



ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON OFİSİ

SONUÇ RAPORU

PROJE NO
YÜRÜTÜCÜ

: 2013/010
: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ



ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

GENEL BİLGİLER

PROJE NO	2013/010
PROJE ADI	Kitinaz üreten bakterilerin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamaları
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
ARAŞTIRMACILAR	Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ Arş Gör. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

PROJE SÜRESİ

Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	Verilen Ek Süre (Ay)	Son Bitiş Tarihi
01.09.2013	01.09.2014	24 ay	01.09.2016

PROJE BÜTÇESİ (TL)

Fasıllar	Toplam Ödenek	Toplam Ek Ödenek	Toplam Harcama	Kalan Ödenek
Makine/Teçhizat	-	-	-	-
Sarf Malzemesi	33.941,54		33.939,72	1,82
Hizmet Alımı	1.500,00 + (Fasıl aktarımı)	-	1.058,46	-
Seyahat ve Nakliye	(Fasıl aktarımı)	-	-	-
Yardımcı Personel	-	-	-	-
TOPLAM	35,000	-	34.998,18	1,82

RAPOR DÖNEMİNE İLİŞKİN BİLGİLER

RAPOR DÖNEMİNDEKİ BÜTÇE DURUMU (TL)			
Aktarılan Ödenek	Verilen Ek Ödenek	Toplam Harcama	Kalan Ödenek
4.990,20	-	4.988,38	1,82

EK: 1



ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ MALİ SONUÇ RAPORU

PROJE NO :2013/010

MALİ RAPORDA OLMASI GEREKEN BİLGİLER

- Proje kapsamında öngörülen ve gerçekleşen harcamalar Tablo.1'de gösterilmelidir.

Tablo 1. • Proje kapsamında Öngörülen ve Gerçekleşen Harcamaların Kalemler Bazında Miktarları.

HARCAMA KALEMİ	DÖNEM İÇİN TRANSFER EDİLEN ÖDENEK (TL)	DÖNEM İÇİNDE GERÇEKLEŞEN HARCAMA (TL)	KALAN ÖDENEK (TL)
Makine Teçhizat			
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
Sarf Malzemesi			
1.	4.990,20	4.988,38	1,82
2.			
3.			
4.			
5.			
Hizmet Alımı			
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
Seyahat/Nakliye			
1.			
2.			
3.			
Yardımcı Personel			
1.			
2.			
3.			
GENEL TOPLAM	4.990,20	4.988,38	1,82

EK: 2



ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

PROJE NO :2013/010

BİLİMSEL RAPORDA OLMASI GEREKEN BİLGİLER

- Dönem içinde projeyle ilgili bilimsel ve teknik gelişmeler proje planı ile karşılaştırılarak verilmeli, elde edilen veriler ile varılan ara sonuçlar, varsa materyal, yöntem ve kapsam değişiklikleri belirtilmeli ve tartışılmalıdır.
- Dönem içindeki idari gelişmeler - yardımcı araştırmacı ve personel değişikliği, ek süre, yürütücünün kurum değişikliği ve varsa diğer destekleyen kuruluşlarla sürdürülen işbirliği, vb. konularındaki bilgiler- verilmelidir.
- Proje çalışmaları kabul edilen çalışma takvimine uygun yürümüyorsa gerekçeleri açıklanmalıdır.
- Bir sonraki dönem içinde yapılması planlanan çalışmalar - öneri formundan farklı bir durum oluşmuş ise - belirtilmelidir.
- Destekleyen diğer kuruluşlarla ilgili sorunlar var ise ayrıntıları ve çözüm önerileri sunulmalıdır.
- Dönem içinde yayınlanan ve toplantılarda sunulan bildirilerin birer kopyası eklenmeli ve yapılan yayınlarda Erzurum Teknik Üniversitesi desteği belirtilmiş olmalıdır.

(Her madde için gerektiği kadar alan ve ek sayfa kullanabilirsiniz)**Projeyle İlgili Bilimsel ve Teknik Gelişmeler**

Proje kapsamında mikroorganizmaların izolasyonu, katı ve sıvı kültürde kitinaz aktivitelerinin araştırılması, kitinaz aktivitesine sahip bakterilerde enzim aktivitelerinin ölçümleri ve bakteri izolatlarının moleküler yöntemlerle tanılanması çalışmaları tamamlanmıştır.

Yapılan çalışmalar maddeler halinde aşağıda belirtilmiştir.

Kullanılacak Besiyerlerinin Hazırlanması

Bakteri izolasyonunda Nutrient Agar, Luria-Bertani Agar, Trypticase Soy Agar besiyerleri üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanmıştır.

Kitinaz aktivitesi belirleme agarı (KABA)

4.5 g kollaidal kitin, 0.3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.0 g $(NH_4)SO_4$, 2.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g of sitrik asit monohidrat, 15 g agar, 0.15 g bromocresol purple ve 200 μl Tween-80, 1 litre saf su içinde karıştırılarak pH 4.7'ye ayarlandıktan sonra, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Agrawal *et al.*). Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50 °C'ye soğutulup steril kabin içerisinde steril plastik petri kutularına dökülerek katılaşması beklenmiştir.

Mikroorganizmaların izolasyonu

Proje kapsamında beş lokasyonda arazi çalışmaları yapılarak toplam 20 toprak örneği alınmıştır. İzolasyon için laboratuvara getirilen toprak örneklerinden fosfat tampon solüsyonunda bir seri seyreltme sonrası, alınan örnekler nutrient agar (NA) ve triptik soy agar (TSA) içeren petri kaplarına inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda 27°C, 37°C ve 55 °C'de 2 ila 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Farklı koloni morfolojisine sahip bakteri kolonileri seçilmiş ve saflaştırılmak üzere yeni petrilere ekilmiştir. Saf bakteri kültürleri %15 gliserol içeren LB (Luria-Bertani Broth) içerisinde -86 °C'de saklanmıştır.

Kolloidal Kitin hazırlanması

Kolloidal kitin Monreal ve Reese'in (1969) önerdiği metodun modifiye edilmesi ile kitin tozundan (Sigma, Almanya) hazırlanmıştır. 300 ml konsantre HCl üzerine 30 g kitin tozu yavaşça eklenmiş ve gece boyunca 4 °C'de bekletilmiştir. Karışımın üzerine 1200 ml 4 °C'ye soğutulmuş %96'lık etanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyunca 4 °C'de bekletilmiştir. Bu sürenin

sonunda 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek altta kalan pelet alınıp pH 7 oluncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Elde edilen koloidal kitin, sabit ağırlığa gelinceye kadar 50°C'ye ayarlanmış fırında kurutulduktan sonra toz haline getirilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

Kitinaz üreten bakterilerin taranması

Kitinaz üreten bakteriler koloidal kitin içeren besiyeri (0.3 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L NH_4SO_4 , 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g sitrik asit monohidrat, 15 g/L agar, 200 µl tween 80, 4.5 g/L koloidal kitin) üzerinde gerçekleştirildi. Saflaştırılmış izolatlar koloidal kitin agar üzerine inoküle edildi ve 3–5 gün boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kitinaz üreten izolatlar şeffaf zon oluşturma esasına göre seçildi.

Kitinaz üreten bakteri türlerinin YAME (MIS) analizi ile tanılanması

Kitinaz üreten izolatlar yağ asit metil ester (YAME) içeriklerine göre Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak tanılanmıştır. Yağ asitleri metillendikten sonra üreticinin önerdiği yöntemle göre gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi (GS-MS) ile analiz edilmiştir (Sasser, 1990). Hücreler triptik soy agar (TSA) üzerine inoküle edilmiş ve 27 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 40 mg bakteri hücresi standart prosedürlere göre ekstrakte edilmiştir. Analiz Hewlett Packard gaz kromatografi HP 5890 CG ve TSBA Versiyon 6.0 kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizi ise MIS yazılım paketi MIDI (USA) kullanılarak yapılmıştır (Miller and Berger, 1985; Roy, 1988).

BIOLOG GN2-GP2 ile metabolik karakterizasyonu

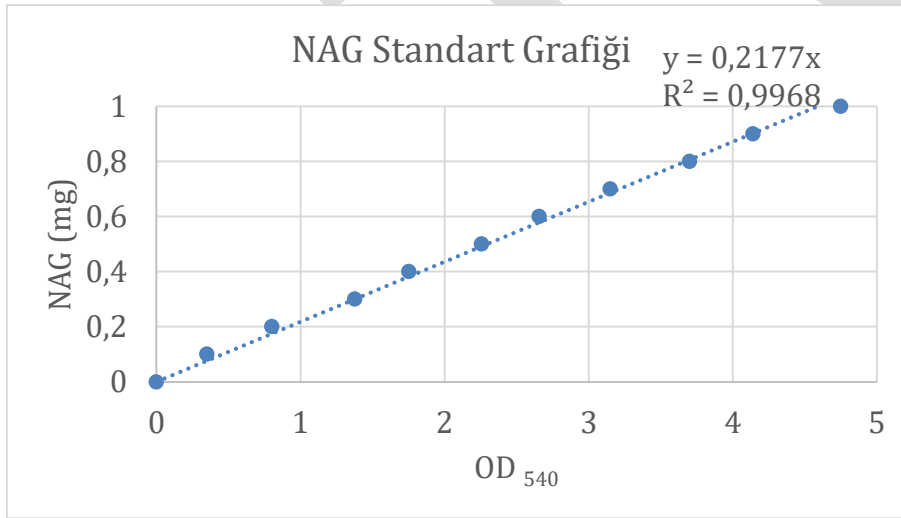
Karbon kaynağı kullanımlarına göre kitin aktivitesine sahip bakteriyel izolatlar BIOLOG sistem (USA) kullanılarak karakterize edilmiştir. Bakteriyel izolatlar Biolog Universal Growth Agar (BUGA) medium (Bochner, 1989) ortamında 25–27 °C'de bir gece inkübe edildikten sonra toplanarak steril 0.85%'lik NaCl içerisinde çözünmüştür. Her bir bakteriyel süspansiyondan 140 µl alınarak Gram özelliğine göre GN2-GP2 MicroPlate™'e inoküle edilmiştir. Uygun sıcaklıklarda inkübasyondan sonra mikroplateler 590 nm dalga boyunda, BIOLOG MicroStation kinetik okuyucuda değerlendirilmiş ve MicroLog 3 Ver 4.20 yazılımı (Biolog, USA) kullanılarak veri analizi yapılmıştır.

Enzim Aktivite Tayini

DNSA Solüsyonu: 10 g NaOH ve 10 g DNSA 500 ml saf su içerisinde çözündükten sonra 2 g fenol, 0,5 g Na₂SO₃ ve 200 g sodyum potasyum tartarat tetrahidrat (Rochelle tuzu : C₄H₄KNaO₆ . 4 H₂O) eklenip son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

NAG (N-Asetil Glukozamin) standart grafiğinin hazırlanması

Standart grafik hazırlamak için 10 tüp ve kör olarak kullanılmak üzere 1 tüp hazırlanmıştır. 100 mg N-asetil glukozamin 100 ml saf su içinde çözülerek N-asetil glukozamin çözeltisi hazırlanmıştır. Tüplere sırasıyla bu çözeltiden 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml ve 10 ml konmuştur. Tüplerin son hacimleri saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. İyice karıştırılan her bir tüpten 1 ml alınarak yeni bir cam tüpe konmuş, kör tüpüne de 1 ml saf su konulmuştur ve üzerlerine 1 ml DNSA solüsyonu eklenerek 10 dakika kaynar su banyosunda bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. Oluşan renk değişimi spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı üç tekrar şeklinde okunmuş, elde edilen absorbansların ortalamaları kullanılarak şeker tayini için bir standart grafik hazırlanmıştır. Hazırlanan N-asetil glukozamin standart grafiği Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. N-asetil glukozamin standart grafiği

Enzim aktivitesi hesaplamak üzere ilk olarak bakteri kültür süpernatantlarından 1'er ml alındı ve 5000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Enzim reaksiyonu için 0,5 ml uygun miktarda seyreltilen süpernatant, %2'lik kolloidal kitin içeren 0,5 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7) içerisinde vorteks ile karıştırıldı ve 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 1 ml DNSA solüsyonu eklenerek durduruldu ve tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Süre sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına soğutuldu. Oluşan renk değişimi spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı üç

tekrar şeklinde okundu. Elde edilen absorbanların ortalamaları alındı ve standart grafikten faydalanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

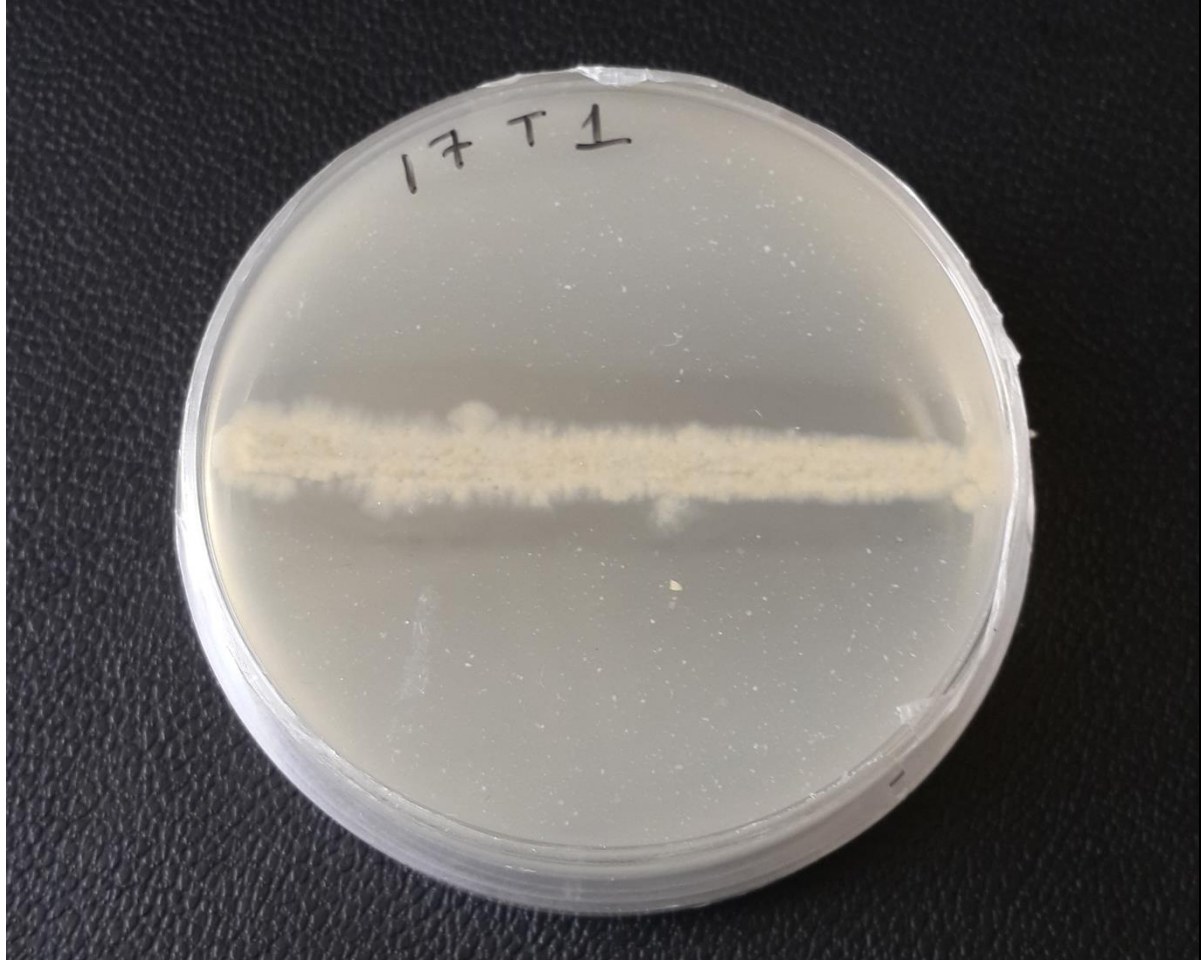
Bakterileri İzolatlarının 16S rDNA Yöntemi ile Tanısı

Her bir izolattan saflaştırılacak olan genomik DNA'dan, 16S rDNA genleri UNI16S-L ve UNI16S-R primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılarak 16S-rDNA intergenik bölgesi için spesifik amplikonlar üretilmiştir (Görmez, 2011). PCR reaksiyonlarının şartları Beffa *et. al.* (1996) yöntemine göre oluşturularak, elde edilen ürün veya ürünler pGEM-T vektör sistemine klonlanmıştır. Hedef bölgeler T7 ve SP6 primerleri ile çoğaltılarak koloni PCR yapılmıştır. Elde edilen klonların sekans analizi Applied Biosystems model 373A DNA sequencer kullanılarak elde edilmiştir (Macrogen, Korea) (Altschul *et al.*, 1990; Benson *et al.*, 1999).

Bulgular

Mikroorganizmaların izolasyonu ve kitinaz aktivitelerinin taranması

Yapılan izolasyon çalışmalarında izole edilen 200 bakteri, kolloidal kitin içeren katı besiyeri üzerinde kitinaz aktivitesi için taranmıştır. Kolloidal kitin içeren petriler üzerinde kitin hidroliz zonlarının oluşumuna ve büyüklüklerine göre 13 tane izolat seçilmiştir. (Şekil 2).



Şekil 2. Kolloidal kitin içeren besiyerinde 17 T 1 kodlu *Novosphingobium capsulatum* suşu

Kitinaz üreten bakteri türlerinin tanılanması

Kitin aktivitesi iyi olan izolatların tanılanması yağ asit metil ester [MIS (YAME)] ve karbon kaynağı kullanımlarına göre (BIOLOG sistemi) yapılmıştır. MIS and BIOLOG sistemlerinin sonuçları birbirleriyle tutarlı çıkmıştır ve izolatlar kabul edilebilir düzeylerde tanılanmıştır. Yüksek kitinaz aktivitesi gösteren bakteri türleri *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus reuszeri*, *Kocuria erythromyxa*, *Kocuria rosea*, *Novosphingobium capsulatum*, *Rhodococcus bratislaviensis*, *Rhodococcus fasciens* ve *Staphylococcus cohnii* olarak tanılanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Kitinaz aktivitesine sahip bakteriyel izolatların MIS ve BIOLOG ile tanılanması

Strain Numarası	MIS Tanı Sonucu	Benzerlik İndeksi	BIOLOG Tanı Sonucu	Benzerlik İndeksi
8 T 1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	31.80	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	86.40
6 T 1	<i>Arthrobacter oxydans</i>	68.50	<i>Arthrobacter oxydans</i>	13
1 T 8	<i>Arthrobacter oxydans</i>	21.8	<i>Arthrobacter oxydans</i>	84.50
28 T 12	<i>Bacillus cereus</i>	56.30	<i>Bacillus cereus</i>	37.40
33 T 28	<i>Bacillus cereus</i>	44.50	<i>Bacillus cereus</i>	61
6T 5	<i>Bacillus megaterium</i>	80.60	<i>Bacillus megaterium</i>	91.20
31 T 8	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	68.2	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	13.60
1 T 4	<i>Kocuria erythromyxa</i>	41.80	<i>Kocuria erythromyxa</i>	66.40
11 T 13	<i>Kocuria rosea</i>	52.40	<i>Kocuria rosea</i>	45.20
17 T 1	<i>Novosphingobium capsulatum</i>	40.30	<i>Novosphingobium capsulatum</i>	69.40
7 T 8	<i>Rhodococcus bratislaviensis</i>	41.20	<i>Rhodococcus bratislaviensis</i>	67.60
6 T 10	<i>Rhodococcus fasciens</i>	72.30	<i>Rhodococcus fasciens</i>	5.4
7 T 11	<i>Staphylococcus cohnii</i>	72.4	<i>Staphylococcus cohnii</i>	52.30

Enzim Aktivite Sonuçları

Elde edilen absorbanların ortalamaları alındı ve standart grafikten faydalanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı. Enzim aktivite ölçümleri sonucunda en yüksek aktivite 0.85 U/ml ile 17 T 1 kodlu *Novosphingobium capsulatum* suşunda görüldü.

Kitinaz üreten bakteri türlerinin moleküler tanılanması

Kitin aktivitesi iyi olan bakteri izolatlarının moleküler tanılanması 16s rDNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. yapılmıştır. İzolatların genomik DNA'ları saflaştırılmıştır. 16S ribozomal DNA

genleri UNI16S-L ve UNI16S-R primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmış, 16S-rDNA intergenik bölgesi için spesifik ampikonlar üretilmiştir. PCR ürünleri pGEM-T vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra istenilen bölgeyi taşıdığı T7 ve SP6 primerleri ile oluşturulan koloni PCR uygulaması sayesinde belirlenen klonların sekans analizi Applied Biosystems model 373A DNA sequencer kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen sekansların analizi Blast Search Programı-BLASTN kullanılarak yapılmış ve GenBank veritabanı ile karşılaştırılmıştır. Bakteriyel izolatların 16S rDNA analizlerinin sonuçları MIS ve BIOLOG sistemlerinden elde edilen verilerle örtüşmüştür.

Kaynaklar

- Bochner, BR 1989. Sleuthing out Bacterial Identities. Nature 339:157–158.
- Monreal, J. and Reese, E. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol., 15:689–696.
- Miller I., Berger T. (1985): "Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acids", Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., s.228–238.
- Sasser M. MIDI technical note 101. Newark, Del: MIDI, Inc.; 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids; pp. 1–7.

6. Proje kapsamında Yapılan Yayınlar ve Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1. S. Gurkok and A. Görmez, 2016. Isolation and characterization of novel chitinolytic bacteria. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS), April 21-23, Belek, Antalya, Turkey.
2. S. Gurkok and A. Görmez, 2016. Isolation and characterization of novel chitinolytic bacteria. AIP Conf. Proc., 1726, 020017, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4945843>. 21-23 April 2016, Antalya, Turkey.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN ADI SOYADI	İMZASI	TARİH
Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ		01.09.2016

NOT: Raporun tüm sayfaları proje yürütücüsü tarafından paraflanacak, sadece son sayfa imzalanacaktır.