplanması

Su ve sediment örnekleri tekne yardımıyla alındı. Van Gölü'ne ait yüzey suyu numuneleri steril şeffaf şişeler kullanılarak toplandı. Sediment örnekleri dip kepçesi kullanılmak suretiyle, steril örnek kapları ile toplandı. Numuneler, soğuk zincir içerisinde laboratuara ulaştırıldı.

3.2.2. Su ve sediment örneklerinden alkalofilik bakterilerin izolasyonu

Bu çalışmada klasik dilüsyon ile yüzeye yayma yöntemi kullanıldı. Steril erlen mayerlerin içerisine 25 gram sediment örneği 225 ml ringer çözeltisi ilave edildi. Böylece 10⁻¹'lik dilüsyonlarımız hazırlanmış oldu. Bu solüsyonlar, sediment kolloidlere tutunmuş olan mikroorganizmaları ayırmak amacı ile 30 dakika çalkalandı. Her bir sediment örneği karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha sonra birim miktarda bulunan bakteri yoğunluğunu azaltmak amacı ile seri dilüsyonlar hazırlandı. Bunun için 10⁻¹'lik dilüsyondan steril mikropipet ile 1 ml alınıp 9 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam tüplere aktarıldı ve tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Bu şekilde 10⁻²'lik seyrelti elde edildi. Aynı şekilde 10⁻³, 10⁻⁴'lük dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyondan 0.1 ml alınıp alkalofil agar içeren petri kaplarına drigalski yardımı ile yayma ekim yapıldı. Her bir dilüsyon için 4 petri kutusuna ekim yapıldı ve 30 °C'de 24-72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılan petri kutularında gelişen koloniler hem çıplak gözle hem de

100x10 ışık mikroskopunda incelendi ve sayımı yapıldı. İnkübasyonu takiben besiyeri üzerinde gelişen bakteriler muhtemel alkalofilik bakteriler olarak değerlendirildi ve bu bakterilerin koloni morfolojileri dikkate alınarak seçimi yapıldı.

3.2.3. Alkalofilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi

Alkalofilik agar besiyerinde gelişen kültürden öze yardımı ile bir koloni alınıp çizgi plak yöntemi ile ekimler yapılarak saf kültürler elde edildi. Stok kültür hazırlamak amacı ile de yatık besiyeri kullanıldı. Saf kültürler % 20'lik gliserol bulunan kriyojenik tüplere bırakılarak -20 °C'de muhafaza edildi (MacFaddin, 2000).

3.2.4. Alkalofilik bakteri suşlarının koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi

İzole edilen suşların koloni morfolojisi özellikleri binoküler mikroskop yardımı ile belirlendi. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için gram boyama yöntemi uygulandı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.2.5. M9 agarda L-asparaginaz enzimi üretiminin belirlenmesi

İzolatların, L-asparaginaz enzimini üretiminin belirlenmesi M9 besiyeri ortamında yapıldı. Bu amaçla hazırlanan besiyerinin pH. 6'ya ayarlandı. İçerisinde % 1 oranında L-asparagin ve fenol kırmızısı bulunan M9 besiyerine izolatlar yoğun bir şekilde ekildi. Petri plakları 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, kolonilerin etrafında kırmızı bir zonun oluşması L-asparaginaz enzimi üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Krishnapura, 2015).

3.2.6. Alkalofil agarda ürikaz enzimi üretiminin belirlenmesi

İçerisinde % 0.5 oranında ürik asit bulunan alkalofil agar plaklarına, izolatlar yoğun bir çizgi halinde ekildi. Petri plakları 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben ekim yapılan alanın etrafında oluşan şeffaf zon ürikaz üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Honarbakhsh ve ark., 2014).

3.2.7. Alkalofilik izolatların identifikasyonu

İzolatların koloni morfolojilerinin, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmesinde standart yöntemler kullanıldı (Benson, 2002). İzolatların cins

seviyesinde identifikasyonu için *Halomonas* türlerinin tip strainlerinin ayrıntılı bir fenotipik karakterizasyonu konulu araştırma referans alındı (Mata ve ark., 2002).

3.2.8. İzolatların gram boyama yöntemi ile boyanması

Gram boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik tuzlu su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup alevde fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatıldı. İki dakika beklendi. Fazla boya dökülerek lügol çözeltisi ilave edilip 1 dakika beklendi. Preparat % 96'lık etil alkol ile 6-10 sn dekolorize edildi. Saf su ile yıkandı. Son olarak safranin boyası ilave edildi. 30 saniye kadar beklenip preparat saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı kullanılarak preparat kurutuldu. Kuruduktan sonra preparatın üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi mor-menekşe görülenler gram pozitif, kırmızı-pembe görülenler gram negatif olarak değerlendirildi (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.2.9. Hareket testi

İçerisinde SIM ortamı bulunan tüplere batırma yöntemiyle platin iğne yardımı ile ekim yapıldı. Tüpler 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Ekim hattının yanı sıra besiyerinin tamamında bulanıklık görülmesi hareket pozitif olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.10. Katalaz testi

Kolonilerin üzerine 100 µl % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Alkalofilik agar üzerinde geliştirilen kolonilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerindeki hidrojen peroksit ile muamele edildi. Koloniler üzerinde köpük oluşması pozitif katalaz reaksiyonu, köpük gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.11. Oksidaz testi

Bu test için Oxoid firmasının üretmiş olduğu Microbact Oxidase Strips MB0266 kiti kullanıldı. Bu kitte bulunan şeritler, bakteri sitokrom oksidaz enziminin tespiti için NNN'N tetrametil-p-fenilen-diamin dihidroklorür ile emprenye edilmiştir. Bakteri içeren solüsyona bırakıldığı zaman mavi renk oluşumu oksidaz pozitif olduğunu göstermektedir.

3.2.12. Voges -proskauer (VP) testi

5 ml'lik alkalofilik besiyerine aktif kültürden öze ile ekim yapıldı. Tüpler etüvde 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 0.6 ml alfa naftol çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. Bunun üzerine 0.2 ml % 40'luk KOH çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. 4 saat sonra sonuçlar değerlendirildi. Vişne çürüğü renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.13. Ornitin dekarboksilaz testi

İçerisinde 5 ml moeller besiyeri bulunan tüpe bakterinin saf kültürü ekildi. Besiyeri ortamına % 1 oranında L-ornitin ilave edildi. Anaerob ortam oluşturmak için tüplerin üzerine 5 ml mineral yağ ilave edildi. Tüpler 30 °C'de 24/72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan mor renk pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.14. Nitrat indirgenmesi testi

Bu test için Biomerioux firmasına ait Nitrate A ve Nitrate B reagentleri kullanıldı. İçerisinde 5'er ml nitrat broth bulunan besiyerlerinin içerisine test edilecek bakterilerin saf ve taze kültüründen steril öze yardımı ile ekim yapıldı. Tüpler 30 °C'de 24/72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda nitrat A ve nitrat B solüsyonlarından 5'er damla damlatıldı. Eğer ki besiyeri ortamında kırmızı renk oluştu ise sonuç nitrat indirgenmesi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.15. Karbonhidrat oksidasyon/fermentasyon testleri

Dehidre fenol red besiyeri 1.5 g/80 ml olacak şekilde saf su içerisinde çözüldü. 4'er ml tüplere bırakılıp 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi. Denenecek şeker 0.5 g/10ml olacak şekilde hazırlandı, filtre ile sterilize edilip hazırlandı. İzolatlar, 4 ml fenol red ve 1 ml denecek şeker bulunan tüplere ekildi. Tüpler 30 °C'de 24/72 saat inkübasyona bırakıldı. Bakterinin şekeri kullanıp kullanmadığı inkübasyon sonucunda besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın renk değiştirmesi ile anlaşıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.2.16. Nişasta hidroliz testi

İçerisinde % 1 oranında çözüner nişasta bulunan alkalofilik agara izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde lügol çözeltisi ilave edildi. Nişastanın hirolize olduğu bölgelerde koloni etrafındaki seffaf bölgeler pozitif nişasta sindirimi, mor bölgeler ise negatif nişasta sindirimi olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.17. Tween 80 hidroliz testi

İçerisinde % 3 oranında Tween 80 bulunan alkalofilik agara izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, petrilerin yüzeyini kapatacak şekilde % 0.001'lik Rhodamin B ilave edildi. Kolonilerin etrafında oluşan zonlar lipaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.18. Kazein hidroliz testi

İçerisinde % 1 oranında kazein bulunan alkalofilik agara, izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinde koloni etrafında oluşan seffaf zon proteaz varlığını gösterdi (Benson, 2002).

3.2.19. Genomik DNA izolasyonu

Bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Chen ve Kuo (1993) tarafından önerilen metod kullanılarak yapıldı.

Metodun uygulanışı aşağıdaki gibidir.

1. Steril, ağzı kapaklı ependorflara 800 µl STE tamponu konularak içerisine 4-5 öze dolusu daha önceden alkalifilik agar besiyerinde geliştirilmiş bakteri bioması ilave edildi.
2. Tüpler 2700 rpm'de vortekslenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Vortekslenen tüpler 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alındı ve pellet üzerine tekrar 800 µl STE tamponu eklenerek 10 dk. 10000 rpm'de santrifüj yapıldı.

4. Santrifüj sonrası oluşan üst faz atılıp pellet üzerine 400 µl STE tamponu ilave edildi. Tamponun pelletle tamamen karışması sağlandı.
5. Tüpler 75 °C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk. inkübe edildi.
6. Su banyosundan çıkartılarak 50 µl % 10'luk SDS ve 2 µl proteinaz K eklenen tüpler 40 °C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0.75-0.8 olacak şekilde 5 M NaCl ve 0.1 hacim % 10 CTAB/0.7 M NaCl eklendi.
8. Tüpler 65 °C'ye ayarlı su banyosunda 10 dk. inkübe edildi.
9. Eşit hacimde 24:1 kloroform : izoamilalkol ilave edilen tüpler 10 dk. oda sıcaklığında hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldı.
10. Tüpler 16000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarıldı. Her bir tüpe 0.1 hacim % 10 CTAB/0.7 M NaCl ilave edildi.
11. 65 °C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 10 dk. bekletildi.
12. Tüplere eşit hacimde 25 : 24 : 1 fenol : kloroform : izoamilalkol eklendi ve tüpler 10–20 dk. oda sıcaklığında, hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı.
13. Tüpler 16000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan üst faz yeni steril bir ependorfa alındı ve üzerine eşit hacimde 24 : 1 kloroform : izoamilalkol eklendi.
14. Hafif şekilde tüpler 10 dk. karıştırıldı.
15. Üst faz tekrar yeni steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 0.8 hacim isopropanol (-20 °C) ilave edilerek tüpler -20 °C'de bir gece bekletildi.
16. Daha sonra tüpler 16000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
17. Her bir suş için steril ependorf tüplerine % 70'lik etil alkolden 100 µl konuldu. Pipetin yardımıyla DNA bu tüplerde yıkandı.
18. Tekrar 16000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
19. Kalan etil alkolün uçması ve DNA'nın kuruması için DNA'lar şeffaf bir görünüm alana kadar oda sıcaklığında bekletildi.
20. Elde edilen DNA miktarına göre steril ependorf tüplerine 30-100 µl TE çözeltilisi konuldu.
21. DNA iyice çözüldükten sonra tüplere 2 µl RNAz ilave edildi.
22. 2-3 sn. santrifüj edilen tüpler 37 °C'de 30 dk. bekletildi.
23. Sonra tüpler etiketlenerek +4 °C'de muhafaza edildi.

DNA numuneleri, izolasyon işleminin sonunda agaroz jel elektroforeze koşturularak kontrol edildi. İzole edilen DNA numunelerinin agaroz jelde görünür hale gelmesi için jel içerisine floresans özellik gösteren etidyum bromid boyası ilave edildi. Etidyum bromid çift zincirli DNA'nın baz çiftlerine bağlanarak 254 veya 312 nm dalga boyunda UV transillüminatörde kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik DNA izole edilmiş ise UV transillüminatör üzerinde agaroz jelde bantların görünmesini sağlar. Bunun için 0.4 g (% 1) agaroz 40 ml 1X TBE tamponu bulunan 100 ml'lik erlene ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra mikro dalga fırın yardımıyla tamamen agarozun erimesi sağlandı ve ortalama 60 °C'ye soğuyunca içerisine 6 µl etidyum bromid (10 mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldı.

Elektroforez tablası düz bir zemine yerleştirildikten sonra jel solüsyonu hava kabarcığı oluşturulmadan döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Agarozun donmasından sonra tarak çıkarıldı (15-20 dk) ve içinde 1X TBE pH. 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA numunesinden 10 µl ve 8 µl yükleme boyası (Brom Fenol Mavis) ile birlikte toplam 18 µl olarak yüklendi. Agaroz jel 100 voltta ortalama 20 dk elektroforez edildi ve UV transillüminatör'de gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.20. 16S rRNA'nın PZR amplifikasyonu

16S rRNA'nın polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0.2 ml'lik PZR tüplerinde Termal Cyclers (MyGenie-96 Gradient Thermal Cyclers, Korea)'da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primerler (27f : 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' ve 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT) kullanıldı. PZR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar steril ddH₂O ile hazırlandı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril ependorf tüplere bölündü kullanıma kadar -20 °C'de saklandı.

Hazırlık:

1. Primer stoklar (10 µM)
27f (forward primer: 16S rDNA'nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

1492R (reverse primer: 16S rDNA'nın son bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

2. ThermoScientific PCR Master Mix (2X) (Katalog No:0172)
3. DNA (50-100 ng)
4. ddH₂O

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar.

ThermoScientific PCR Master Mix (2X)	25 µl
27f	6 µl
1492R	6 µl
DNA	6 µl
ddH ₂ O	7 µl
Toplam Hacim	50 µl

Uygulama:

1. Reaksiyon karışımı 1.5 ml'lik PZR tüplerinde her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı ve daha sonra 0.2 ml'lik PZR tüplerine buz üzerinde 22 µl transfer edildi.
2. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DNA örnekleri 3 µl olacak şekilde steril 0.2 ml'lik PZR tüplerinin içerisine transfer edildi. DNA örneklerinin eklenen miktarı toplam hacimi 25 µl yaptı.
3. Transfer işleminden hemen sonra PZR reaksiyonu (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea) Çizelge 3.5'deki şartlarda başlatıldı.
4. 3 µl PZR ürünü, % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları.

Denatürasyon	Amplifikasyon			Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Uzama	
95 °C	95 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
10 dk	00:25 dk	00:25 dk	1 dk	5 dk	----
1 döngü	30 döngü			1 Döngü	

Purifikasyon kiti ile PCR sonrası saflaştırma işlemi (ROCHE'un High Pure PCR Product)

1. 50 µl.lik PCR ürününün üzerine 250 µl “Binding Buffer” koyulur, iyice karıştırılır.
2. Filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirilir.
3. Örnek filtreli tüpe koyulur.
4. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
5. Aşağıya geçen sıvı atılır.
6. 500 µl “Wash Buffer” eklenir.
7. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
8. Aşağıya geçen sıvıyı atılır
9. 200 µl “Wash Buffer” eklenir.
10. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
11. Toplam tüpü atılır ve filtreli tüp 1.5 ml.lik temiz bir tüpe yerleştirilir.
12. 30 µl “Elution Buffer” eklenir.
13. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
14. Aşağıya geçen DNA örneğimizdir.

Dizileme reaksiyonu

Örnekleriniz ABI Prizm 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizileme işlemi BMLabosis firmasına hizmet alımı olarak yaptırılmıştır.

3.2.21. 16S rRNA gen bölgesinin analizi

16S rRNA bölgesi dizileme işleminden sonra gelen ab1 dosyaları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programı ile her suş için kromatogramlar tek tek incelendi ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani ‘N’ kodlu birkaç baz) genellikle sekans başları ve sonlarındaki bölgelerinde kesilerek uzaklaştırıldı ve contigler oluşturuldu. Tüm izolatların 16S rDNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. NCBI’da blast yapılarak her suşa yakın türlerin access kodları alındı. Hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi. Mega7 programı ile bu dizilemesi yapılan suşlar ve Gen Banktaki suşların fasta formatları programa çağrıldı. Daha sonra Clustal W yapılarak korunmuş bölgeler

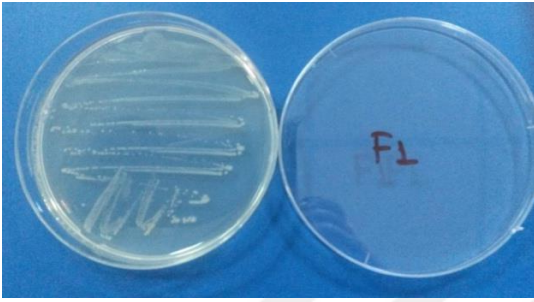
kıyaslandı. Bu işlemin ardından Mega7 programındaki bu dosya fasta şeklinde kaydedildi. Bu işlemde sonra Mega 7.0.18 paket programı ile Maksimum Olabilirlik algoritması seçilerek Jukes ve Cantor'un uzaklık matrisi ile filogenik ağaçlar oluşturuldu.



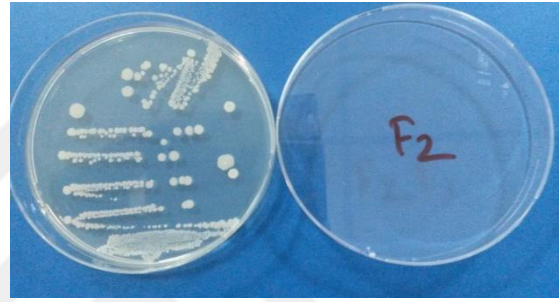
4. BULGULAR

4.1. Alkalifilik İzolatların Saf Kültürleri

Alkalofil agar besiyerinde gelişen karışık kültürden steril alkalofilik agar besiyerlerine öze yardımıyla çizgi plak yöntemi ile ekimler yapıldı. Karışık kültürlerden saf kültür elde edildi. Saf kültürler, %20'lik gliserol solüsyonunda -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 4.1. F1 izolatına ait saf kültür.



Şekil 4.2. F2 izolatına ait saf kültür.

F1 izolatı ürikaz enzimi yönünden pozitif özellik gösterirken, F2 izolatı L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif özellik gösterdi (Şekil 4.3.;Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. F1 izolatı tarafından ürikaz üretimi.



Şekil 4.4. M9 ortamında F2 izolatu tarafından L-asparaginaz üretimi.

4.2. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Van Gölü'nden alınan su ve sediment örneklerinden, ürikaz ve L-asparaginaz üreten iki farklı bakteri izolatu elde edildi. Bu izolatların koloni morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu tespit edildi. Her iki izolatu da gram negatif özellikte olduğu belirlendi.

İzole edilen izolatlar F1 (Firdevs 1) ve F2 (Firdevs 2) olarak adlandırıldı. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. İndol, oksidaz, katalaz, kazein, tween80 hidrolizi, nişasta hidrolizi, nitrat redüksiyonu, Voges Proskauer (VP), L-asparaginaz aktivitesi, ürikaz aktivitesi ve bazı şekerlerin kullanımı ile ilgili biyokimyasal özellikleri tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. F1 ve F2 izolatlarının biyokimyasal özellikleri

Özellik	F1 izolatu	F2 İzolatu
Koloni çapı	3mm	3mm
Pigmentasyon	Krem	Beyaz
Hücre şekli	çomak	Çomak
Gram reaksiyonu	-	-
Oksidaz testi	+	+
Katalaz testi	+	+
Nitrat redüksiyonu	-	-
İndol testi	-	-
Voges-Proskauer (VP)	-	+
Lizin dekarboksilaz	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-
ONPG	-	-
Jelatin	-	-
H ₂ S	+	+
Üre	-	+

Çizelge 4.1. F1 ve F2 izolatlarının biyokimyasal özellikleri (devam)

Mannitol	-	+
Arabinoz	-	+
Laktoz	-	+
Glikoz	-	+
Sükroz	-	+
Mannoz	-	+
Maltoz	-	+
Trehaloz	-	+
Sukroz	-	+
Dextroz	-	+
Fruktoz	-	+
Tween 80 hidrolizi	-	+
Skim milk hidrolizi	-	+
Nişasta hidrolizi	-	+
Asparaginaz enzim aktivitesi	-	+
Ürikaz enzim aktivitesi	+	-

Her iki izolatin nitrat indirgemesi yönünden negatif olduğu görüldü. F1 ve F2 izolatlarının oksidaz ve katalaz pozitif olduğu belirlendi.



Şekil 4.5. Oksidaz testi.



Şekil 4.6. Nitrat redüksiyon testi.

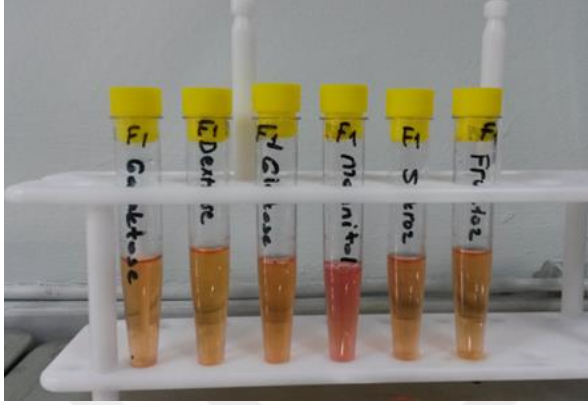


Şekil 4.7. F1 izolatına ait katalaz testi.

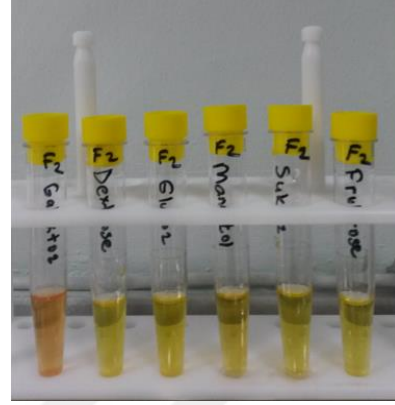


Şekil 4.8. F2 izolatına ait katalaz testi.

F2 izolatu laktoz, fruktoz, sukroz, mannitol, glukoz, dextroz, galaktoz arabinoz, trehaloz, mannoz ve maltoz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanırken; F1 izolatının bu şekerleri karbon kaynağı olarak kullanmadığı belirlendi.



Şekil 4.9. F1 izolatına ait KH fermantasyon testleri.

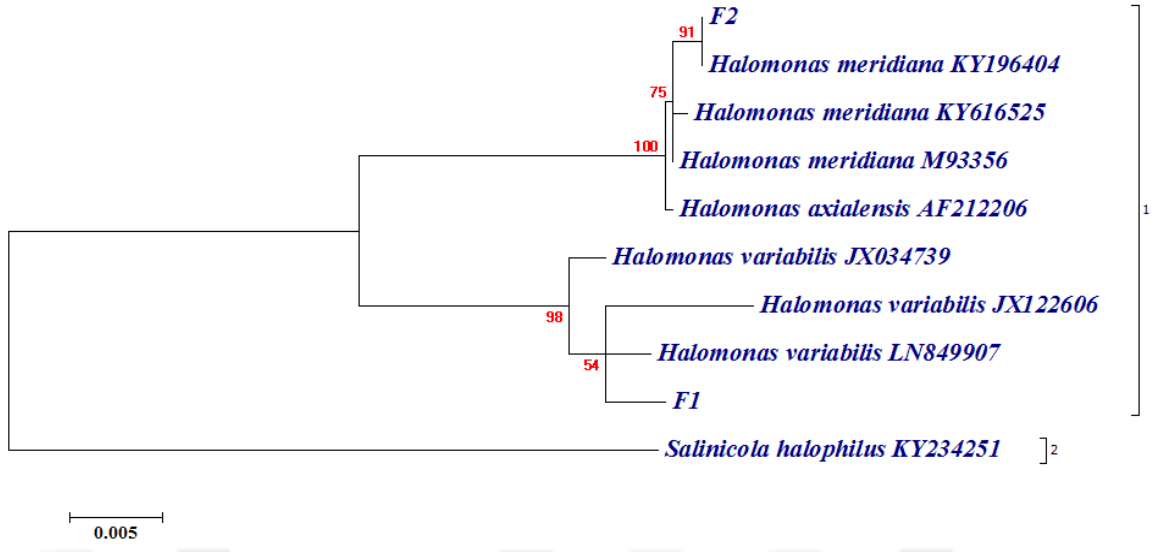


Şekil 4.10. F2 izolatına ait KH fermantasyon testleri.

4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

F1 ve F2 izolatlarına ait 16S rRNA dizisinin belirlenmesi amacı ile 27F ve 1492R evrensel primerleri kullanılmıştır. Sekans cihazından alınan ham data Codon Code Aligner V.6.0.2 programı kullanılarak düzenlenmiş, birleştirilerek sonuç (consensus) dizisine ulaşılmıştır. Benzerlik araştırması NCBI veritabanlarında bulunan Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) programı kullanılarak yapılmıştır. İzolatların filogenetik ağaçta yer alan Halomonas cinsi bakteriler ile % 99 üzerinde benzerlik gösterdiği ve aynı küme içinde bulunduğu belirlenmiştir. Dış grup olarak Halomonadaceae familyası üyesi olan *Salinicola halophilus* cinsi seçilmiştir.

İzolatların filogenetik pozisyonunu belirlemek amacı ile referans Halomonas türlerinin 16S rDNA dizileri ile karşılaştırmalı olarak Şekil: 4.11.'te verilen filogenetik ağaç, Maximum Likelihood algoritması kullanılarak Jukes-Cantor metodu ile Mega 7 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen sekans analiz sonucunda 2 izolatın Halomonas üyelerine % 99 üzerinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre F1 ve F2 izolatu için 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış olup, bunlar arasında yaklaşık 100 tanesi ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla kullanılmaktadır (Zeman ve Mcree, 1985).

Enzim üreten mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981).

Soda gölleri doğal olarak oluşan aşırı alkalik ortamlardır, pH değerleri genellikle 10'un üzerinde olup 12'ye kadar da ulaşabilir ve büyük miktarda Na_2CO_3 varlığı ile karakterize edilirler (Duckworth ve ark., 1996; Grant, 2006). Soda göllerinin yüksek pH, tuzluluk ve yüksek verimliliğe sahip olmasından dolayı diğer su ekosistemlerinden farklıdır (Dudhagara ve ark., 2015). Soda göllerindeki mikroorganizmalar yüksek pH ve tuzluluk derecelerinde enzim üretme yeteneğine sahip oldukları için biyoteknolojik öneme sahiptirler (Dudhagara ve ark., 2015).

Van Gölü, Dünya üzerindeki dördüncü en büyük su kütlesidir (hacim 607 km^3 , alan 3570 km^2 , maksimum derinlik 450 m, göl seviyesi deniz seviyesinden 1648 m yüksekliktedir). pH oranı 9.7-9.8 ve tuzluluk oranı % 21.7 olan yeryüzündeki en büyük soda gölü olarak da bilinir (Berber ve Yenidünya, 2005). Van Gölü, dünyadaki bilinen en büyük mikrobiyalitleri barındırır (Kempe ve ark., 1991).

Bu araştırmada Van Gölünden alınan su ve sediment örneklerinden ekstraselüler hidrolitik enzim üreten L-asparaginaz ve ürikaz enzim aktivitesi bulunan bakterilerin tespit edilmesi amaçlandı. İzole edilen bakterilere morfolojik, biyokimyasal, ekstraselüler hidrolitik enzim ve 16S rDNA analizine dayalı teşhis çalışmaları yapılarak 2 bakteri izole edildi ve bu bakterilere 31 farklı fenotipik ve biyokimyasal testler

uygulandı. 16S rDNA dizi analizleri yapılarak karakterize edildi ve 16S rDNA genlerinin nükleotid dizileri belirlenerek analiz edilen türlerin filogenetik dendogramları oluşturuldu.

Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda ürikaz ve L-asparaginaz aktivitesi bulunan iki bakteri izolatu elde edildi. Daha sonra bu bakterileri teşhis etmek amacı ile morfolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA dizilişlerine göre testler uygulandı. İlk olarak izolatlar Gram boyama metoduna göre boyandılar ve her iki izolat ta (F1 ve F2 izolatları) Gram (-) olarak belirlendi. İzolatların her ikisi nitrat redüksiyonu negatif bulunurken; oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif bulunmuştur.

Çalışmamız da F1 izolatu ürikaz aktivitesi gösterirken; F2 izolatu L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. F1 izolatının ürikaz aktivitesi gösterdiği, alkalofilik agara ekimi yapılan bakteri kültürünün etrafında şeffaf bir zon oluşturması ile tespit edildi. F2 izolatının L-asparaginaz aktivitesi, M9 besiyeri ortamına ilave edilen fenol red indikatör boyasının ortamın pH değişimine bağlı olarak renk değiştirmesi esasına göre belirlendi. L-asparaginaz; L-asparajin amino asidini L-aspartik ve amonyağa hidroliz eder. Bu reaksiyon sonucunda ortam alkaliye dönüştüğü için açık sarı renk olan ortam pembe bir hal alır.

F1 (ürikaz +) izolatının blast sonucu % 99 *Halomonas variabilis* olarak bulunmuştur ve bizim çalışmamız daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu suş için Mata ve ark. (2002), yapmış olduğu çalışmadaki sonuçlar ile bizim çalışmamızdaki sonuçlar büyük oranda paralellik göstermiştir. Honarbakhsh ve ark. (2014) yılında yaptıkları çalışmada *Halomonas* ve *Paracoccus* cinsine ait bazı türlerin ürikaz enzimi ürettiğini tespit etmişlerdir. Bunun dışında *Halomonas*'larla yapılmış başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Zhou ve ark. (2005) *mikrobakterium*'ların; Anderson ve Vijayakumar (2011) *Pseudomonas aeruginosa*'nın; Aly ve ark. (2013) *Streptomyces exfoliatus* UR10 suşunun; Nanda P. ve ark. (2014) *Bacillus cereus*'un; Azab, E. A. ve ark. (2005) *Proteus vulgaris*'in 3 suşunu (1753, B-317-C ve U7) ve *Streptomyces*'lerin de 2 türünün (*Streptomyces graminofaciens* ve *S. albidoflavus*) daha önceki çalışmalarda ürikaz aktivitesi gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

F2 (L-asparaginaz +) izolatının blast sonucu % 99 *Halomonas meridiana* olarak bulunmuştur. Arahal ve ark. (2002), yapmış olduğu çalışmada bu suşun VP test sonucunu negatif olarak gösterirken bizim çalışmamızda sonuç pozitif olarak

belirlenmiştir. Ayrıca ornitin dekarboksilaz testi Arahal ve ark. (2002) yaptıkları çalışmalarda pozitif bulunmuşken; bizim çalışmamızda negatif olarak bulunmuştur. *Halomonas* grubunun L-asparaginaz üretimine dair daha önce yapılan çalışmalar mevcuttur. Ebrahiminezhad ve ark. (2011)'de aşırı duyarlı hastalar için halofilik bir bakteri olan *Bacillus spp.* BCSS 034 suşunun intraselüler ve ekstraselüler L-asparaginaz enzimi ürettiğini belirtmişlerdir. Asad ve ark. (2016), yılında yaptıkları çalışmada yine halofilik mikroorganizmalardan *Bacillus* ve *Salicola* genusuna ait mikroorganizmaların ekstraselüler L-asparaginaz ürettiğini; Barati ve ark. (2016) halofilik bakterilerden *Halomonas* ve *Aidingimonas* cinsine ait bakterilerin potansiyel bir L-asparaginaz üreticisi olduğunu; Luhana ve ark. (2016) halofilik bakterilerden 3 izolatin L-asparaginaz ürettiğine dair çalışmalar bildirmişlerdir. *Bacillus* türlerinin asparaginaz ürettiğine dair oldukça çok çalışma bulunmaktadır. Jha ve ark. (2012); Nazemi ve Miri Nargesi, (2013); Makky ve ark. (2013) bunlardan bazılarıdır. Ayrıca; Ghoshoon ve ark. (2008)'de *E.coli*'nin; Usha ve ark. (2011)'de *Streptomyces parvulus*'un; Gupta ve ark. (2009); Dharmaraj (2011); Dhanam Jayam ve Kannan (2014) *Streptomyces*'lerin; Kamble ve ark. (2012) *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*'lerin asparaginaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Fakat *Halomonas meridiana*'nın L-asparaginaz ürettiğine dair her hangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Alkalifiller; haloalkalifiller ve alkalifiller olmak üzere iki fizyolojik gruptan oluşurlar. Alkalifiller 9 ve üstü pH'larda büyüme gösterirler; optimum büyüme pH'ları ise 10 ve üstüdür. Haloalkalifiller ise ortamlarında hem 9 ve üstü pH isterler hem de yüksek tuzluluk oranına sahip ortamları tercih ederler. Alkalifiller özellikle nötral ortamlardan bazen de asidik toprak ve dışkıdan izole edilebilirler. Haloalkalifiller ise özellikle aşırı alkali tuzlu ortamlardan izole edilirler. Rift vadisi, Doğu Afrika gölleri gibi (Horikoski, 1999).

Halomonadaceae ailesi, 16S rRNA gen dizisi analizine göre Gammaproteo bakteriler içerisinde ayrı bir filogenetik soy oluşturur ve çoğunlukla halofilik bakterilerden oluşur. 1988'de kuruluşundan bu yana (Franzmann ve ark, 1988) ailenin taksonomisi sürekli revize edilmiştir.

Arahal ve ark. (2002), *Halomonadaceae* ailesi türlerinin filogenisini, 23S ve 16S rRNA genlerinin karşılaştırmalı sekans analizini kullanarak o sırada geçerli olarak

yayınlanmış (toplam 25) bir çalışma yürüttü. O zamandan bu yana, 49 yeni tür tanımlanmış ve bazı vakalarda filogenetik ilişkileri açık bir şekilde ortaya konmamıştır.

Bu çalışmada, L-asparaginaz ve ürikaz pozitif olan 2 izolatın 16S rRNA gen bölgesi 27F ve 1492R primerleri ile çoğaltılmıştır. Bu gen bölgesinin sekans analizi sonuçları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programında tüm nükleotitler elektroferogramlara bakılarak tek tek kontrol edilmiştir. 16S rRNA gen dizileri NCBI'dan elde edilmiş ve izolatların gen dizileriyle birlikte hizalanmıştır. Boşluklar çıkarıldıktan sonra elde edilen dizi filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Bu çalışmada, türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için filogenetik analizlere uygun formatlara getirilmiş 16S rDNA dizileri, Maksimum Likelihood algoritmasına tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda oluşan filogenetik ağaçta *Halomonas* bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Dış grup olarak aynı familyadan olan *Salinicola halophilus* seçilmiştir. *Halomonas* cinsine ait F1 (Ürikaz pozitif), F2 (L-asparaginaz pozitif) izolatlarının ve NCBI'dan alınan gen dizileri alınan izolatların 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerinde; *Halomonas* cinsine 2 izolatın 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerinde; F1 izolatının karşılaştırılan 1113 nükleotitlik bölgede 16 nükleotit farklılığı ve %98.5 benzerlik ile *Halomonas variabilis LN849907*'ye, 18 nükleotit farklılığı ve %98.3 benzerlik ile *Halomonas variabilis JX122606*'ya ve 26 nükleotit farklılığı ve %97.8 *Halomonas variabilis JX034739*'a benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. F2 izolatının karşılaştırılan 1245 nükleotitlik bölgede 9 nükleotit farklılığı ve % 99.2 benzerlik ile *Halomonas meridiana KY196404*'e, 13 nükleotit farklılığı ve % 98.9 benzerlik ile *Halomonas meridiana KY616525*'e ve 16 nükleotit farklılığı ve % 98.7 *Halomonas meridiana M93356*'ya benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Halomonas* cinsi bakterilerin güçlü bir homoloji ile kümelenmeleri ve türlerin de kendi aralarında kümelenmesi çalışmamızın güvenilir olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak;

Bu tezde, F1 izolatı *Halomonas variabilis*, F2 izolatı ise *Halomonas meridiana* olarak teşhis edilip ekstraselüler hidrolitik enzim aktivitelerine bakılmıştır. Elde edilen ilk sonuçlar ile bakterilerden endüstriyel kullanım potansiyeli olan enzimler elde edilmiştir. F1 izolatı ürikaz aktivitesi gösterirken; F2 izolatı L-asparaginaz, nişasta, proteaz ve lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki enzim de tıpta teşhis ve tedavi amaçlı kullanıldığı için büyük önem arz etmektedir. Bundan sonraki çalışmalar,

bu enzimlerin karakterizasyonu, optimizasyonu, raf ömrü ve bu özelliklerin iyileştirilmesi konularında araştırmalar yapılarak, mikrobiyal açıdan önemli enzimlerin daha büyük ölçekte üretilmesini sağlamak olmalıdır. Böyle çalışmalarla ülkemizin dışa bağımlılığı azalacak ve ülke ekonomisine önemli katkılarda bulunmuş olunacaktır.



KAYNAKLAR

- Abdullah, S. K., Flayyih, M. T., 2015. Evaluation the uricase produced from different clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by Plate Assay Methods. ***World Journal of Experimental Biosciences*, 3**: 26-29.
- Adrio, J. L., Demain, A. L., 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. ***Biomolecules*, 4**: 117-139
- Akshatha, M. D., Manjunatha, B. K., Divyashree, B. C., 2013. Screening for L - asparaginase producing Actinomycetes from Western Ghats of Karnataka, India. ***Biology*, 3**(3): 1-3.
- Aly, M., Tork, S., Al-Garni, S., Allam, R., 2013. Production and characterization of uricase from *Streptomyces exfoliatus* UR10 isolated from farm wastes. ***Turkish Journal of Biology*, 37**(5): 520-529.
- Anderson, A., Vijayakumar, S., 2011. Purification and optimization of uricase enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa*. ***Journal of Experimental Sciences*, 2**(11): 05-08.
- Arahal, D. R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Ventosa, A., 2002. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52**(1): 241-249.
- Asthana, N., Azmi, W., 2003. Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme. ***Indian Journal of Biotechnology*, 2**: 184-194.
- Azab, E. A., Ali, M. M., Fareed, M. F., 2005. Studies on uricase induction in certain bacteria. ***Egyptian Journal of Biology*, 7**(1).
- Barati, M., Faramarzi, M. A., Nafissi-Varcheh, N., Khoshayand, M. R., Tehrani, M. H. H., Vahidi, H., Adrangi, S., 2016. L-Asparaginase activity in cell lysates and culture media of halophilic bacterial isolates. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15**(3): 435.
- Benson, J. K., 2002. ***Microbiological Application: Laboratory Manual in General Microbiology***. 8th Edition: 471-478.
- Berber, I., Yenidünya, E., 2005. Identification of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from Lake Van and its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles. ***Turkish Journal of Biology*, 29**: 181-188.
- Bhargava, A. K., Lal, H., Pundir, C. S., 1999. Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase. ***Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39**(3): 125-136.
- Bhargavi, M., Jayamadhuri, R., 2016. Isolation and screening of marine bacteria producing anti-cancer enzyme L-Asparaginase. ***American Journal of Marine Science*, 4**(1): 1-3.
- Boltyanskaya, Y. V., Detkova, E. N., Shumskii, A. N., Dulov, L. E., Pusheva, M. A., 2005. Osmoadaptation in representatives of haloalkaliphilic bacteria from soda lakes. ***Microbiology*, 74**(6): 640-645.
- Chen, W. P., Kuo, T. T., 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. ***Nucleic Acids Research*, 21**(9): 2260.
- Coenye, T., LiPuma, J. J., 2002. Multilocus restriction typing, a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. ***The Journal of Infectious Diseases*, 185**: 1454-1462.

- Coenye, T., Vanlaere, E., Samyn, E., Falsen, E., Larsson, P., Vandamme, P., 2005. *Advenella incenata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Alcaligenaceae*, isolated from various clinical samples. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **55**(1): 251-256.
- Çiftçi, Y., Işık, M. A., Alkeveli, T., Yeşilova, Ç., 2008. Van Gölü Havzasının Çevre Jeolojisi. ***Jeoloji Mühendisliği Dergisi***, **32**(2): 45-77.
- Çotuk, A., Sungur E. İ., 2015. ***Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri***. Nobel Tıp Kitabevleri., İstanbul.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. *In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman and Comp., San Francisco.
- Deshpande, N., Choubey, P., Agashe, M., 2014. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. ***The Scientific World Journal***, 1-6.
- Dhanam Jayam, G., Kannan, S., 2014. Screening and characterization of L-asparaginase producing *Streptomyces* isolated from soil samples of Periyar Lake, Kumily. ***Bioscience Discovery***, **5**: 50-54.
- Dhanam Jayam, G., Kannan, S., 2015. Depiction and screening of L-asparaginase producing *Actinomycetes* isolated from the soil samples of Termite Mounts. ***International Journal Of Advanced Scientific and Technical Research***, **5**(1): 304-310.
- Dharmaraj, S., 2011. Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. ***Iranian Journal of Biotechnology***, **9**(2): 102-108.
- Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., Van Steenberg, R., 1996. Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. ***FEMS Microbiology Ecology***, **19**(3): 181-191.
- Dudhagara, P., Ghelani, A., Patel, R., Chaudhari, R., Bhatt, S., 2015. Bacterial tag encoded FLX titanium amplicon pyrosequencing (bTEFAP) based assessment of prokaryotic diversity in metagenome of Lonar soda lake, India. ***Genomics Data***, **4**: 8-11.
- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., 2011. L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. ***Indian Journal of Microbiology***, **51**(3): 307-311.
- El-Naggar, N. E. A., 2015. Isolation, screening and identification of *Actinobacteria* with uricase activity: Statistical Optimization of Fermentation Conditions for Improved Production of Uricase by *Streptomyces rochei* NEAE-25. ***International Journal of Pharmacology***, **11**(7): 644-658.
- Ertan, F., Aksöz, E., 2000. *Aspergillus niger*'den Ürikaz enziminin üretilmesi ve aktiviteye etkili bazı faktörlerin belirlenmesi. ***Turkish Journal of Biology***, **24**: Ek Sayı, 11-23.
- Franzmann, P. D., Wehmeyer, U., Stackebrandt, E., 1988. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. ***Systematic and Applied Microbiology***, **11**(1): 16-19.
- Ghosh, T., Sarkar, P., 2014. Isolation of a novel uric-acid-degrading microbe *Comamonas* sp. BT UA and rapid biosensing of uric acid from extracted uricase enzyme. ***Journal of Biosciences***, **39**(5): 805-819.

- Ghoshoon, M. B., Raee, M. J., 2008. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. ***American Journal of Biochemistry and Biotechnology***, **4**(4): 422-424.
- Grant, W. D., 2004. Introductory chapter: half a lifetime in soda lakes. ***In Halophilic Microorganisms*** (pp. 17-31). Springer Berlin Heidelberg.
- Grant, W. D., 2006. Alkaline environments and biodiversity, in extremophiles. ***Encyclopaedia of Life Support Systems (EOLSS)***, Developed under the Auspices of the UNESCO: Oxford: Eolss Publishers.
- Gupta, N., Sahoo, D., Basak, U. C., 2009. Screening of *Streptomyces* for L-asparaginase Production. ***Academic Journal of Cancer Research***, **2**(2): 92-93.
- Hasebe, Y., Nawa, K., Ujita, S., Uchiama, S., 1998. Highly sensitive flow detection of uric acid based on an intermediate regeneration of uricase. ***Analyst***, **123**(8): 1775-1780.
- Hiteman, M., Halliwell, B., 1996. Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha I-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidant. ***Radical. Research***, **25**: 275-283.
- Honarbaksh, F., Amoozegar, M. A., Abolmaali, S., Mehrshad, M., 2014. Screening for uricase enzyme From Halotolerant Bacteria. ***Iranian Journal of Public Health***, **43**(2): 60.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications Of Their Products For Biotechnology. ***Microbiology and Molecular Biology***, **63**: 735-750.
- Jagathy, K., Pushparaj A., Ronald, J., 2016. Uricase production from *Bacillus subtilis* isolated from poultry waste. ***International Journal of Advanced Research in Biological Sciences***, **3**(6): 255-262
- Jha, S. K., Pasrija, D., Sinha, R. K., Singh, H. R., Nigam, V. K., Vidyarthi, A. S., 2012. Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. ***International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research***, **3**(9): 3076.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W., Owenson, G. G., 1998. Microbial diversity of soda lakes. ***Extremophiles***, **2**(3): 191-200.
- Kamble, K. D., Bidwe, P. R., Muley, V. Y., Kamble, L. H., Bhadange, D. G., Musaddiq, M., 2012. Characterization of L-asparaginase producing bacteria from water, farm and saline soil. ***Bioscience Discovery***, **3**(1): 116-119.
- Kan, J.Q., Zhou, F., Mu, S.L., Shi, Y.J., 1996. Effect of alpha, alpha-tilde- bipyridine on activity of the polyaniline uricase electrode, ***Sensors and Actuators***, **30**(1):7-10.
- Kempe, S., Kazmierczak, J., Landmann, G., Konuk, T., Reimer, A., Lipp, A., 1991. Largest known microbialites discovered in Lake Van, Turkey. ***Nature***, **349**: 605-608.
- Kiran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. ***Fen Ve Mühendislik Dergisi***, **9**(1): 12-19.
- Krishnapura, P. R., Belur, P. D., 2015. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some *Zingiberaceae* plants for L-Asparaginase production. ***Preparative Biochemistry and Biotechnology***, (just-accepted).
- Kumar, s. A., Arunasri, R., Jayachandra, Y., Sulochana, M., 2010. Screening of extracellular hydrolular hydrolytic enzymes from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ak5. ***Screening***, **5**(1): 97-99.

- Kumari, P., Sankar, G., Prabhakar, T., 2011. L-asparaginase production and molecular identification of marine streptomycete strain WS3/1. *International Journal Pharmaceutical and Biomedical Research*, **2**(4): 244-249.
- Lehejšková, R., Demnerova, K., Kralova, B., 1986. Screening of microorganisms with uricase activity. *Biotechnology letters*, **8**(5): 341-342.
- Lerner, K. L., Lerner B. W., 2002. *World of Microbiology and Immunology*. America, 1-359.
- Luhana, K. K., Dave, A., Patel, K., 2013. Study of anti leukemic enzyme L-asparaginase from halophilic bacterial isolates of Bet Dwarka Island. *International Journal of Chemtech Application*, **2**: 81-93.
- MacFaddin, J. F., 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed., Baltimore: Williams and Wilkins, 912 sayfa.
- Mahajan, R. V., Mihooliya, K. N., Saran, S., Saxena, R. K., 2014. L-asparaginase from *Bacillus sp.* RKS-20. Process optimization and application in the inhibition of acrylamide formation in fried foods. *Journal of Proteins Proteomics*, **5**(2).
- Makky, E. A., Ong, J. J., Karim, M. R., Lee, C. M., 2013. Production and optimization of L-asparaginase by *Bacillus sp.* KK2S4 from corn cob. *African Journal of Biotechnology*, **12**(19).
- Mata, J. A., Martínez-Cánovas, J., Quesada, E., Béjar, V., 2002. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, **25**(3): 360-375.
- Miland, E., Ordieres, A. M., Blanco, P. T., Smyth, M. R., Fagain, C. O., 1996. Poly (o-aminophenol)-modified bienzyme carbon paste electrode for the detection of uric acid. *Talanta*, **43**(5): 785-796.
- Moorthy, V., Ramalingam, A., Sumantha, A., Shankaranaya, R. T., 2010. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus spp.* *African Journal of Microbiology Research*, **4**(18): 1862-1867.
- Nakagawa, S., Oda, H., Anazawa, H., 1995. High cell density cultivation and high recombinant protein production of *Escherichia coli* strain expressing uricase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**(12): 2263-2267.
- Nakaminami, T., Ito, S. I., Kuwabata, S., Yoneyama, H., 1999. Uricase-catalyzed oxidation of uric acid using an artificial electron acceptor and fabrication of amperometric uric acid sensors with use of a redox ladder polymer. *Analytical Chemistry*, **71**(10): 1928-1934.
- Nanda, P. Jagadeesh Babu, P. E., 2014. Isolation, screening and production studies of uricase producing bacteria from poultry sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **44**(8): 811-821.
- Narasaiah, B. C., Leelavathi, V., Manne, A. K., Swapna, G., Paul, M. J., Dasu, P. M., 2015. Screening of *Streptomyces albus* CN-4 for enzyme production and optimization of L-Asparaginase. *International Journal of Scientific and Research Publications*, **5**(3): 1-8.
- Nazemi, A., Miri Nargesi, M., 2013 Isolation and molecular identification of *Bacillus* species that produce extracellular L asparaginase, an anti-cancer enzyme, from soils. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, **3**(11): 9-13.
- Raj, J. E. E. A., Baskaran, A., Kumar, S. D., Sureka, I., Velmurugan, M., Sathiyamurthy, K. 2016. Isolation and screening of L-asparaginase and L-glutaminase producing bacteria and their antimicrobial potential from

- environmental sources. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* **2**: 47-53
- Rajguru Shubhangi, A., Deshmukh Padma, V., 2016. Isolation and screening of L-Asparaginase producing bacteria from aquatic and terrestrial habitats in Thane District, Ms, India. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, **5**(9): 1807-1817
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J.-C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D. Fournier, P.-E., 2014. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**: 384–391.
- Rao, M. B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S., Deshpande, V. V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Micrbiolojy Molecüler Biology Review*, **62**(3):597-635.
- Raval, K., Vineetha lekshmy P.V., 2016. Isolation and production studies of uricase producing bacterial strains from poultry waste. *International Journal of Advanced Research Trends in Engineering and Technology*, **3**(5): 152-157.
- Ravichandran, R., Hemaasri, S., Cameotra, S. S., Jayaprakash, N. S., 2015. Purification and characterization of an extracellular uricase from a new isolate of *Sphingobacterium thalpophilum* (VITPCB5). *Protein Expression and Purification*, **114**: 136-142.
- Roch-Ramel, F., Guisan, B., 1999. Renal transport of urate in humans. *Physiology*, **14**(2): 80-84.
- Romanenko, L. A., Schumann, P., Rhode, M., Lysenko, A. M., Mikhailov, V. V. Stackebrandt, E., 2002. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halo- philes isolated from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 1291–1297.
- Sabu, A., 2003. Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes. *Indian Journal of Biotechnology*, **2**: 334-341.
- Saleem, B.R., Rekha R, M., Komala, S. Ruby., 2009. Production of extracellular antileukaemic enzyme L-asparaginase from marine *Actinomycetes* by solid state and submerged fermentation: Purification and Characterisation". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 353-360.
- Salimath, M. B., Onkarappa R., 2016. Screening of *Streptomyces* for L-Asparaginase, therapeutic agent of Lymphocytic Leukemia from Western Ghats of Karnataka, India. *International Journal of Drug Development and Research*.
- Sánchez - Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, **94**(2): 295-300.
- Selvam, K., Vishnupriya, B., 2013. Isolation and screening of L-Asparaginase producing marine *Actinomycetes* from South Indian Coastal Region *American Journal of PharmTech Research*, **3**(4): 431-439.
- Shirazian, P., Asad, S., Amoozegar, M. A., 2016. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *Experimental and Clinical Journal*, **15**: 268.

- Sinha, R. A. T. I., Singh, H. R., Jha, S. K., 2013. Microbial L-Asparaginase: present and future prospective. *International Journal of Innovative Research in Science*, **2**(11): 7031-51.
- Talluri, V. P., Bhavana, M., Rajagopal, S. V., 2013. Isolation and screening of L-Asparaginase producing bacteria from Visakhapatnam soil samples. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **3**: 1121-1125.
- Talluri, V. P., Bhavana, M., Kumar, M. M., Rajagopal, S. V., 2014. L-asparaginase: An ultimate anti-neoplastic enzyme. *International Letters of Natural Sciences*, **10**: 23-25.
- Thandeeswaran, M., Mahendran, R., Kiran, K. G., Nawaz, K. A., Palaniswamy, M., Jayaraman, A., 2016. Screening and production of anticarcinogenic enzyme from *Escherichia coli* Ctl20: L-Asparaginase. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **8**(3): 244-248.
- Topal, Ş., 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin A'nın Yeri. *Gıda Dergisi*, **10**(1).
- Ulukanli, Z., Dığrak, M. (2002). Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of Biology*, **26**(3): 181-191.
- Upadhyay, R., Saxena, A., Kango, N., 2012. Screening and production of tumor inhibitory L-Asparaginase by bacteria isolated from soil. *Asian Journal Pharmaceutical Clinical Research*, **5**: 135-137.
- Usha, R., Mala, K. K., Venil, C. K., Palaniswamy, M., 2011. Screening of *Actinomyces* from mangrove ecosystem for L-asparaginase activity and optimization by response surface methodology. *Polish Journal of Microbiol.*, **60**(3): 213-221.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, **60**(2): 407-438.
- Vroemen, A. J., 1983. Production of Industrial Enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**: 90-91.
- Wakil, S. S., Adelegan, A. A., 2015. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-western Nigeria. *Journal of Basic and Applied Sciences*, **11**: 39-51.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3.* The Application of Enzymes in Industry p. 274-373, New York.
- Woese, C.R., 1987. *Bacterial Evolution Microbiological Reviews* **51**: 221-271
- Wright, P. A., 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, **198**(2): 273-281.
- Wu, X., Muzny, D. M., Lee, C. C., Caskey, C. T., 1992. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **34**(1): 78-84.
- Zeman, N.W., McCrea, J.M., 1985. Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World*, **30**(1): 777-780.
- Zhou, X. L., Ma, X. H., Sun, G. Q., Li, X., Guo, K. P., 2005. Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production conditions. *Process Biochemistry*, **40**(12): 3749-3753.

EKLER

Ek 1. Besiyerleri

Ek.1.1. Alkalofil broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Pepton	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaNO_3	10 g
ddH ₂ O	1000 ml

Not: NaNO_3 ayrı olarak otoklavlanmalıdır ve otoklav sonrası besiyerine katılmalıdır.

Ek.1.2. Alkalofil agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Pepton	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaNO_3	10 g
Agar	15 g
ddH ₂ O	1000 ml

Not: NaNO_3 ayrı olarak otoklavlanmalıdır ve otoklav sonrası besiyerine katılmalıdır.

EK.1.3. M9 agar besiyeri

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 g
Agar	20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1ml
NaCl	0.5 g
ddH ₂ O	1000 ml

Ek. 1.4. Nişasta agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Nişasta	2 g
Agar	2 g
Alkalifilik Broth	100 ml

Ek. 1.5. Skim milk agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Skim milk	0.1 g
Agar	2 g
Alkalifilik Broth	100 ml

Ek. 1. 6. Tween 80 Agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Tween 80	3 ml
Agar	2 g
Alkalofilik Broth	100 ml

Ek. 1.7. Nitrat broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	1 g
Alkalofilik Broth	100 ml

Ek. 1.8. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Fenol Red	0.03 g
Alkalofilik Broth	100. ml

Ek. 1.9. Moeller baz besiyeri ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Pepton	5 g
Sığır eti ekstraktı	5 g
Glikoz	5 g
Brom krezol moru	0.01 g
Krezol kırmızısı	0.005 g
Pridoksal	0.005 g

Distile su	1000 ml
------------	---------

Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar

Ek. 2. 1. Agaroz jel hazırlama

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Agaroz	0.4 g
TBE	40 ml
Ethidium Bromid	4 µl
1.5 dalga fırın	

Ek. 2.2. CTAB+0.7 M NaCl

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
CTAB	10 g
NaCl	4.1 g
Steril distile su	100 ml

Ek. 2.3. Fenol-kloroform-izoamilalkol

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Fenol-kloroform-izoamilalkol	25:24:1

Ek. 2.4. TBE Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	10.78 g
Borik asit	5.503 g
EDTA	0.5845 g
Safsu	1000 ml

Ek. 2.5. 0.5M EDTA

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EDTA	18.62 g
Safsu	100 ml

Ek. 2.6.Ethidium bromide

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EthidiumBromid	0.01 g 1 ml
Distilesu	

Ek. 2.7. RNAaz hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
RNAase	25 µl
Steril saf su	1 ml

Ek. 2.8. SDS çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
SDS	10 g
Distile su	100 ml

Ek. 2.9. Kloroform-izoamilalkol çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Kloroform-izoamilalkol	24:1

Ek. 2.10. Loading dye Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Sukroz	30 g
EDTA (0.5 M pH:8)	20 ml
Bromo Blue	10 mg
Steril saf su	50 ml

Ek. 2.11. T.E. (Tris-Edta) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris	1.211 g
0.5 M EDTA	4 ml

k. 2.12. TAE(tris-asetat) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
TrisHCl	4.84 g
Asetikasit	1.142 g
EDTA	2 ml

Ek 3. Kullanılan Çözelti ve Boyalar

Ek. 3.1. Lügolçözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
İyot kristalleri	1 g
Potasyum iyodür	2 g
Distile su	300 ml

Ek.3.2. Safranin boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Safranin	1 g
Distile su	100 ml

Ek.3.3. Malaşit yeşili boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Malaşit yeşili	5 g
Distile su	100 ml

Ek. 3.4.H₂O₂çözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Hidrojen peroksit	1 g
Distile su	100 ml

Ek. 3.5. Kristal viyole boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Kristal viyole	1 g
Distile su	100 ml

Ek. 3.6.Rhodamin B boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Rhodamin B	0.001 g
Distile su	100 ml



ÖZ GEÇMİŞ

1978 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2001 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.



YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 16/03/2018

Tez Başlığı / Konusu: Van Gölü'nün Farklı Bölgelerinden Toplanan Su ve Sediment Örneklerinden L-Asparaginaz ve Ürikaz Enzimi Üreten Alkalofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 53 sayfalık kısmına ilişkin, 16/03/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **turnitin** intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 7 (yedi) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

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

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

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

16.03.18
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Firdevs ESEN

Öğrenci No: 139102099

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Yüksek lisans

Statüsü: Y.Lisans X Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)