



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANA MARUZ KALMIŞ TOPRAKTA 16S rRNA  
ANALİZLERİNE GÖRE AKTİNOMİSET ÇEŞİTLİLİĞİN  
BELİRLENMESİ**

**Hiba Farah Mohamed ABDALLA**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ADLİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof Dr. Emine Sümer ARAS**

**ANKARA  
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANA MARUZ KALMIŞ TOPRAKTA 16S rRNA  
ANALİZLERİNE GÖRE AKTİNOMİSET ÇEŞİTLİLİĞİN  
BELİRLENMESİ**

**Hiba Farah Mohamed ABDALLA**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ADLİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Emine Sümer ARAS**

**ANKARA  
2019**

## Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü'ne,

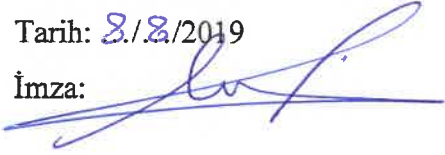
Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “KANA MARUZ KALMIŞ TOPRAKTA 16S rRNA ANALİZLERİNE GÖRE AKTİNOMİSET ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafından yazılmıştır. Tezimin fikri tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar ve araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hiba Farah Mohamed ABDALLA

Tarih: 8./8./2019

İmza:



## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı  
Adli Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Hiba Farah MOHAMED ABDALLA tarafından hazırlanan

“Kana Maruz Kalmış Toprakta 16S rRNA Analizlerine Göre Aktinomiset Çeşitliliğinin  
Belirlenmesi.” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak  
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

05.08.2019



Prof. Dr. Emine Sümer ARAS  
Ankara Ü. Fen Fakültesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ  
Ankara Ü. Fen Fakültesi  
Üye



Prof. Dr. Hikmet Aysegül TAYLAN ÖZKAN  
Hitt Ü. Tıp Fakültesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                                 | ii        |
| Kabul ve Onay                                              | iii       |
| İçindekiler                                                | iv        |
| Önsöz                                                      | vi        |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                    | vii       |
| Şekiller                                                   | viii      |
| Çizelgeler                                                 | x         |
| <br>                                                       |           |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                            | <b>1</b>  |
| 1.1.Adli Mikrobiyoloji                                     | 3         |
| 1.1.1. Adli Mikrobiyoloji nedir                            | 3         |
| 1.1.2. Bio-suç                                             | 4         |
| 1.1.3. İz kanıt                                            | 5         |
| 1.1.4. Ölüm zamanı ve nedenin belirlenmesi                 | 6         |
| 1.2. Aktinobakteriya                                       | 9         |
| 1.2.1. Aktinomiset                                         | 10        |
| 1.3. 16S rRNA Analizi                                      | 13        |
| <br>                                                       |           |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                  | <b>16</b> |
| 2.1.Çalışacak kanların temini ve toprak uygulaması         | 16        |
| 2.2.Dilüsyon plak tekneği ile topraktan bakteri izolasyonu | 16        |
| 2.3.İzolatların seçimi, saflaştırılması ve saklanması      | 17        |
| 2.4. Pallet elde edilmesi                                  | 17        |
| 2.5.Genomik DNA izolasyonu                                 | 18        |
| 2.6.16S rRNA gen bölgesi ve PCR amplifikasyonu             | 19        |
| 2.7.16S rRNA ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizi   | 20        |
| 2.8.16S rRNA dizi verilerinin analizi                      | 20        |
| <br>                                                       |           |
| <b>3. BULGULAR</b>                                         | <b>21</b> |
| <br>                                                       |           |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                         | <b>42</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                | <b>45</b> |
| <b>ÖZET</b>                                                | <b>46</b> |
| <b>SUMMARY</b>                                             | <b>47</b> |

|                  |    |
|------------------|----|
| <b>KAYNAKLAR</b> | 48 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>  | 53 |



## ÖNSÖZ

Bu araştırmada, kana maruz kalmış toprakta 16S rRNA analizlerine göre Aktinomiset çeşitliliğın belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasını gerçekleştirme fırsatı vererek akademik hayata ilk adımını atmamı sağlayan; araştırmayı, bilimsel çalışmayı öğrenirken zengin akademik birikimiyle bana desteğini esirgemeyen değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Emine Sümer ARAS’a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın yürütülmesi esnasında gösterdiği ilgi ve çalışmalarındaki destekleri ile kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sayesinde çok şey öğrendiğim ve yüksek lisans hayatım boyunca gösterdiği anlayış ve fedakarlıklardan dolayı değerli arkadaşım ve hocam Dr. F. Şeyma GÖKDEMİR’e teşekkürlerimi sunarım.

Yıllar önce kariyerimi gerçekleştirmek istediğim alan olan Adli Bilimler ile Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bilgi ve deneyimleriyle bana katkı sağlayan çok değerli Adli Bilimler Enstitüsü öğretim üyelerine, ideallerim doğrultusunda ilerlememde her zaman destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak gösterdikleri anlayış ve fedakarlıklardan dolayı, uzakta olsalar da her zaman yanımda hissettiğim, varlıklarıyla güç bulduğum değerli aileme, canım anneme, babama, ablama ve sevgilime sonsuz teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| DNA     | Deoksiribonüklik asit                                 |
| GC      | Guanin Sitosin                                        |
| %       | Yüzde                                                 |
| G+C     | Guanin + Sitozin                                      |
| rRNA    | Ribozomal Ribonükleik asit                            |
| ABD     | Amerika Birleşik Devletleri                           |
| HVC     | Hepitit C virüsü                                      |
| CDI     | Cesedin çürüme bölgesi (Cadaver Decomposition Island) |
| pH      | Potential of Hydrogen                                 |
| PCR     | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                           |
| C       | Santigrat                                             |
| °       | Derece                                                |
| PMI     | Ölüm zamanı (Postmortem Interval)                     |
| g/L     | Gram/litre                                            |
| µg/ml   | Mikrogram/mililitre                                   |
| GYME    | Glikaz Maya Özü (Glucose Yeast Malt Extract)          |
| TE      | Tris-EDTA tamponu                                     |
| rpm     | Dakikada dönüş (Revolutions per minute)               |
| µl      | mikro litre                                           |
| pmol/µl | Pikomols / mikro litre                                |
| F       | Forward                                               |
| R       | Reverse                                               |
| UV      | Morötesi (Ultraviolet)                                |

## ŞEKİLLER

|                   |                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1</b>  | Gri renkle belirtilen David O Carter tarafından adli mikrobiyolojinin kullanımı hakkındaki açıklanması (Carter ve ark., 2017).                                                                        | 4  |
| <b>Şekil 1.2</b>  | Felsenstein'e (1993) göre maximum-likelihood ağacı; Actinomycetaceae familyesinde tanımlanmış türlerin 16S rRNA genlerinin sekansı kullanılarak aralarındaki ilişkiler gösterilmektedir (Ruan, 2013). | 11 |
| <b>Şekil 1.3</b>  | Ana hücre duvarı bileşenlerine dayanan dört Aktinomiset grubu.                                                                                                                                        | 12 |
| <b>Şekil 1.4</b>  | <i>E. coli</i> 'de 16S rRNA'nın yapısal organizasyonu. Topografi ve ikincil yapı (Stiegler ve ark.,1981).                                                                                             | 14 |
| <b>Şekil 3.1</b>  | B1 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>Şekil 3.2</b>  | B5 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>Şekil 3.3</b>  | B4 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 24 |
| <b>Şekil 3.4</b>  | B1, B4, B5 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.          | 25 |
| <b>Şekil 3.5</b>  | B3 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 30 |
| <b>Şekil 3.6</b>  | B8 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 30 |
| <b>Şekil 3.7</b>  | B9 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 30 |
| <b>Şekil 3.8</b>  | B14 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                         | 31 |
| <b>Şekil 3.9</b>  | B6 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Şekil 3.10</b> | B13 izolatının önden görünüşü                                                                                                                                                                         | 32 |
| <b>Şekil 3.11</b> | B3, B6, B8, B9, B14 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. | 33 |

**Şekil 3.12** B13 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.

40



## ÇİZELGELER

|                     |                                                                                                            |    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.1</b>  | Test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA gen bölgesi dizi analizine göre benzerlik değerlikleri. | 21 |
| <b>Çizelge 3.2</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B1 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 26 |
| <b>Çizelge 3.3</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B4 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 27 |
| <b>Çizelge 3.4</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B5 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 28 |
| <b>Çizelge 3.5</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B3 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 34 |
| <b>Çizelge 3.6</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B6 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 35 |
| <b>Çizelge 3.7</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B8 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 36 |
| <b>Çizelge 3.8</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B9 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.              | 37 |
| <b>Çizelge 3.9</b>  | 16 S rRNA gen bölgesine göre B14 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.             | 38 |
| <b>Çizelge 3.10</b> | 16 S rRNA gen bölgesine göre B13 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği.             | 41 |

## 1. GİRİŞ

Aktinomisetler, Gram-pozitif bakterilerin bir çeşididir ve doğada, özellikle toprakta, yaygın olarak bulunmaktadır. Toprak habitatındaki Aktinomisetlerin çeşitliği; coğrafi konum, organik maddeler ve toprağı işleme gibi faktörlerden etkilense de bazı araştırmacılar sıklıkla kuru alkali toprakta bulunduğunu belirtmişlerdir (Agadagba, 2014). Ayrıca bu bakteri grubu belirgin bir morfolojik özelliğe sahiptir; aerobik, gram pozitif, filamentli (Jeffrey ve ark.,2008) ve G+C içeriği bakımından zengin bir DNA ile % 57-75 arası GC yüzdesine sahiptir (Lo ve ark., 2002). Bu aerobik bakterinin tıbbi ve tarımsal alanlarda ekonomik olarak önemli olduğunu kanıtlamıştır. Tıbbi alanda; insan sağlığı için gerekli bazı metabolitlerin üretilmesinde önemli bir rol oynar ve Dünya’da bulunan antibiyotiklerin yaklaşık % 80’i Aktinomisetlerden üretilir. Özellikle *Streptomyces* ve *Micromonospora* türlerinden birçok antibiyotik ve sekonder metabolit üretilmektedir (Pandey ve ark., 2004). Aktinomisetlerden üretilen bazı antibiyotiklere örnek olarak; Streptomisin, Gentamisin, Rifampisin ve Eritromisin verilebilir (Jeffery ve ark., 2008). Bazı araştırmacılara göre; tarım sektöründe, Aktinomisetlerin topraktan izole edilen ikincil metabolitleri birçok bitki patojenine karşı güçlü bir inhibitör olma potansiyeline sahiptir (Jeffrey ve ark., 2007). Örneğin, Türkiye’nin tarım alanlarından izole edilen Aktinomiset bakterileri, elmada ateş yanıklığı hastalığını (Fireblight) bulaştıran *Erwinia amylovora* bakterilerini inhibe etme kabiliyetine sahiptir. Buna ek olarak, taş tümörü (Crown gall disease) hastalığının kaynağı olan *Agrobacterium tumefaciens*’in büyümesini de inhibe edebilmektedir (Jeffery ve ark., 2008).

Mikroorganizmalar insanların yaşadığı her yerde sıklıkla bulunabildiği için fiziksel açıdan ideal bir kanıt olarak kabul edilmişlerdir. Fakat mikroorganizmaların habitatları

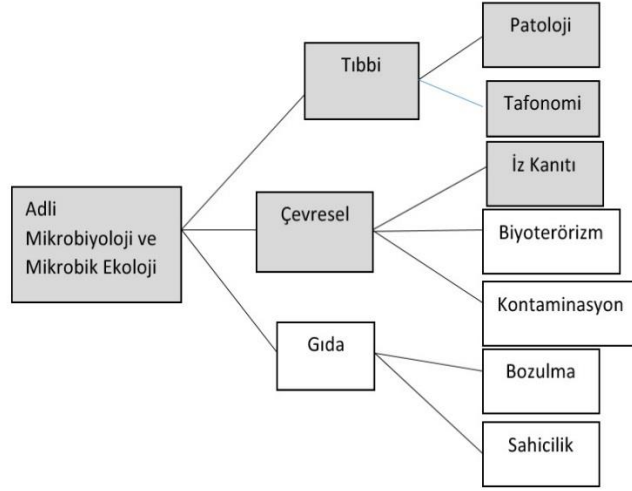
her yerde bulunmamaktadır. Dolayısıyla, onların varlığı, tercih ettikleri yaşam alanlarına bağlıdır. Ayrıca onlar benzersiz bir dayanıklılık seviyesine sahiptir; ekstrem ortamlarda hayatta kalabileceklerinden ve kendilerini son derece dayanıklı bir yapıya dönüştürebileceklerinden dolayı keşfedilme olasılıkları yüksektir. Adli mikrobiyoloji araştırmaları incelendiğinde, birçok bakterinin adli tıpta önemli olduğu görülmektedir. Fakat, araştırma yapılırken sadece üç önemli filuma (Phylum) odaklanılmıştır; Aktinobakteriler, Firmicutes ve Proteobacteria. Her filum önemli türlerden oluşur. Ayrıca adli olarak ta; insan derisinde bulunan bazı türler, gıda ve toprak üzerinde de bulunmaktadır. Bu nedenle adli soruşturmada dikkate alınacak bir kanıt olarak kendini göstermektedir, ancak adli mikrobiyolojinin medikolegal çerçevede kullanılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalar geliştirilmelidir (Carter ve ark., 2017). Bu alanda bulunmakta olan muazzam çabalar ve araştırmalara rağmen, kanın toprak habitatlarının üzerindeki etkisinin araştırılmasında eksiklik vardır. Dinamik bir ortamda mikrobiyal yaşama kabiliyeti onların yaşam belirtilerinin en önemli özelliğidir. Belli mikroorganizmaların tutarlılığı ve hayatta kalma yetilerinde kanın etkisi ve önemi fark edilince, toprak habitatlarında bulunan bakterilerin moleküler taksonomisinde bir referans olarak sunulabilecektir.

Prokaryotlar arasında taksonomik ilişkilerin kurulması için 16S rRNA gen dizilerinin analizleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu genin, izole edilen diğer türlerden elde edilen diziler ile karşılaştırarak, söz konusu prokaryotların doğru bir şekilde sınıflandırılması ve tanımlanması sağlanmaktadır. Yavaş büyüyen bakterilerin büyüme sürelerini kısaltılarak ve klinik teşhisi hızlandırılarak antibiyotik tedavilerine yardımcı olduğu bilinmektedir. Kanla iç içe geçmiş toprak örneklerinden elde edilen izolatların 16S rRNA geni analiz edilince toprak ortamındaki Aktinomiset türlerine, kan ve doğal elementlere maruz kalmanın organizmanın varlığını sürdürülebilirliğini etkileyip etkilemeyeceği konusunda bir ipucu vermesi amaçlanmıştır.

## 1.1. Adli mikrobiyoloji

### 1.1.1. Adli mikrobiyoloji nedir

Adli bilim; hukuk sorunlarında kullanılan bir bilim olarak tanımlanmıştır. Adli bilim uzmanlarının yanı sıra kriminal uzmanlar da olay yerinden elde edilen bulguları, fail ile bilimsel yöntemi karşılaştırılmak için kullanırlar. Benzer bir şekilde adli mikrobiyologlar kanıtları, olay yerine yerleştirmek, bioterrorizm olaylarını incelemek, ölüm nedenini ve zamanını belirlemek için kullanırlar. Olay yeri incelemesinde, adli mikrobiyoloji araştırma yöntemleri kullanılırken mikroorganizmaların büyümesini etkileyen nem, oksijen, sıcaklık, mikroorganizmaların enerji ve besin maddelerine karşı direnci gibi bir kaç parametreye de dikkat edilmesi gerekir. Bu adli alan 2001 yılında ABD’de Antraks saldırısından sonra dikkat çekmeye başlamıştır. Mikrobiyologlar tarafından saldırılarda kullanılmış olan *Bacillus anthracis* sporlarının tespit edilmesi gerekmektedir (Spencer ve ark., 2003). Adli mikrobiyoloji incelemesinde mikroorganizmalar çoğunlukla mekansal kanıt olarak kullanılmıştır. Mekansal kanıt; Locards prensibi kullanarak insanları, nesneler, hastalıklar ve/veya konumlarla ilişkilendirmek için fiziksel bir delil olarak kullanılabileceğini savunmaktadır (Carter ve ark., 2017). Ayrıca, toprak, boya, cam ve elyaf benzer tekniklerle kanıt olarak incelenmek üzere kullanılmaktadır. Ancak, son araştırmalara göre mikroorganizmaların özgünlüklerinden dolayı zamansal kanıt olarak kullanılabilecekleri kanıtlamıştır. Zamansal kanıt; mikroorganizmalarının çevrelerindeki değişikliklere hızlı bir şekilde adapte olabilmesi için yeteneklerini kullanarak ve bu değişiklikleri geçici olarak öngörerek bir tarih şeridi oluşturabileceklerinin bir kanıtıdır. Bu yetenek sayesinde zamansal kanıt olarak ölüm sonrası aralıkları ve insan yerlerinin tahmin edilmesi kolaylaşmaktadır (Carter ve ark., 2017).



**Şekil 1.1** Gri renkle belirtilen David O Carter tarafından adli mikrobiyolojinin kullanımı hakkındaki açıklanması (Carter ve ark., 2017).

### 1.1.2. Bio-suç

2014 yılında yayınlanmış olan Klinik Mikrobiyoloji bülteninde bio-suç, bir hastalığa neden olan toksinin silah olarak bir gruba veya bir insana karşı kullanıldığı bir suç olarak tanımlanmıştır. Bir toksinin silah olarak kullanılmasında iki yaklaşım söz konusudur, bunlar gizli ya da açık operasyon olarak adlandırılmaktadır. Gizli operasyonda ilk kez toksini bir tehdit olarak tanıyan tıbbi bir laboratuvar uzmanı bulunmaktadır, açık operasyonda ise olay yerinde acil durum müdahalesinde bulunan eleman toksini tanıyan ilk kişi olmaktadır (Lehman ve ark., 2014).

Bio-terörizm veya bio-suç'larda bulaşıcı bir kaynağın tanımlanması veya oluşturulması amacıyla mağdurlarda bulunan bulaşıcı kaynağın,

saldırganlardan izole edilenlerle ilişkilendirilmesi önemlidir. Mikrobiyal analizde insan DNA'sının incelenmesinde kullanılan yöntemler vardır. Örnek olarak; mikrosatellite ve minisatellite lokus tipleme analizi, tek-nükleotit polimorfizm analizi ve multilokus sekans analizi gibi analizler verilebilmektedir. İnsanlara göre, bakteri ve virüslerin DNA parmak izlerinin daha zor olduğu açıklanmıştır. Çünkü bakteri ve virüs türleri daha çok tanımlanabilmekte ve teşhis edilebilmektedir. Ayrıca bakteriler haploittir, hızlı ve eşeysiz ürerken rekombinant gen transferi ve yatay gen transferi geçirebilmektedirler (Lehman ve ark., 2014).

ABD'de 2012 yılında bir laboratuvar uzmanı tarafından hepatit C virüsü (HCV) ile hastalar kasıtlı olarak enfekte edildiği şüphesiyle suçlanmıştır. Laboratuvar uzmanı HCV hastasının HCV pozitif olan kanını hastane cihazlarında ve hastalar üzerinde kullanılan şırıngaları kirletmek amacıyla kullanmıştır. Ancak, kaç tane hastanın enfeksiyon riski altında olduğu bilinmemektedir. Şüphelinin çalıştığı New Hampshire Hastanesi'nde tedavi olan 32 hastadan izole edilen HCV suşlarının, şüphelinden izole edilen HVC suşları ile eşleştiği tespit edilmiştir (Montgomery, 2013).

### **1.1.3. İz kanıtı**

Mikroorganizmaların, adli mikrobiyolojideki en yaygın özellikleri mikrobiyolojik alanda kanıt olarak kullanılmalarıdır. Kanıtlar basitçe; Locards prensibi uygulanarak yok denecek kadar az izlerin özellikle mahkemelerde

kullanılabileceğini belirtmiştir. Örneğin; bir saldırgan ormanlık alanda mağdurla buluşmaya giderken aslında bir cinayet işlemek amacıyla yola çıkmıştır. Saldırgan ormanda mağduru beklemiş ve olay yerine vardığında mağdura vurarak onu öldürmüştür. Saldırgan orada beklerken üzerindeki kıyafetler ağaçlara takılmış ve ortamdaki bitki patojeni olan fungus ile kirlenmiştir. Saldırganın arabasında bulunan mantar sporları olay yerinde olduğuna dair izleri desteklemektedir. Bunlar şüphelinin olay yerinde olup olmadığına dair yeterli değildir Ancak, soruşturma sırasında önemli bir kanıt olarak kullanılmıştır (Hawskort ve ark., 2011).

Bugünlerde adli mikrobiyolojinin en önemli sorunu, mikroorganizmalar için bir minimal gelişim eşiği oluşturmaktır (Carter ve ark., 2017). Vass ve arkadaşları (1992) mikrobiyal aktivitenin olmaması için 0° C'yi kullanmıştır. Halbuki Carter ve arkadaşları (2017) bazı mikroorganizmaların ve serbest ekstraselüler enzimlerin aktivitesinin (sırasıyla) 0° C'nin üstünde veya altında da aktif kalabileceğinden dolayı bu yöntemin tamamen doğru olmadığını açıklamışlardır. Birkaç taksondan oluşan basit mikrobiyal topluluklar veya tek sınıftan oluşan mikrobiyal topluluklar kullanılarak adli mikrobiyoloji için minimal bir gelişim eşiği oluşturma mümkün olabileceği açıklansa da ölüm sonrasındaki kanıtlar ve mikrobiyolojik incelemelerdeki mikrobiyal topluluklar karmaşıktır, bu nedenle bu soruna bir çözüm bulmak zordur (Carter ve ark., 2017).

#### **1.1.4. Ölüm zamanı ve nedeninin belirlenmesi**

Adli mikrobiyolojik araştırmalarda birçok bakterinin adli tıp alanında önemli olduğu görülmektedir. Fakat, araştırma yapılarken sadece üç önemli filuma odaklanılmıştır; Aktinobakteriler, Firmicutes ve Proteobacteria. Aktinobakteri filumu insan derisinde, toprak üzerinde ve su ortamlarında da bulunduğu için adli tıpta önemi oldukça fazladır. *Corynebacterium* Aktinobakteriler'in bir alt sınıfıdır ve genellikle toprakta, gıdalar üzerinde, insan derisinde ve insan mukozasında bulunmaktadır. Bu alt sınıf tutarlı ve ilginç bir miktarda gözlenirken ayrıştırıcı materyallerle ilişkilendirilmiştir (Carter ve ark., 2014). rrme aşamaları süresince bakteri kolonizasyonunun, tutarlı ve belirli miktarda kalmasından dolayı adli bilimlerle ilişkilendirilmektedir. Bu yeteneği gösterince dinamik yaşam alanında hayatta kalabileceği anlamına gelir. Bu durum kanıtlar için önemli bir özelliktir (Carter ve ark., 2017). Carter ve arkadaşları (2014) hayvan öldüğü zaman kısa ömürlü besin alımı olduğunda organizmalarda hızlı bir tepki uyandıracakını açıklamıştır. Bu mikroorganizmalar; Bakteria, Archaea ve mikrobiyal karyotlardır. Ayrıca topraktaki mikrobiyal topluluklar besinlerin geri dönüşüm sırasında, özellikle rrmede önemli bir rol oynamaktadır. Bir ceset rrynce organik ve amonyak açısından zengin besinleri salıvermekten dolayı toprağın pH ve besin bileşimini değiştirir ondan dolayı mikrobiyolojik aktivitenin uyarılmasıyla sonuçlanır (Hauther ve ark., 2015). Cesedin rrme bölgesi (CDI); organizmanın büyüklüğüne göre rryen bir cesetin besin ve metabolik yan ürünlerinin yarıçapını oluşturan bir alanıdır. Cesetin çevresindeki yeşil örtüsünün büyümesini bu yarıçap engeller (Carter ve ark., 2007, Weiss ve ark., 2016). İnsan cesedinin rrmesi nedeniyle bakteriler, zorunlu oksijensiz bakteroit gibi bir toprakta 198 güne kadar yüksek konsatrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (Carter ve ark., 2007, 2014, Cough ve ark., 2015, Metcalf ve ark., 2013).

Farelerin rrme hızı iki farklı toprak türünde incelenmiştir. Kullanılan toprak türleri; mikrobiyal olarak zengin olan ve mikrobiyal topluluğu olmayan

(steril) topraktır. Ayrıca, mikrobiyal açıdan zengin bir toprağa gömülmüş olan memeli cesetlerin, bu açıdan zengin olmayan toprağa göre daha yüksek bir çürüme oranına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Deneyde kullanılan farelerde, mikrobiyal açıdan zengin olmayan toprağa gömülmüş olan farelerin, yalnızca gömülü olanlardan 7-10 gün sonra endojen mikrobiyal toplulukları olan toprakta gömülmüş olana kıyasla aktif ve gelişmiş bir şekilde eriştiği gerçeği ortaya konulmuştur (Carter ve ark., 2017).

Ölüm sonrası zaman aralıklarının (PMI) belirlenmesinde medikolegal incelemelerin önemi büyüktür. Genellikle, bir ceset keşfedildiğinde çürüme aşamalarına göre ölüm zamanı (PMI) belirlenebilmektedir (Megyesi ve ark., 2005). Çürüme aşamaları ise; erimiş cilt, ölüm lekesi, ölüm sertliği, şişkinlik, vücut sıvılarının yayılması ve iskeletlenmedir. Nemlilik, rutubet, oksijenin bulunabilirliği, güneş ışığına maruz kalması, ölünün gömülmesi, ölüm şekli ve sebebi ve ceset kompozisyonu gibi bazı faktörler bir cesetin çürüme hızını etkileyebilir (Carter ve ark., 2007; Mann ve ark., 1990). Son zamanlarda çürüme süreçlerinde mikroorganizmaların rolü önem kazanmıştır (Gunn ve Pitt, 2012; Lauber ve ark., 2014). Çürümüş olan cesedin çevresindeki (örneğin toprak) mikroorganizmalar (hem prokaryotik hem de ökaryotik) bu cesedin çürümesinde rol oynarlar. Bağışlık sisteminin işlevi sonlandıktan sonra cesetlerin içinde ve dışında bulunan mikroorganizmalar, cesedin dokularını ve yağlarını parçalamaya başlar (Janaway ve ark., 2009). Mikroorganizmaların çürümesinde rol oynama yeteneğine sahip olduğu tespit edildikten sonra bahsedilen mikroorganizmaların bolluk, varlık ve transmigasyonunun olup olmadığı PMI'nın tahmininde kullanılabilir mi diye bir soru ortaya çıkmıştır (Carter ve ark., 2017).

Bir ceset ormanlık bir ortama atıldığı zaman adli mikrobiyolojik vaka olarak kullanabilmektedir (Hawksworth ve ark., 2011). Bu durumda, cesetteki kan eksikliğine göre mağdurun başka bir yerde öldürüldüğü ve ormana atıldığı tespit edilmiştir. Adli mikrobiyoloji kullanarak cesetteki çamur incelenirken cesedin yakınındaki akıntıdan sürüklenmiş olduğu tespit edilerek sakatlanmış batın incelediğinde onun üzerinde büyüyen sporlar üretmeyen *Mucor biemalis* mantarının kolonisine rastlanılmıştır. *Mucor* yeni bir ölen organlarda yetişmez ve normalde ölümden 1 hafta sonra gözlenir. Küçük ve olgunlaşmamış koloniye göre mantarın yaklaşık 1-2 gün önce büyüdüğünü ifade etmiş ve mantarın miselyumun bozulmamış durumda olduğu için küf oluşumunun vücut sürüklendikten sonra ve keşfedilmeden 2 gün önce gerçekleştiği gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre ceset ormana atılmadan bir hafta önce öldürülmüştür (Hawksworth ve ark., 2011).

Adli incelemelerde ölüm sebebini belirlemek çok önemlidir. “Bu insan cinayete mi kurban gitti yoksa doğal sebeplerden mi öldü?” sorusuna net cevap verilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra, olası durumlar için destekleyici bilim dallarından yardım alınmaktadır. Örneğin; boğulma şüphesi olan bir olayda; boğulmanın ölüm sebebi olup olmadığını belirlenmek için adli mikrobiyolojinin kullanımı çok faydalı olabilir. Adli mikrobiyologlar tarafından, boğulan mağdurların kan ve doku örnekleri incelenmektedir. Suda bulunan cesetlerin üzerindeki bakteri türlerinin ve bakteriyoplankton varlığı araştırılmaktadır. (Kazizaki ve ark., 2011).

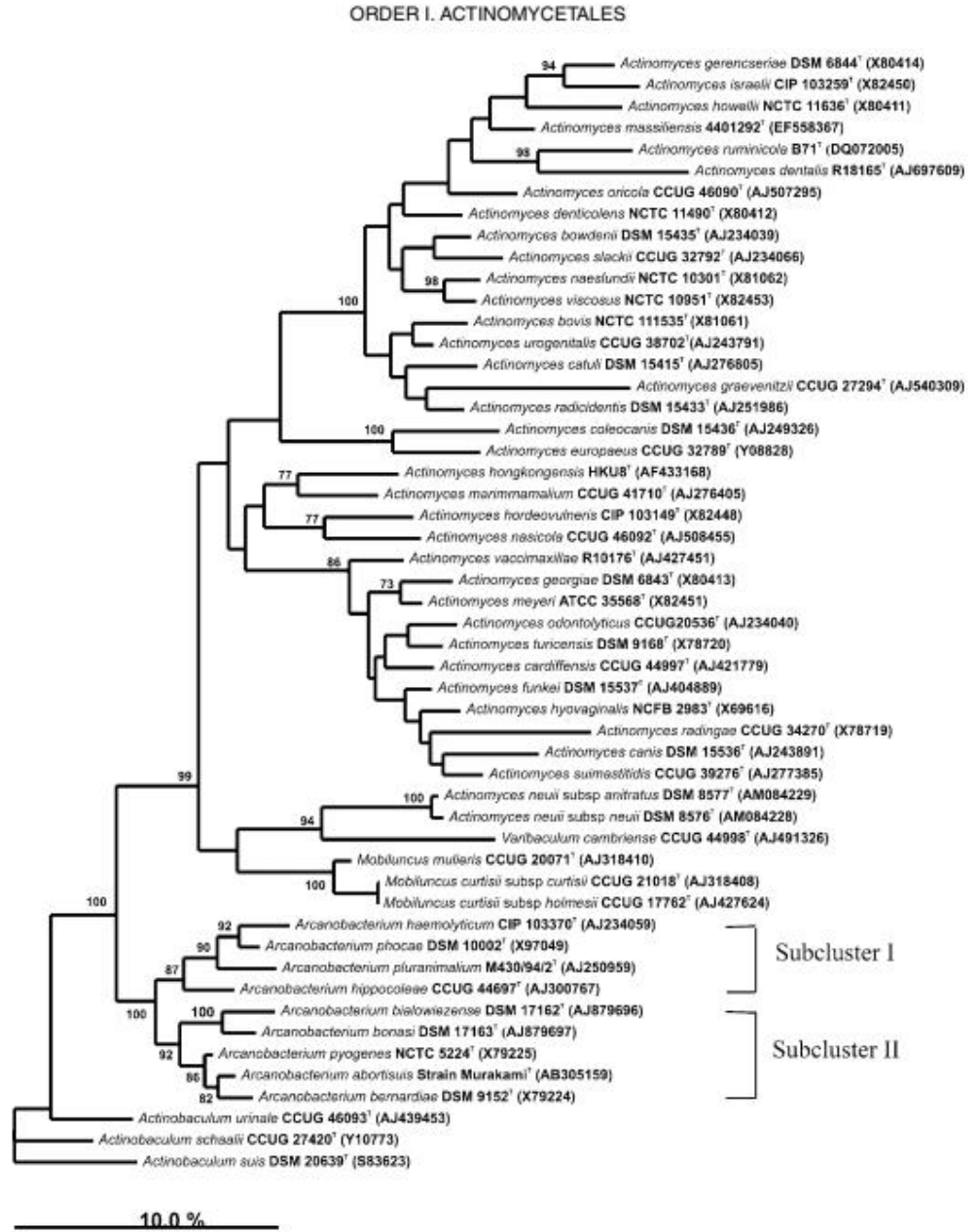
## 1.2. Aktinobakteriler

Aktinobakteriler hem antibiyotik üretiminde ekonomik olarak hem de her habitatta bulunabilmesi sebebiyle çok önemli organizmalardır. Ruan'e (2013) göre Aktinobakteri filumu 6 kategoriye ayrılmıştır; *Aktinobakteriler*, *Asidimikrobi*, *Coriobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* ve *Thermoleophilia* (Ruan, 2013). Aktinobakteri sınıfı ayrıca 16 dereceye ayrılmıştır; *Actinomycetales*, *Actinopolysporales*, *Bifidobacteriales*, *Catenulisporales*, *Corynebacteriales*, *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Kineosporiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Incertae sedis*. Bu bakteriler ya aerobik ya fakültatif ya da anaerobik gram pozitif bakterilerdir. Muramik asit veya teikoik asit içeren sert bir hücre duvarına sahip oldukları bilinmektedir. Aktinobakterilerin çoğunluğu kemo-organotroflar oldukları için pH'ı nötr ortamlarda yetişebildikleri gözlenmiştir. Fakat, bazıları asidofilik ya da alkalofilik davranışlar sergilemiştir. Ayrıca, bu filumdaki bazı bakteriler termofilik bazılarının ise halofilik oldukları bilinmekte ve her grubun farklı morfolojik özellikleri bulunmaktadır. Örneğin; aynı filumda şekil olarak; kok (cocci) gibi morfolojik özellikleri oldukça farklılaşmış fenotipik olarak çeşitlilik gösteren bakteriler bulunabilmektedir (Ruan, 2013).

### 1.2.1 Aktinomiset

*Actinomycetales* takımı dört familya da incelenmektedir; *Streptomycetaceae*, *Actinomycetaceae*, *Actinoplanaceae* ve *Myxobacteriaceae*. Klavuzda da *Actinomycetales* takımının filogenisi, 16S rRNA dizi analizi ve aileye özgü (Family-specific) 16S rRNA nükleotit dizi deseni kullanılarak belirlenmiştir (Ruan, 2013). Maksimum likelihood (ML) algoritmasına dayanarak (Felsenstein, 1993) bakterilerin kendi

aralarındaki ilişkiler ve dereceler aşağıdaki gibi yorumlanmıştır (Schaal ve ark., 2006):



Şekil 1.2 Felsenstein'e (1993) göre maximum-likelihood ağacı; Actinomycetaceae familiesinde tanımlanmış türlerin 16S rRNA genlerinin sekansı kullanılarak aralarındaki ilişkiler gösterilmektedir (Ruan, 2013).

*Streptomycetacea* ve *Actinomycetaceae* aileleri çoğunlukla Aktinomiset'ten oluşmuştur ve ana hücre duvarı yapısına (biyokimyasal parametreler) dayanarak Aktinomiset'i içeriğindeki şeker yapısına göre dört grupta sınıflandırmıştır:

| Hücre duvarı tipi | Şeker Deseni                        | Cinsler                                                  |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| I                 | Özel şeker deseni yoktur            | <i>Streptomyces</i> ,<br><i>Streptoverticillium</i> , vb |
| II                | Araginose, Xylose<br>(monosakkarit) | <i>Aktinoplanes</i> , <i>Mikromonospora</i> ,<br>vb      |
| III               | Şeker bulunmamaktadır               | <i>Dermatofilus</i> , <i>Planomonospora</i> ,<br>vb      |
| IV                | Galaktoz, Arabinoz                  | <i>Mykobakterium</i> , <i>Nocardia</i> , vb              |

**Şekil 1.3** Ana hücre duvarı bileşenlerine dayanan dört Aktinomiset grubu (Ruan, 2013).

Aktinomiset; heterojen aerobik fakültatif bir bakteri grubu olarak tanımlanmıştır ve toprakta iplik benzeri filamentli büyüme şekilleriyle bulunmaktadır. Doğada yaygın olarak bulunup genellikle yeni kazılmış toprağın “topraklı” kokusuyla ilişkilendirilirler. Birçok ekosistemde yaygın bir şekilde dağılmış olmasına rağmen öncelikle toprak sakinleri olarak sınıflandırılmıştır. Derin deniz sedimentlerinde veya Mariana Çukuru gibi su ekosistemlerinde de gözlenmiştir (Chamikara, 2016).

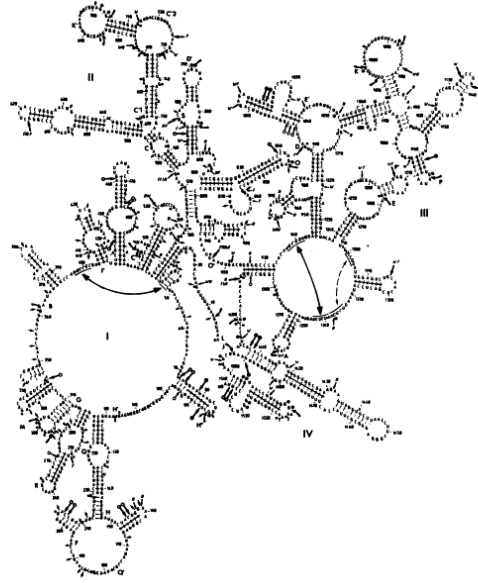
*Actinomycetaceae* familyası Gram-pozitif, DNA'sında, G+C içeriği % 55 ile 71 arasında dağılım gösteren canlılar olarak tanımlanabilmektedir. Filamentli ya da çubuk biçimli, dallanan, koko-basil ya da kokoid ve hareketsiz mikroorganizmalardır. Bu grupta, optimum bir şekilde büyümek için eklenen CO<sub>2</sub> ile havada veya 36±1 °C sıcaklıkta anaerobik olarak büyüyen

canlılar bulunmaktadır. Ancak yalnızca *Aktinomyces rumincola* 46 °C sıcaklıkta en iyi şekilde büyüebilmektedir (Schleifer ve Kandler, 1972; Schleifer ve Seidl, 1985). Bu türün peptidoglikan yapısı A5 $\alpha$ , A5 $\beta$  ya da A4 tipidir. Hücre duvarları özel karakteristik şekerlere sahiptir; Bunlardan bazıları; galaktoz, glikoz, mannoz, ramnoz ve 6-ksiloz'dur. Bu grupta arabinoz şekeri bulunmaz. Solunum kinonları doymun menaquinonların 8, 9 ve 10 (MK-8, -9, -10) izopren ünitesi ile farklı kombinasyonlarından oluşabilmektedir. Ancak, bazı türler metilenmiş MK-10 içerirler. Bu canlıların sınıflandırılmasında fosfolipidin iki türü dikkat alınır, tip I ve tip III . Tip I, tanısal fosfolipidlere sahip değildir. Ancak, tip III fosfolipide sahip organizmalar fosfatidilkolin içermektedir (Lechevalier ve ark., 1977). Şimdiye kadar incelenmiş olan bütün türlerde gözlenen fosfolipidler; difosfatidilgliserol, fosfatidilgliserol, fosfatidilinositol ve fosfatidilmannoz'lardır. Bazı türler düz zincirli doymun ve tekli doymamış yağ asitleri sergilemiştir ve bunlar genellikle uzun zincirli hücre yağ asitleri olarak tanımlanır. Bazı türlerde ya iso-metil-dallı ya anti-iso-metil-dallı ya da siklopropan halkası ilave edilmiş yağ asidi türleri bulunmaktadır (Ruan, 2013).

### 1.3 16S rRNA analizi

16S rRNA gen analizi toprakta bulunan bakterileri tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş kapsamlı veriler üretilerek, veritabanlarında var olan muhtemel varyasyonların tespit edilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Ancak, toprakta bulunan bakteri türlerinin sayısının fazla olması yüzünden analizler zor olabilir. Bilim adamları bakteri incelemesinde 16S rRNA gen analizi kullanmayı tercih ederler (Carter ve ark., 2017). Mikrobiyal çeşitliliğin ve sınıflandırmanın incelenmesinde ve bakterilerin tanımlanmasında bir filogenetik belirteç olarak 16S rRNA gen dizi analizi kullanılır (Woese, 1987, Schroeder ve ark., 2001). 16S

rRNA geni yüksek derecede korunumlu nükleotit dizilerinden oluşur. Bazı değişken nükleotit bölgeleri bulunmaktadır. Bu değişken bölgeler cins ya da türe özgü olabilir (Jenkins ve ark., 2012). PCR primerleri kullanılarak rRNA'nın korunumlu bölgeleri veya hedeflenen genin değişken dizileri çoğaltılarak analiz edilebilmektedir (Relman, 1999).



**Şekil 1.4.** *E. coli*'de 16S rRNA'nın yapısal organizasyonu. Topografi ve ikincil yapı (Stiegler ve ark., 1981).

Clarridge (2004)'e göre PCR'dan elde edilen nükleotid dizileri analiz edilince, veritabanında mevcut olan sekanslar ile karıştırılarak bakteriler tanımlanabilir. Ancak, mikroorganizmaların karakterizasyonunda bazı parametrelerin (kemotaksonomik özellikler gibi) ayrıştırıcı olması nedeniyle ve güvenli bir prokaryotik taksonomi sistemi olmadığından dolayı mikroorganizmaların bir tür ya da alt tür düzeyinde sınıflandırılması zorlaşmaktadır (Kim ve ark., 2011). Buna rağmen 16S rRNA dizi mikroorganizmaların sınıflandırılması için fenotipik gözlemlere dayanan bir sınıflandırmadan daha iyidir (Carter ve ark., 2017). Son yirmi yılda 1,3 milyondan daha fazla bakterinin ve 54,000 arkenin 16S rRNA gen

dizileri arşivlenmiştir. Bu diziler hem laboratuvarıda kültür yapılan hem de kültür yapılmayan prokaryotlardan elde edilmiştir (Cole ve ark., 2013).

Son adlı araştırmalarda, çürüme aşamalarının incelemedesinde mikrobiyal toplulukların önemi gösterilmek için molekül bazlı bir analiz metodu kullanılarak çürüme aşamaları araştırılmaktadır. Örneğın, rme esnasındaki mikrobiyal toplulukların gösterilmesi için bir kobay fare denemesinde  çeşit toprak kullanılmıştır; l toprağı, ayır ve orman toprağı. Fare cesetleri topraktan alındıktan 10, 20 ve 30 gün sonra belirgin mikrobiyal çeşitlilik gözlenmiştir. 16S rRNA, 18S rRNA ve ITS bölgelerinin analizleri yapılmıştır. 16S rRNA dizileri, dünyanın her yerinden, farklı habitatlardan ve insanların mezar topraklarından elde edilen 16S rRNA bilgileri ile birleştirilmiştir. 16S rRNA analizleri kullanarak, mezar toprakları büyük ölçüde mezar olmayan topraklardan ayırt edilebilmektedir (Metcalf ve ark., 2016, Carter ve ark., 2017).

Topraktaki mikroganizmaların biyoçeşitliliğe birkaç faktörler eklenebilir. Bu faktörler; toprağın kimyasal ve/veya biyolojik değişiklikleri, organik maddeler maruz kalma, güneş ışığına maruz kalma, sıcaklık değişiklikleri ve besin maddeleri için rekabetleri vb. dolayısıyla, toprağın mikrobik çeşitliliğinin değişmesine neden olur, bu nedenle mikrobiyolojik bulgular kapsamlı bir şekilde incelemeli ve analiz edilmelidir. Bu çalışmada; bir hafta boyunca kana maruz bırakılmış toprak örneklerinden, seçici besi yeri kullanarak yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatların, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri yapılarak hangi türlerin bulunduğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Çalışacak kanların temini ve toprak uygulaması**

Yapay cinayet mahalli oluşturmak ve çalışmada kullanabilmek amacıyla Ankara Liv Hospital Hastahanesi Biyokimya ve Hematoloji Laboratuvarından, gönüllü donörler tarafından verilen ancak nakil tarihi dolmuş kanlardan 2 ünite temin edilmiştir. Çalışma sahası olarak Ankara Üniversitesi Tandoğan Kampüsü, Fen Fakültesi bahçesinde çok fazla hareketin olmadığı ağaçlık bir alan seçilmiştir. Seçilen alanın doğal ortama yakın olmasına dikkat edilerek daha sonra, temin edilen kanlar seçili bölgeye uygulanmıştır ve toprağın 7 gün süre ile doğal koşullarda inkübasyonu sağlanmıştır. 7. gün kana maruz kalmış topraktan ve kana maruz kalmamış topraktan numuneler alınarak bakteriyel izolasyon yapılmıştır.

### **2.2. Dilüsyon plak tekneği ile topraktan bakteri izolasyonu**

Kana maruz kalmış toprak örneklerinden 1g tartılarak, içerisinde cam boncuk ve 9 ml steril ringer çözeltisi bulunan şişelere aktarılmıştır. Hazırlanan  $10^{-10}$ 'luk solüsyonlar toprak kolloidlerine tutunmuş mikroorganizmaların sporlarını ve misellerini kolloidlerinden ayırmak için 30 dakika süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra istenmeyen vejetatif formların kontaminasyonunu azaltmak için  $55^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Seri dilüsyonlar şeklinde seyreltilen toprak

örneklerinden, 0.1 ml alınarak Cycloheximide (50µg/ml), Rifampisin (0.5µg/ml) ve Nystatin (50µg/ml) antibiyotiği ilave edilmiş (GYME) glikoz yeast malt agar (pH:7,2; yeast ekstrakt, 4.0 g/L; malt ekstrakt, 10.0 g/L; glukoz, 4.0 g/L; agar, 20 g/L) inoküle edilmiştir. İnokülasyonda yayma plaka yöntemi kullanıldı. İnokülasyon yapılan petriler; 28°C’de 14 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Shirling ve Gottlieb, 1966; Weyland 1981).

### **2.3. İzolatların seçimi, saflaştırılması ve saklanması**

GYME agarda 14 günlük inkübasyon sonunda karşılaştırmalı koloni morfolojileri dikkate alınarak aktinomiset ve nadir aktinomiset olabilecek izolatlar seçilecek, seçilen koloniler aseptik koşullarda cycloheximide (50 µg/ml) ilaveli GYME agar’a (pH:7,2; yeast ekstrakt, 4.0 g/L; malt ekstrakt, 10.0 g/L; glukoz, 4.0 g/L; agar, 20 g/L) çizgi ekim metodu ile aktarıldı. 28°C’de 14 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnküasyon sonrasında saf olarak elde edilen izolatların sporları ve miselyumları %20’lik gliserol içeren otoklavlanmış vidalı kapaklı tüplere steril kürdan ile transfer edilip ve -20 °C de muhafaza edildi.

### **2.4. Pellet elde edilmesi**

-20 °C de saklanan izolatlar cycloheximide (50 µg/ml) ilaveli GYME agar ortamında aktiveleştirildikten sonra, antibiyotik ilavesiz GYME brotha steril öze yardımı ile ekildi ve çalkalamalı inkübatörde 7 günlük inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin saflığı için antibiyotik ilavesiz Gyme agar'a ekim yapıldı. İnkübasyon sonrasında 1,5 'lik ependorflara aktarılan hücreler 13000 rpm'de çöktürüldü ve steril TE ile yıkandı. Bu işlem 2 defa tekrarlandıktan sonra çökelmiş izolatlar ddH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve DNA izolasyonuna kadar -20 °C'de saklandı.

## **2.5. Genomik DNA izolasyonu**

İzolatların DNA'ları CTAB (Wilson, 2001) yöntemiyle manuel olarak gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların saflık derecesi Thermo Nanodrop Light-spectrophotometer cihazında ölçülerek kaydedildi. Görüntüleme amacıyla %1'lik agaroz jel ile elektroforez yapıldı ve UV-Transilimünatör de DNA bantlarını görüntülenmesi sağlandı. CTAB izolasyonu yapılmak için kullanılan malzemeler; TE tamponu, %10 sodyum dodecyl sülfat (SDS), 20 mg/ml proteinaz K, 5 M NaCl, CTAB/NaCl solüsyonu, 24:1 kloroform/izomil alkol, 25:24:1 fenol/kloroform/izomil alkol, izopropanol ve %70'lik etanol.

### Uygulama:

1. Kültürlerden 1.5 ml alınarak 2 dakika mikrosantrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
2. Pelletlere 567 µl TE tomponu eklenerek, süspansiyon haline getirildi. %10 SDS solüsyonundan 30 µl ve 20mg/ml proteinaz K dan 3 µl eklenerek nihai konsantrasyon 100 µg/ml'a getirildi. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C derecede 1 saat inkübasyona bırakıldı.

3. 1 saatin ardından, 5 M NaCl solüsyonundan 100 µl alınarak solüsyona eklendi.
4. CTAB/NaCl solüsyonundan 80 µl alınıp karışım ile karıştırıldıktan sonra 65 °C derecede 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Yaklaşık eşit miktarda kloroform/izomilalkol (0.7 ile 0.8 ml) karışıma eklenerek karıştırıldıktan sonra 4 ile 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Sulu ve viskoz süpernantı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. 650 µl fenol/kloroform/izomil alkol eklendi. 5 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj edildi.
7. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi ve çökeltmek için 0.6 ml izopropanol eklendi. DNA çökeltisi oluşuna kadar tüp alt-üst edildi. Ardından 5 dakika boyunca 5000 rpm’de santrifüj edildi.
8. CTAB kalıntısı gidermek için DNA çökeltisi %70 etanol ile yıkandı ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj edildi.
9. Sonra süpernatantı dikkatlice alınıp pellet kurumak için bırakıldı.
10. 100 µl TE tamponu içinde pellet çözöldü ve UV transilimünatörde gözlemlendi.

## **2.6. 16S rRNA gen bölgesi ve PCR amplifikasyonu**

Genomik DNA izolasyonu tamamlanan test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi PCR amplifikasyonları 27F ve 152R evrensel primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Lane, 1991). Hazırlık aşamasında, 50 µl çözelti için, 25 µl Hot Start Master Mix, 1 µl (10 pmol/µl) 27F primeri, 1 µl (10 pmol/µl) 1525R primeri, 2 µl kalıp (50-70 ng/µl) DNA ve 21 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. Reaksiyon şartları, 95°C’de 2’ (ön denatürasyon), 95°C’de 1’, 55°C’de 1’, 72°C’de 1’ (30

döngü) ve 72°C’de 5' olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri kullanıma kadar -20°C’de muhafaza edildi.

## **2.7. 16S rRNA ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizi**

PCR amplifikasyon ürünleri %1,5’lik agaroz jelde DNA markör ile birlikte 100 volta 30 dakika yürütülerek UV-transilimünatör ile görüntülendi. İstenilen büyüklükte elde edilen bantların saflaştırılması için Fermentas PCR pürifikasyon kiti kullanıldı. DNA dizi analizi EpiGen Fırmasın tarafından gerçekleştirildi.

## **2.8. 16S rRNA dizi verilerinin analizi**

İzolatların 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi tamamlandıktan sonra hangi cinse ve türe ait olduğu belirlendi. Eztaxon server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim vd., 2011)’da bulunan global hizalama algoritmaları kullanarak izolatların en yakın akraba organizmalarla olan 16S rRNA nükleotit benzerliği belirlendi. Filogenetik analizler için MEGA X, hizalama için ise aynı programın CLUSTAL\_W (Kumar vd., 2007) seçeneği kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ

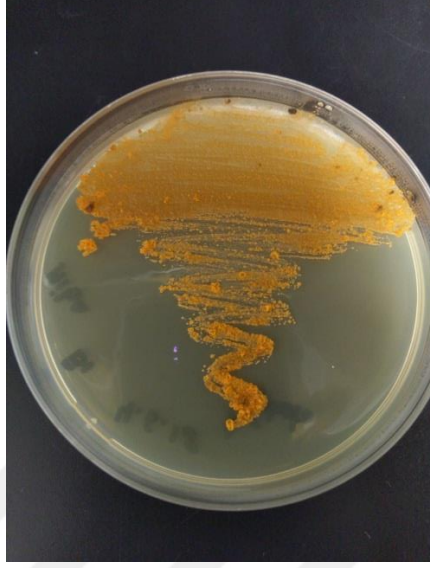
Kana maruz kalmamış topraktan (Kontrol grubu) yapılan izolasyon sonucunda aktinomiset olabileceği düşünülen bakteri izole edilememiştir. Ancak, kana maruz kalmış topraktan yapılan izolasyon sonucunda GYME besiyerinden 14 bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler B1'den B14'a kadar adlandırılmıştır. Çizelge 3.1'de test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA gen bölgesi dizi analizine göre benzerlik değerleri verilmektedir.

**Çizelge 3.1** Test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA gen bölgesi dizi analizine göre benzerlik değerlikleri

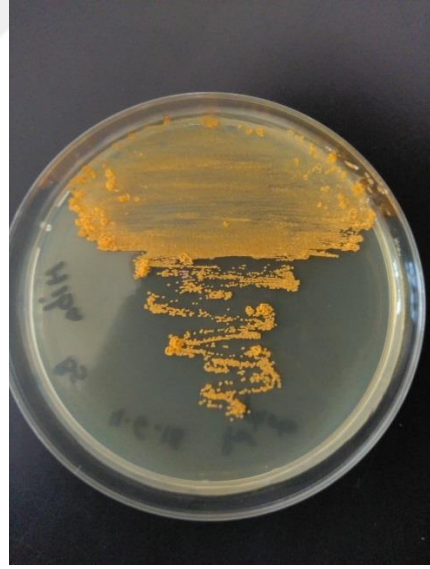
|           | En Yakın Tip Türleri               | Gen Bank No | % Benzerlik |
|-----------|------------------------------------|-------------|-------------|
| <b>B1</b> | <i>Micromonospora saelicesenis</i> | AJ783993    | 97.74       |
|           | <i>Micromonospora ureilytica</i>   | FN658641    | 97.66       |
|           | <i>Micromonospora profundı</i>     | KF494813    | 97.58       |
| <b>B3</b> | <i>Streptomyces pratensis</i>      | JQ806215    | 96.69       |
|           | <i>Kitasatospora cinereorects</i>  | AB184646    | 96.53       |
|           | <i>Streptomyces halstedii</i>      | AB184142    | 96.45       |
| <b>B4</b> | <i>Micromonospora saelicesenis</i> | AJ783993    | 97.92       |
|           | <i>Micromonospora ureilytica</i>   | FN658641    | 97.84       |
|           | <i>Micromonospora profundı</i>     | KF494813    | 97.76       |
| <b>B5</b> | <i>Micromonospora saelicesenis</i> | AJ783993    | 95.83       |
|           | <i>Micromonospora vinacea</i>      | FN658651    | 95.58       |

|            |                                                      |          |       |
|------------|------------------------------------------------------|----------|-------|
|            | <i>Micromonospora zamorensis</i>                     | LT607755 | 95.41 |
| <b>B6</b>  | <i>Streptomyces halstedii</i>                        | AB184142 | 96.43 |
|            | <i>Streptomyces pratensis</i>                        | JQ806215 | 96.36 |
|            | <i>Kitasatopora cinereorecta</i>                     | AB184646 | 96.35 |
| <b>B8</b>  | <i>Streptomyces pratensis</i>                        | JQ806215 | 96.27 |
|            | <i>Streptomyces griseus</i> subsp.<br><i>griseus</i> | M76388   | 95.96 |
|            | <i>Streptomyces fluvissimus</i>                      | CP005080 | 95.87 |
| <b>B9</b>  | <i>Streptomyces griseus</i> subsp.<br><i>griseus</i> | M76388   | 96.38 |
|            | <i>Streptomyces pratensis</i>                        | JQ806215 | 96.31 |
|            | <i>Kitasatopora cinereorecta</i>                     | AB184646 | 95.91 |
| <b>B13</b> | <i>Actinomadura crenea</i>                           | AF134067 | 96.26 |
|            | <i>Actinomadura apis</i>                             | AB557596 | 95.54 |
|            | <i>Actinomadura deserti</i>                          | MF972517 | 95.12 |
| <b>B14</b> | <i>Streptomyces pratensis</i>                        | JQ806215 | 97.46 |
|            | <i>Streptomyces halstedii</i>                        | AB184142 | 97.27 |
|            | <i>Kitasatopora cinereorecta</i>                     | AB184646 | 97.27 |

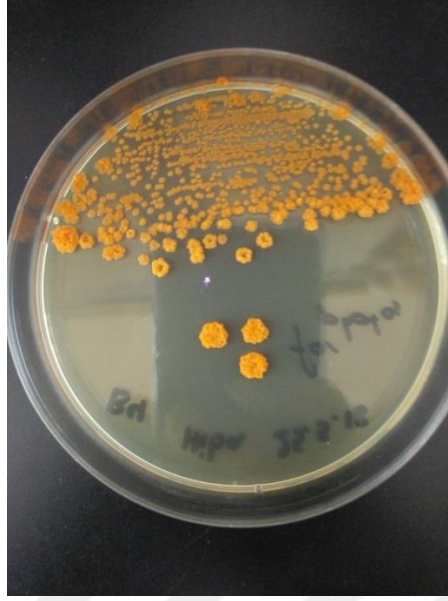
B1 izolatı düz, düzensiz turuncu koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.1) ve izolatın %97,94 benzerlikle en yakın akrabası *Micromonospora saelicesenis*'tir (Çizelge 3.1). Benzer bir şekilde B5 izolatı B1 izolatı ile aynı morfolojik özellikleri sahiptir fakat bazı bölgelerde krateriform olarak tanımlanabilir (Şekil 3.2) ve B5 izolatın %95,83, %95,58 benzerlikler, sırasıyla, en yakın akrabası da *Micromonospora saelicesenis* ve *Micromonospora vinacea*'dır (Çizelge 3.1). B4 izolatı ise B1 ve B5 izolatları ile aynı morfolojik özelliklere de sahiptir ancak, izolat düzensizdir ve krateriform bir büyüme deseni göstermiştir (Şekil 3.3). İzolatın %97,92 benzerlikle en yakın akrabası da *Micromonospora saelicesenis*'tir (Çizelge 3.1).



**Şekil 3.1** B1 izolatının önden görünüşü.

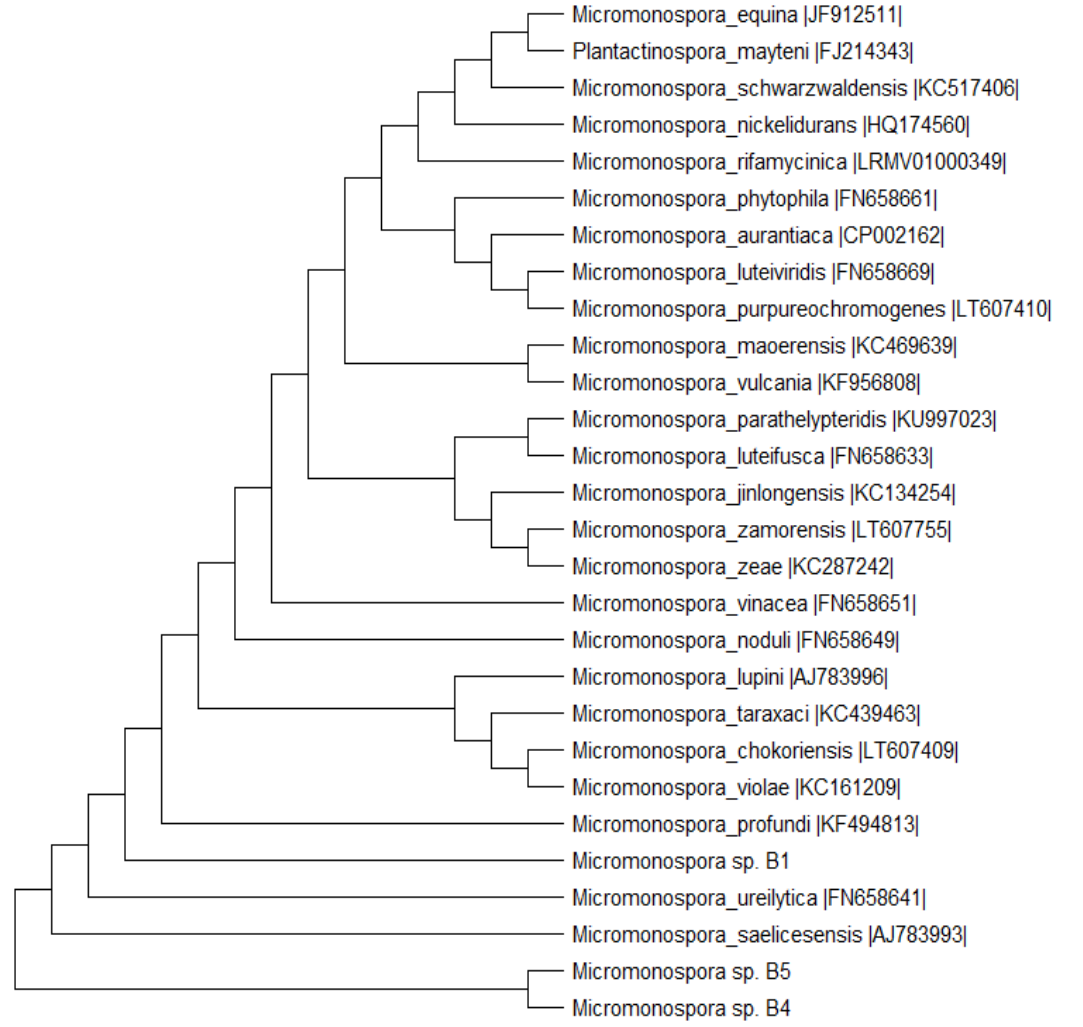


**Şekil 3.2** B5 izolatının önden görünüşü.



Şekil 3.3 B4 izolatının önden görünüşü.

Şekil 3.4’te görülen filogenetik soy ağacına göre B1, B4, ve B5 izolatları tümü *Micromonospora* cinsi üyesi oldukları tespit edilmiştir. *Micromonospora* sp. B4 ve *Micromonospora* sp. B5’in yakın ilişki olduğu; *Micromonospora* sp. B4 ve *Micromonospora* sp. B5, *Micromonospora* sp. B1 ile ortak soyu paylaştığını göstermektedir.



**Şekil 3.4** B1, B4, B5 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.2** 16S rRNA gen bölgesine göre B1 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Micromonospora sp. B1 | Sıra | Bakteri                                 | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotit /Total Nükleotit | p-Distance mesafeleri |
|-----------------------|------|-----------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
|                       | 1    | <i>Micromonospora saelicesensis</i>     | AJ783993           | 97,74                    | 27/1196                           | 0,016                 |
|                       | 2    | <i>Micromonospora ureilytica</i>        | FN658641           | 97,65                    | 28/1196                           | 0,017                 |
|                       | 3    | <i>Micromonospora profundu</i>          | KF494813           | 97,57                    | 29/1196                           | 0,018                 |
|                       | 4    | <i>Micromonospora noduli</i>            | FN658649           | 97,49                    | 30/1196                           | 0,019                 |
|                       | 5    | <i>Micromonospora vinacea</i>           | FN658651           | 97,49                    | 30/1196                           | 0,019                 |
|                       | 6    | <i>Micromonospora chokoriensis</i>      | LT607409           | 97,24                    | 33/1196                           | 0,023                 |
|                       | 7    | <i>Micromonospora zamorensis</i>        | LT607755           | 97,15                    | 34/1196                           | 0,023                 |
|                       | 8    | <i>Micromonospora violae</i>            | KC161209           | 97,15                    | 34/1195                           | 0,023                 |
|                       | 9    | <i>Micromonospora zeae</i>              | KC287242           | 97,07                    | 35/1196                           | 0,023                 |
|                       | 10   | <i>Micromonospora parathelypteridis</i> | KU997023           | 96,90                    | 37/1196                           | 0,025                 |
|                       | 11   | <i>Micromonospora luteifusca</i>        | FN658633           | 96,90                    | 37/1196                           | 0,025                 |
|                       | 12   | <i>Micromonospora phytophila</i>        | FN658661           | 96,90                    | 37/1195                           | 0,025                 |
|                       | 13   | <i>Micromonospora jinlongensis</i>      | KC134254           | 96,82                    | 38/1196                           | 0,026                 |
|                       | 14   | <i>Micromonospora taraxaci</i>          | KC439463           | 96,82                    | 38/1196                           | 0,027                 |
|                       | 15   | <i>Micromonospora nickelidurans</i>     | HQ174560           | 96,79                    | 38/1184                           | 0,027                 |
|                       | 16   | <i>Micromonospora equina</i>            | JF912511           | 96,77                    | 38/1179                           | 0,027                 |

*Micromonospora* sp. B1 izolatına ait, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en çok nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Sonuçlara göre; 1196 nükleotit arasından 27 nükleotitlik fark ve % 97,74 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Micromonospora saelicesensis*’tir. *Micromonospora saelicesensis* ve *Micromonospora* sp. B1 izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,016 olarak belirlenmiştir. 28 ve 29 nükleotit farkla ve % 97,65 ve % 97,57

benzerlik ile *Micromonospora ureilytica* ve *Micromonospora profundu* sırasıyla 0,017 ve 0,018 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

**Çizelge 3.3.** 16S rRNA gen bölgesine göre B4 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Micromonospora sp. B4 | Sıra | Bakteri                                 | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/ Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|-----------------------|------|-----------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
|                       | 1    | <i>Micromonospora saelicesensis</i>     | AJ783993           | 97,92359                 | 25/1204                           | 0,021                 |
|                       | 2    | <i>Micromonospora ureilytica</i>        | FN658641           | 97,84053                 | 26/1204                           | 0,021                 |
|                       | 3    | <i>Micromonospora profundu</i>          | KF494813           | 97,75748                 | 27/1204                           | 0,022                 |
|                       | 4    | <i>Micromonospora noduli</i>            | FN658649           | 97,67442                 | 28/1204                           | 0,023                 |
|                       | 5    | <i>Micromonospora chokoriensis</i>      | LT607409           | 97,42525                 | 31/1204                           | 0,026                 |
|                       | 6    | <i>Micromonospora vinacea</i>           | FN658651           | 97,42525                 | 31/1204                           | 0,023                 |
|                       | 7    | <i>Micromonospora violae</i>            | KC161209           | 97,33998                 | 32/1203                           | 0,027                 |
|                       | 8    | <i>Micromonospora zamorensis</i>        | LT607755           | 97,09302                 | 35/1204                           | 0,027                 |
|                       | 9    | <i>Micromonospora phytophila</i>        | FN658661           | 97,09061                 | 35/1203                           | 0,029                 |
|                       | 10   | <i>Micromonospora zeae</i>              | KC287242           | 97,00997                 | 36/1204                           | 0,028                 |
|                       | 11   | <i>Micromonospora taraxaci</i>          | KC439463           | 97,00997                 | 36/1204                           | 0,030                 |
|                       | 12   | <i>Micromonospora parathelypteridis</i> | KU997023           | 97,00997                 | 36/1204                           | 0,030                 |
|                       | 13   | <i>Micromonospora maoerensis</i>        | KC469639           | 96,84385                 | 38/1204                           | 0,032                 |
|                       | 14   | <i>Micromonospora luteifusca</i>        | FN658633           | 96,84385                 | 38/1204                           | 0,029                 |
|                       | 15   | <i>Micromonospora jinlongensis</i>      | KC134254           | 96,7608                  | 39/1204                           | 0,030                 |
|                       | 16   | <i>Micromonospora luteiviridis</i>      | FN658669           | 96,7608                  | 39/1204                           | 0,033                 |
|                       | 17   | <i>Micromonospora vulcania</i>          | KF956808           | 96,7581                  | 39/1203                           | 0,033                 |
|                       | 18   | <i>Micromonospora lupini</i>            | AJ783996           | 96,7581                  | 39/1203                           | 0,030                 |
|                       | 19   | <i>Micromonospora nickelidurans</i>     | HQ174560           | 96,72269                 | 39/1190                           | 0,033                 |

*Micromonospora* sp. B4 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en çok nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.3'te verilmiştir. Sonuçlara göre; 1204 nükleotit arasından 25 nükleotitlik fark ve % 97,92 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Micromonospora saelicesensis* 'tir. *Micromonospora saelicesensis* ve *Micromonospora* sp. B4 izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,021 olarak belirlenmiştir. 26 ve 27 nükleotit farkla ve % 97,84 ve % 97,75 benzerlik ile *Micromonospora ureilytica* ve *Micromonospora profundu* sırasıyla 0,021 ve 0,022 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

**Çizelge 3.4** 16S rRNA gen bölgesine göre B5 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

|                              | Sıra | Bakteri                             | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|------------------------------|------|-------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <i>Micromonospora</i> sp. B5 | 1    | <i>Micromonospora saelicesensis</i> | AJ783993           | 95,82                    | 50/1198                          | 0,034                 |
|                              | 2    | <i>Micromonospora vinacea</i>       | FN658651           | 95,57                    | 53/1198                          | 0,037                 |
|                              | 3    | <i>Micromonospora zamorensis</i>    | LT607755           | 95,40                    | 55/1198                          | 0,038                 |
|                              | 4    | <i>Micromonospora ureilytica</i>    | FN658641           | 95,40                    | 55/1198                          | 0,038                 |
|                              | 5    | <i>Micromonospora noduli</i>        | FN658649           | 95,40                    | 55/1198                          | 0,038                 |
|                              | 6    | <i>Micromonospora profundu</i>      | KF494813           | 95,32                    | 56/1198                          | 0,039                 |
|                              | 7    | <i>Micromonospora chokoriensis</i>  | LT607409           | 95,24                    | 57/1198                          | 0,040                 |
|                              | 8    | <i>Micromonospora zeae</i>          | KC287242           | 95,15                    | 58/1198                          | 0,041                 |
|                              | 9    | <i>Micromonospora violae</i>        | KC161209           | 95,15                    | 58/1197                          | 0,041                 |
|                              | 10   | <i>Micromonospora luteifusca</i>    | FN658633           | 94,99                    | 60/1198                          | 0,043                 |

*Micromonospora* sp. B5 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en fazla nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.4'te verilmiştir. Sonuçlara göre; 1198 nükleotit arasından 50 nükleotidlik fark ve % 95,82 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Micromonospora saelicesensis* 'tir. *Micromonospora saelicesensis* ve *Micromonospora* sp. B5 izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,034 olarak belirlenmiştir. 53 ve 55 nükleotit farkla ve % 95,57 ve % 95,40 benzerlik ile *Micromonospora vinacea* ve *Micromonospora zamorensis* sırasıyla 0,037 ve 0,038 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

B3 izolatı beyaz, yükseltilmiş düzensiz lobat koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.5) ve %96,96 benzerlikle en yakın akrabası *Streptomyces pratensis* 'tir (Çizelge 3.1). B8 beyaz, düzensiz bir lobat koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.6) ve B8 izolatı %96,27 benzerlikle en yakın akrabası *Streptomyces pratensis* 'tir (Çizelge 3.1). B9 izolatı, B8 izolatın aynı morfolojik benzerlikleri paylaşp düz, beyaz, düzensiz, ve loblat koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.7). B9'un %96,38 benzerlikle en yakın akrabası *Streptomyces griseuys* subsp. *griseus* 'tur (Çizelge 3.1). B14 izolatı da beyaz, düzensiz, düz ve lobat koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.8). İzolatın %97,46 benzerlikle en yakın akrabası B8 izolatındaki gibi, *Streptomyces pratensis* 'tir (Çizelge 3.1).



**Şekil 3.5** B3 izolatının önden görünüşü.



**Şekil 3.6** B8 izolatının önden görünüşü



Şekil 3.7 B9 izolatının önden görünüşü



Şekil 3.8 B14 izolatının önden görünüşü

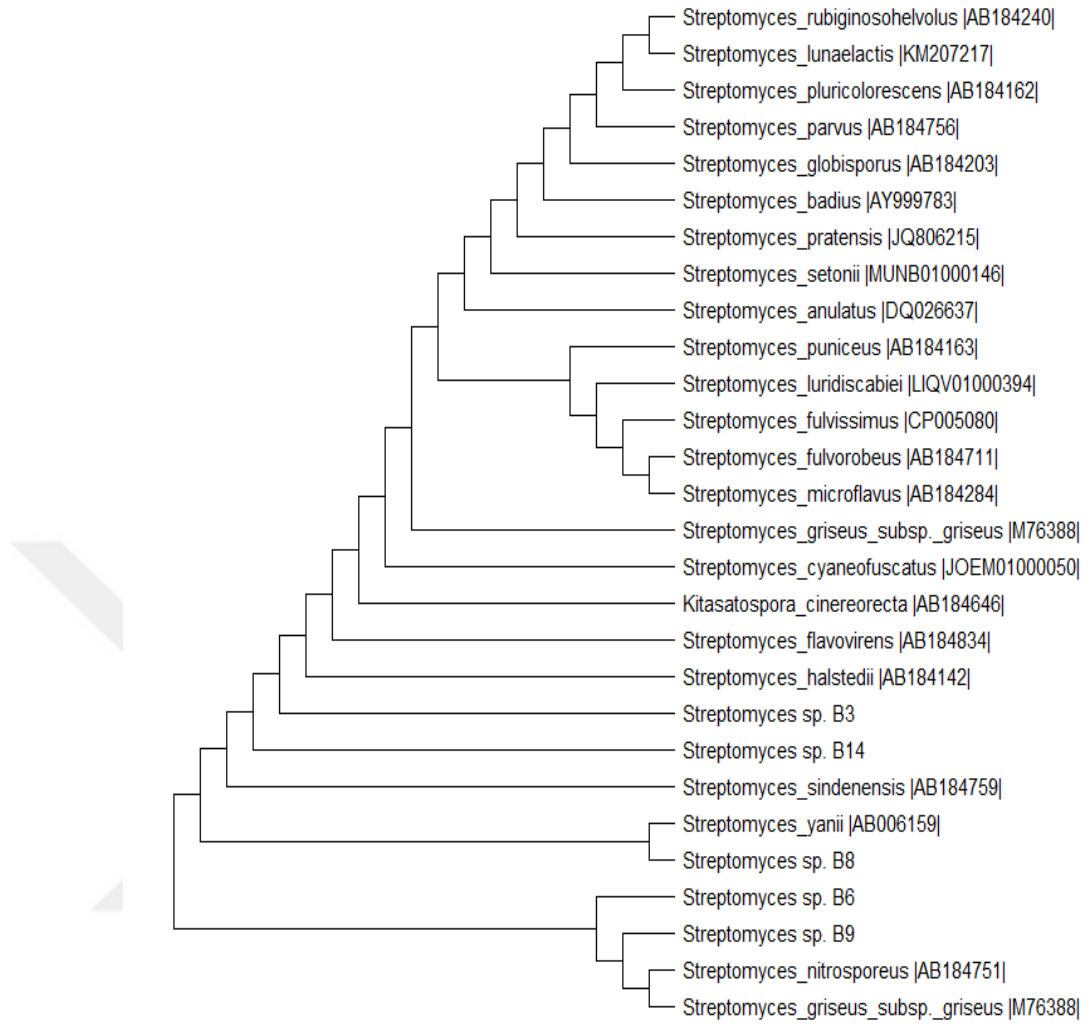
B6 izolatı beyaz, dairesel yükseltilmiş koloni olarak tanımlanabilir (Şekil 3.9) ve %96,43 benzerlikle izolatın en yakın akrabası *Streptomyces halestedii*'dir (Çizelge 3.1) B13 izolatı ise beyaz, dairesel, krateriform koloniler olarak tanımlanabilir (Şekil 3.10). İzolatın %96,26 benzerlikle en yakın akrabası *Aktinomadura cremea*'dır (Çizelge 3.1).



**Şekil 3.9** B6 izolatının önden görünüşü.



**Şekil 3.10** B13 izolatının önden görünüşü



**Şekil 3.11** B3, B6, B8, B9, B14 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Şekil 3.11’de *Streptomyces sp. B8* ve *Streptomyces yanii* arasındaki yakın ilişki gösterilmektedir. Filogenetik ağaçta *Streptomyces sp. B6* ve *Streptomyces sp. B9*’in *Streptomyces nitrosporeus* ile ortak soyu paylaştıkları ve *Streptomyces sp. B9* ve *Streptomyces nitrosporesus* arasındaki yakınlıkta oldukları gösterilmektedir.

*Streptomyces sp. B3* ve *Streptomyces sp. B14* ile *Streptomyces halstedii*'nin ise ortak soyu paylaştıkları göstermektedir. B3, 6, 8, 9, ve 14 izolatlarının tümünün *Streptomyces sp.* cinsine ait üyeler oldukları anlaşılmaktadır.

**Çizelge 3.5.** 16S rRNA gen bölgesine göre B3 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

|                            | Sıra | Bakteri                                | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|----------------------------|------|----------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <b>Streptomyces sp. B3</b> | 1    | <i>Streptomyces pratensis</i>          | JQ806215           | 96,69                    | 39/1180                          | 0,027                 |
|                            | 2    | <i>Kitasatospora cinereorecta</i>      | AB184646           | 96,52                    | 42/1210                          | 0,029                 |
|                            | 3    | <i>Streptomyces halstedii</i>          | AB184142           | 96,44                    | 43/1210                          | 0,031                 |
|                            | 4    | <i>Streptomyces fulvorobeus</i>        | AB184711           | 96,44                    | 43/1209                          | 0,030                 |
|                            | 5    | <i>Streptomyces fulvissimus</i>        | CP005080           | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 6    | <i>Streptomyces flavovirens</i>        | AB184834           | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 7    | <i>Streptomyces microflavus</i>        | AB184284           | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 8    | <i>Streptomyces anulatus</i>           | DQ026637           | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 9    | <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>     | JOEM01000050       | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 10   | <i>Streptomyces luridiscabiei</i>      | LIQV01000394       | 96,36                    | 44/1210                          | 0,031                 |
|                            | 11   | <i>Streptomyces globisporus</i>        | AB184203           | 96,36                    | 44/1209                          | 0,031                 |
|                            | 12   | <i>Streptomyces pluricoloescens</i>    | AB184162           | 96,28                    | 45/1210                          | 0,032                 |
|                            | 13   | <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> | AB184240           | 96,28                    | 45/1210                          | 0,027                 |

*Streptomyces sp. B3* izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en fazla nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.5'te verilmiştir. Sonuçlara göre; 1180 nükleotit arasından 39 nükleotidlik fark ve % 96,69 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Streptomyces pratensis*'tir. *Streptomyces pratensis* ve *Streptomyces sp. B3* izolatlarının arasındaki genetik uzaklık 0,027 olarak belirlenmiştir. 42 ve 43 nükleotit farkla ve % 96,52 ve % 96,44

benzerlik ile *Kitasatospora cinereorecta* ve *Streptomyces halstedii* sırasıyla 0,029 ve 0,031 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

**Çizelge 3.6.** 16S rRNA gen bölgesine göre B6 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Sıra | Bakteri                                           | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid /Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|------|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1    | <i>Streptomyces halstedii</i>                     | AB184142           | 96,43                    | 43/1206                           | 0,029                 |
| 2    | <i>Streptomyces pratensis</i>                     | JQ806215           | 96,36                    | 43/1182                           | 0,029                 |
| 3    | <i>Kitasatospora cinereorecta</i>                 | AB184646           | 96,35                    | 44/1206                           | 0,029                 |
| 4    | <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> | M76388             | 96,34                    | 44/1203                           | 0,031                 |
| 5    | <i>Streptomyces fulvissimus</i>                   | CP005080           | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 6    | <i>Streptomyces flavovirens</i>                   | AB184834           | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 7    | <i>Streptomyces microflavus</i>                   | AB184284           | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 8    | <i>Streptomyces anulatus</i>                      | DQ026637           | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 9    | <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>                | JOEM01000050       | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 10   | <i>Streptomyces luridiscabiei</i>                 | LIQV01000394       | 96,18                    | 46/1206                           | 0,031                 |
| 11   | <i>Streptomyces fulvorobeus</i>                   | AB184711           | 96,18                    | 46/1205                           | 0,031                 |
| 12   | <i>Streptomyces pluricoloescens</i>               | AB184162           | 96,10                    | 47/1206                           | 0,032                 |
| 13   | <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>            | AB184240           | 96,10                    | 47/1206                           | 0,032                 |
| 14   | <i>Streptomyces globisporus</i>                   | AB184203           | 96,09                    | 47/1205                           | 0,032                 |
| 15   | <i>Streptomyces setonii</i>                       | MUNB01000146       | 96,01                    | 48/1206                           | 0,031                 |
| 16   | <i>Streptomyces puniceus</i>                      | AB184163           | 96,01                    | 48/1206                           | 0,033                 |

*Streptomyces* sp. B6 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en çok nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre; 1206 nükleotit arasından 43 nükleotidlik fark ve % 96,43 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Streptomyces halstedii*'dir.

*Streptomyces halstedii* ve *Streptomyces* sp. B6 izolatu arasındaki genetik uzaklık 0,029 olarak belirlenmiştir. 43 ve 44 nükleotit farkla ve % 96,36 ve % 96,35 benzerlik ile *Streptomyces pratensis* ve *Kitasatospora cinereorecta* sırasıyla 0,029 de genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

**Çizelge 3.7.** 16S rRNA gen bölgesine göre B8 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Streptomyces sp. B8 | Sıra | Bakteri                                           | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|---------------------|------|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
|                     | 1    | <i>Streptomyces pratensis</i>                     | JQ806215           | 96,27                    | 43/1154                          | 0,029                 |
|                     | 2    | <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>Griseus</i> | M76388             | 95,95                    | 48/1187                          | 0,035                 |
|                     | 3    | <i>Streptomyces fulvissimus</i>                   | CP005080           | 95,87                    | 49/1187                          | 0,036                 |
|                     | 4    | <i>Streptomyces flavovirens</i>                   | AB184834           | 95,87                    | 49/1187                          | 0,038                 |
|                     | 5    | <i>Streptomyces microflavus</i>                   | AB184284           | 95,87                    | 49/1187                          | 0,036                 |
|                     | 6    | <i>Streptomyces anulatus</i>                      | DQ026637           | 95,87                    | 49/1187                          | 0,036                 |
|                     | 7    | <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>                | JOEM01000050       | 95,87                    | 49/1187                          | 0,036                 |
|                     | 8    | <i>Streptomyces luridiscabiei</i>                 | LIQV01000394       | 95,87                    | 49/1187                          | 0,036                 |
|                     | 9    | <i>Kitasatospora cinereorecta</i>                 | AB184646           | 95,78                    | 50/1186                          | 0,031                 |
|                     | 10   | <i>Streptomyces setonii</i>                       | MUNB01000146       | 95,70                    | 51/1187                          | 0,036                 |

*Streptomyces* sp. B8 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en fazla nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.7’de verilmiştir. Sonuçlara göre; 1154 nükleotit arasından 43 nükleotidlik fark ve % 96,27 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Streptomyces pratensis*’tir.

*Streptomyces pratensis* ve *Streptomyces* sp. B8 izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,029 olarak belirlenmiştir. 48 ve 49 nükleotit farkla ve % 95,95 ve % 95,87 benzerlik ile *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* ve *Streptomyces fulvissimus* sırasıyla 0,035, 0,36 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

**Çizelge 3.8.** 16 S rRNA gen bölgesine göre B9 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

|                     | Sıra | Bakteri                                           | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid /Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|---------------------|------|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Streptomyces sp. B9 | 1    | <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> | M76388             | 96,37                    | 44/1215                           | 0,042                 |
|                     | 2    | <i>Streptomyces pratensis</i>                     | JQ806215           | 96,31                    | 44/1193                           | 0,036                 |
|                     | 3    | <i>Kitasatospora cinereorecta</i>                 | AB184646           | 95,90                    | 50/1222                           | 0,040                 |
|                     | 4    | <i>Streptomyces flavovirens</i>                   | AB184834           | 95,89                    | 50/1218                           | 0,039                 |
|                     | 5    | <i>Streptomyces halstedii</i>                     | AB184142           | 95,81                    | 51/1218                           | 0,040                 |
|                     | 6    | <i>Streptomyces yanii</i>                         | AB006159           | 95,79                    | 49/1164                           | 0,042                 |
|                     | 7    | <i>Streptomyces lunaelactis</i>                   | KM207217           | 95,76                    | 51/1203                           | 0,041                 |
|                     | 8    | <i>Streptomyces fulvissimus</i>                   | CP005080           | 95,74                    | 52/1222                           | 0,042                 |
|                     | 9    | <i>Streptomyces microflavus</i>                   | AB184284           | 95,74                    | 52/1222                           | 0,042                 |
|                     | 10   | <i>Streptomyces anulatus</i>                      | DQ026637           | 95,74                    | 52/1222                           | 0,042                 |

*Streptomyces* sp. B9 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en çok nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.8’de verilmiştir. Sonuçlara göre; 1215 nükleotit arasından 44 nükleotidlik fark ve %96,37 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*’tir. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* ve *Streptomyces* sp. B9 izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,042 olarak belirlenmiştir. 44 ve 50 nükleotit farkla ve

%96,31 ve %95,90 benzerlik ile *Streptomyces pratensis* ve *Kitasatospora cinereorecta* sırasıyla 0,036, 0,40 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

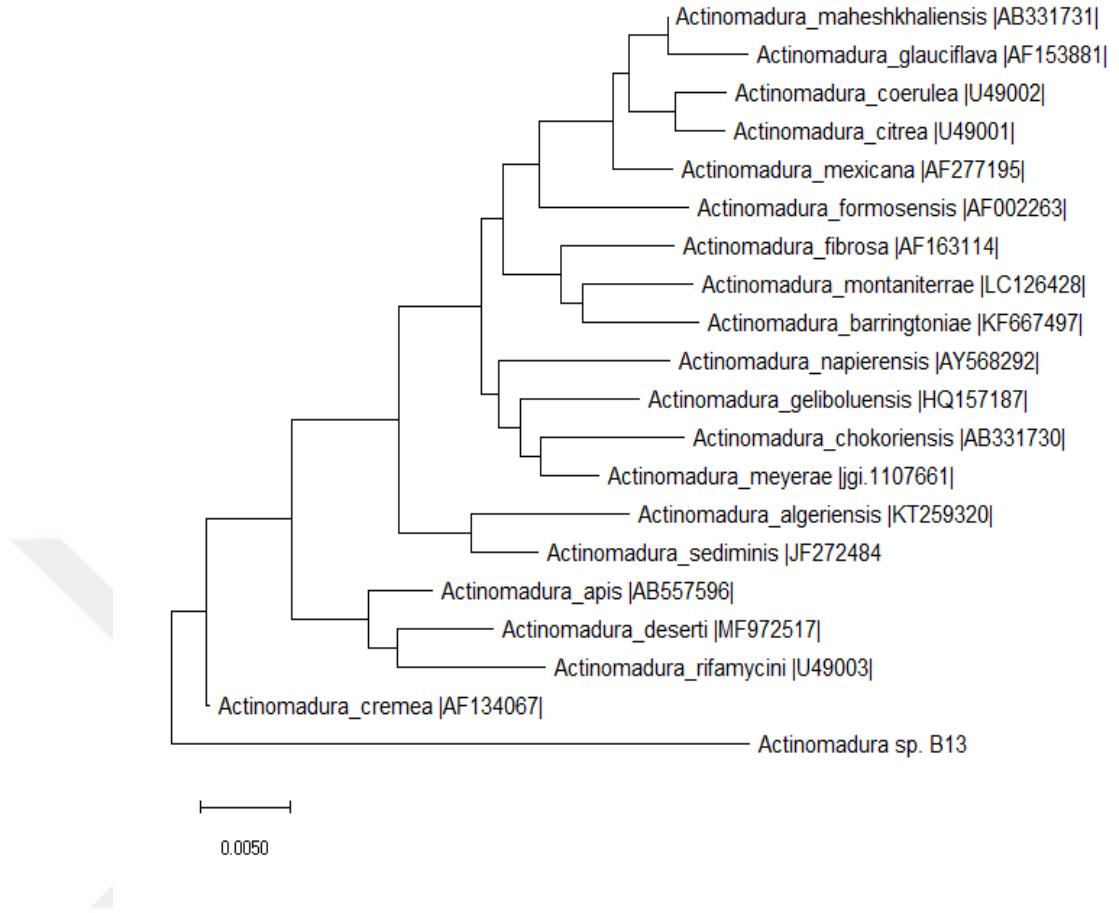
**Çizelge 3.9.** 16 S rRNA gen bölgesine göre B14 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Sıra | Bakteri                                           | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/ Total Nükleotid | p- Distance mesafeleri |
|------|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 1    | <i>Streptomyces pratensis</i>                     | JQ806215           | 97,45                    | 30/1181                           | 0,020                  |
| 2    | <i>Streptomyces halstedii</i>                     | AB184142           | 97,26                    | 33/1208                           | 0,023                  |
| 3    | <i>Kitasatospora cinereorecta</i>                 | AB184646           | 97,26                    | 33/1208                           | 0,023                  |
| 4    | <i>Streptomyces fulvorobeus</i>                   | AB184711           | 97,18                    | 34/1207                           | 0,025                  |
| 5    | <i>Streptomyces fulvissimus</i>                   | CP005080           | 97,10                    | 35/1208                           | 0,025                  |
| 6    | <i>Streptomyces flavovirens</i>                   | AB184834           | 97,10                    | 35/1208                           | 0,027                  |
| 7    | <i>Streptomyces microflavus</i>                   | AB184284           | 97,10                    | 35/1208                           | 0,025                  |
| 8    | <i>Streptomyces anulatus</i>                      | DQ026637           | 97,10                    | 35/1208                           | 0,025                  |
| 9    | <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>                | JOEM0100050        | 97,10                    | 35/1208                           | 0,025                  |
| 10   | <i>Streptomyces luridiscabiei</i>                 | LIQV01000394       | 97,10                    | 35/1208                           | 0,025                  |
| 11   | <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> | M76388             | 97,10                    | 35/1207                           | 0,025                  |
| 12   | <i>Streptomyces globisporus</i>                   | AB184203           | 97,10                    | 35/1207                           | 0,026                  |
| 13   | <i>Streptomyces pluricologrescens</i>             | AB184162           | 97,01                    | 36/1208                           | 0,026                  |
| 14   | <i>Streptomyces yanii</i>                         | AB006159           | 96,96                    | 35/1153                           | 0,025                  |
| 15   | <i>Streptomyces setonii</i>                       | MUNB01000146       | 96,93                    | 37/1208                           | 0,025                  |
| 16   | <i>Streptomyces puniceus</i>                      | AB184163           | 96,93                    | 37/1208                           | 0,027                  |
| 17   | <i>Streptomyces badius</i>                        | AY999783           | 96,85                    | 38/1208                           | 0,026                  |
| 18   | <i>Streptomyces parvus</i>                        | AB184756           | 96,85                    | 38/1208                           | 0,026                  |
| 19   | <i>Streptomyces sindenensis</i>                   | AB184759           | 96,85                    | 38/1207                           | 0,026                  |
| 20   | <i>Streptomyces nitrosporeus</i>                  | AB184751           | 96,85                    | 38/1207                           | 0,029                  |
| 21   | <i>Streptomyces lunaelactis</i>                   | KM207217           | 96,82                    | 38/1195                           | 0,027                  |

*Streptomyces* sp. B14 izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en fazla nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.9'de

verilmiştir. Sonuçlara göre; 1181 nükleotit arasından 30 nükleotidlik fark ve %97,45 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Streptomyces pratensis*’tir. *Streptomyces pratensis* ve *Streptomyces* sp. B14 izolatu arasındaki genetik uzaklık 0,020 olarak belirlenmiştir. 30 ve 33 nükleotit farkla ve %97,45 ve % 97,26 benzerlik ile *Streptomyces halstedii* ve *Kitasatospora cinereorecta* sırasıyla 0,020, 0,23 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

Şekil 3.12’de görülen filogenetik ağaca göre *Actinomadura* sp. B13 ile *Actinomadura cremea*’nın ortak soyu paylaştıkları ve B13 izolatının bir *Actinomadura* cinsi olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.12** B13 izolatlarının 16S rRNA analizlerine göre Neighbour-joining (Jukes ve Cantor, 1969; Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.10.** 16 S rRNA gen bölgesine göre B13 izolatına ait en yakın tip türlerinin % nükleotit benzerliği

| Actinomadura sp. B13 | Sıra | Bakteri                              | Accession Numarası | Nükleotit Benzerliği (%) | Farklı Nükleotid/Total Nükleotid | p-Distance mesafeleri |
|----------------------|------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
|                      | 1    | <i>Actinomadura cremea</i>           | AF134067           | 96,26                    | 45/1204                          | 0,034                 |
|                      | 2    | <i>Actinomadura apis</i>             | AB557596           | 95,53                    | 54/1210                          | 0,040                 |
|                      | 3    | <i>Actinomadura deserti</i>          | MF972517           | 95,11                    | 59/1208                          | 0,049                 |
|                      | 4    | <i>Actinomadura rifamycini</i>       | U49003             | 94,94                    | 60/1187                          | 0,047                 |
|                      | 5    | <i>Actinomadura algeriensis</i>      | KT259320           | 94,87                    | 62/1209                          | 0,050                 |
|                      | 6    | <i>Actinomadura sediminis</i>        | JF272484           | 94,45                    | 67/1209                          | 0,055                 |
|                      | 7    | <i>Actinomadura napierensis</i>      | AY568292           | 94,30                    | 66/1158                          | 0,058                 |
|                      | 8    | <i>Actinomadura mexicana</i>         | AF277195           | 94,14                    | 70/1195                          | 0,057                 |
|                      | 9    | <i>Actinomadura chokoriensis</i>     | AB331730           | 94,05                    | 71/1195                          | 0,060                 |
|                      | 10   | <i>Actinomadura maheshkhaliensis</i> | AB331731           | 94,02                    | 72/1205                          | 0,056                 |

*Actinomadura sp. B13* izolatının, Eztaxon sunucu verilerinden elde edilen sonuçlara göre en çok nükleotit benzerliği gösterdiği örnekler Çizelge 3.10'da verilmiştir. Sonuçlara göre; 1204 nükleotit arasından 45 nükleotidlik fark ve % 96,26 benzerlik oranıyla en yüksek benzerliğe sahip tür *Actinomadura cremea* 'tir. *Actinomadura cremea* ve *Actinomadura sp. B13* izolatı arasındaki genetik uzaklık 0,034 olarak belirlenmiştir. 54 ve 59 nükleotit farkla ve %95,53 ve % 95,11 benzerlik ile *Actinomadura cremea* ve *Actinomadura deserti* sırasıyla 0,040, 0,49 genetik uzaklık değerlerine sahiptir.

#### 4. TARTIŞMA

Bir bakteri türünün tanımlanması için, bakteriyel filogenide 16S rRNA “altın standart” olmasına rağmen (Vandamme ve ark., 1996) bu gen bölgesi, bir çok bakterinin genomunda pek çok sayıda kopyası bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, birbiriyle çok yakın ilişkili türlerde, bu gen bölgesinin yeterli ayrışmayı sağlamadığını göstermiştir (Liu ve ark., 2005; Guo ve ark., 2008). Ad hoc komitenin bakteriyolojide tür tanımı için birden fazla genin birleştirilerek kullanılmasını önermesiyle (Stackebrandt ve ark., 2002) bakteriyel sistematik ve filogenide farklı yaklaşımlar araştırmacılar tarafından tercih edilmeye başlanmıştır (Naser ve ark., 2006; Guo ve ark., 2008; Young ve ark., 2008, Gökdemir 2014).

Son araştırmalarda, mikroorganizmaların çevrelerine uyum potansiyeli yeteneklerinden yararlanılarak, mikroorganizmaların bir zaman kanıtı olarak kullanılabileceği gösterilmektedir. Çevrelerine uyum potansiyelindeki değişiklik geçici olarak tahmin edilebilir, bu nedenle ölüm sonrası aralıkların (PMI) belirlenmesinde yararlıdır (Carter ve ark., 2017). Janssen (2006)’a göre Aktinobakteri gibi baskın bakteriler de dahil toprakta 32 bakteri filumu mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, insan kanının toprakta bulunan Aktinomiset çeşitliği üzerindeki etkisinin ve kana maruz kalmış topraktaki Aktinomiset çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. “Toprak, insan kanına belli bir süre maruz kaldıktan sonra mevcut olan Aktinomiset topluluğunun çeşitliğini değiştirebilir.” hipotezinden yola çıkarak, 2 ünite 500 ml donör kanı toprağa dökülmüş ve 7 gün boyunca bekletilmiştir. Sonrasında hem

kana maruz kalmış topraktan hem de kansız topraktan kontrol amaçlı numuneler alınarak bakteri izolasyonu yapılmıştır. Ancak elde edilen bulgulara göre; kontrol grubu petrilerinde Aktinomiset çeşidi bakteri izole edilememiştir ve kana maruz kalmış topraktan alınan örneklerde ise ilk aşamada toplamda 14 adet Aktinomiset izole edilmiştir. İzolatlar B1 ile B14 arasındaki kodlar ile isimlendirilmiştir. Ancak izole edilen örneklerden 10 tanesi kültüre alınabilmiş ve stoklanabilmiştir. Analizlere kültüre alınabilen bakteriler ile devam edilmiştir.

DNA izolasyonunun ardından yapılan 16S rRNA analizlerine göre *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Actinomadura* cinslerine ait Aktinomiset türü bakterileri izole edilmiştir. 16S rRNA analizine ve Eztaxon sonuce göre B1, B4 ve B5 izolatları *Micromonospora* cinsi olduğu; *Micromonospora* sp. B1, *Micromonospora* sp. B4 ve *Micromonospora* sp. B5'in *Micromonospora saelicesensis* ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Oysa, B3, B6, B8, B9 ve B14'ün *Streptomyces* cinsine ait olduğu; *Streptomyces* sp. B3, *Streptomyces* sp. B8 ve *Streptomyces* sp. B14, *Streptomyces pratensis* ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. B6 ve *Streptomyces* sp. B9'un ise *Streptomyces halestedii* ve *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. B13 izolatının *Actinomadura* cinsi olduğu; *Actinomadura* sp. B13, *Actinomadura cremea* ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur.

Ancak *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Actinomadura* cinslerine ait olarak bulunan baktreilerin tam tür teşhisinin yapılabilmesi için polifazik taksonomi kurallarından yararlanmalıdır. Polifazik taksonomi; Polifazik taksonomi hem fenetik (fenotipik ve genotipik) hem de filogenetik bilgiyi kullanan sınıflandırma kurallarının bütünüdür. Mikroorganizmalardan elde edilen farklı verilerin birleştirilmesi ve ortak olarak değerlendirilmesi esasına dayanır. Genotipik karakterizasyonlar için DNA, RNA ve protein temelli analizler gerekmektedir., Fenotipik veriler içinse kemotaksonomik

belirteçler ve diğ er parametreler (Enzim kullanımı, morfoloji, seroloji vb.) değerlendirilmelidir (Goodfellow ve ark., 1997, 1999). B oyelikle elde edilen izolatların tür ve tür atı taksonomik seviyeleri belirlenebilecektir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLERİ

Bu tezin amacı, toprakta bulunan mikrobiyal topluluklarından Aktinomiset'in olay yeri incelemesinde bir referans olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemektir. Bulgulara göre bir toprak insan kanına maruz kalırsa toprağın mikrobiyal topluluğunun çeşitliliğinde bir değişiklik gerçekleşecektir. Ayrıca bir toprak insan kanına bir hafta maruz kaldıktan çeşitli Aktinomisetlerin izole edilebileceği tespit edilmiştir. Bulunan cinsler; *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Actinomadura*'dır. Fakat hangi türe ait olduğunu belirlemek veya yeni bir tür olup olmayacağını belirlemek için daha kapsamlı analizler gerekmektedir. İzolatların türlerinin tam olarak belirlenmesi insan ve toprak içeren olay yeri adli incelemelerinde referans olarak kullanılabilir ve bir taksonomik veritabanı oluşturmasını sağlayacaktır.

İlerde yapılacak araştırmalar, daha geniş parametrelere dayanarak yapılmalıdır. İlk olarak, kanın toprak üzerindeki etkisinin ne kadar olduğunu belirlemek için toprak örnekleri çeşitli aralıklarla toplanmalı ve analizi edilmelidir. İkincisi, daha geniş laboratuvar analizleri (farklı pH, sıcaklık, tuz toleransı, N ve C kullanımı, farklı inkübasyon süreleri) kullanılmalıdır. Üçüncüsü, kanın etkisini anlayabilmek için ve farklı türlerin tanımlanma imkanı olup olmadığına öğrenmek için deney farklı hava mevsimlerinde ve farklı çeşit toprağa uygulanmalıdır. Son olarak, deneyde kullanılan kan, sadece kan bankalarından alınmamalı ve aynı zamanda etik kurallar kapsamında canlı donörlerden de alınmalıdır. Çünkü, bir kişinin günlük alışkanlıklarının veya kullandığı ilaçların kana maruz kalan toprağın Aktinomiset çeşitliliğini etkilemesi olasılığı mevcuttur. Bu nedenle, bu olasılığı ortadan kaldırılmak için daha detaylı araştırmalar yapılmalıdır.

## ÖZET

### **Kana Maruz Kalmış Toprakta 16S rRNA Analizlerine Göre Aktinomiset Çiçetliliğın Belirlenmesi**

Aktinomisetler, toprakta yaygın olarak bulunan ve antibiyotik üretimi gibi sebeplerden dolayı ekonomik olarak önemli olan mikrobiyal bir gruptur. Bakteriyel filogenide 16S rRNA “altın standart” olarak tanımlan ve taksonlar arasında evrimsel olarak korunmuş bir gen bölgesidir. Adli bilimlerde ve olay yeri incelemesinde adli mikrobiyoloji alanının geliştirilmesi için, kriminal açıdan incelemelerin yanı sıra farklı bakış açısıyla da yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, adli mikrobiyoloji için bu tez çalışmasının önemli bir referans olacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında 16S rRNA analizi kullanarak bir hafta boyunca kana maruz kalmış toprak örneklerinden *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Actinomadura* cinslerine ait örnekler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin, Eztaxon sunucu ile nükleotit benzerlikleri ve p-distance değerleri belirlenmiştir. Neigboor joing metodu ile filogenetik dendogramları çizilmiştir. Adli mikrobiyoloji açısından, benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma gelecek çalışmalar için önemli bir başlangıç ve rehber özelliğı taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Aktinomiset, Adli mikrobiyoloji, 16S rRNA.

## SUMMARY

### **Determining the effect of human blood on the Actinomycetes diversity in blood exposed soil using 16S rRNA analysis**

The order of Actinomycete's popularity have centred mainly around its use in the pharmaceutical industry for the production of antibiotics, coupled with its common existence as microbial community of soil. 16S rRNA gene in bacterial phylogeny is known as the "gold standard" for the evolutionary conserved gene region in the taxa. In order to develop a more comprehensive field of microbiology for the use in criminal investigation, different approaches and perspectives must be developed. This thesis represents an important reference in the development of forensic microbiology. In this thesis; *Micromonospora*, *Streptomyces* and *Actinomyces* were isolated from blood exposed soil, after one week of exposure, and were identified using 16S rRNA analysis. The nucleotide similarities and p-distance values of the isolated bacteria were determined using Eztaxon server. Phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining method. A similar study was not found in literature pertaining to forensic microbiology therefore, this study may represent an important starting point and guide for future studies.

**Key words:** Actinomycete, Forensic microbiology, 16S rRNA.

## KAYNAKLAR

- AGADAGBA, Stephen Kugbere, et al. Isolation of Actinomycete from Soil. *Journal of Microbiology Research*, 2014, **4.3**: 136-140.
- CARTER, D.O., KNIGHT, R., METCALF, J.L. A preliminary survey of a postmortem microbiome on Oahu. *Proceedings of the 66<sup>th</sup> Annual meeting of the American Academy of Forensic Sciences*, vol. 20, Seattle, WA, February 17-22, 2014, *American Academy of Forensic Sciences*, Colorado Springs, CO, pp. 361-362.
- CARTER, D.O., METCALF, J.L., BİBAT, A. and KNIGHT, R., 2015. Seasonal variation of postmortem microbial communities. *Forensic science, medicine, and pathology*, **11**(2), pp.202-207.
- CARTER, David O., et al. (ed.). *Forensic microbiology*. John Wiley & Sons, 2017.
- CARTER, David O.; YELLOWLEES, David; TIBBETT, Mark., Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*, 2007, **94.1**: 12-24.
- CHAMIKARA, P. (2016). Advanced Study on selected taxonomic groups of Bacteria and Archaea Actinomycete Sri Lanka: *Research Gate*.
- CLARRIDGE, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, **17**(4), pp.840-862.
- COBAUGH, K.L., SCHAEFFER, S.M. and DEBRUYN, J.M., 2015. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. *PloS one*, **10**(6), p.e0130201
- COLE, J.R., WANG, Q., FİSH, J.A., CHAI, B., MCGARRELL, D.M., SUN, Y., BROWN, C.T., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C.R. and TİEDJE, J.M., 2013. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, **42**(D1), pp.D633-D642.
- FELSENSTEIN, J., 1993. *PHYLIP (phylogeny inference package)*, version 3.5 c. Joseph Felsenstein..
- GOODFELLOW, M., 1999. Actinomycete systematics: an unfinished synthesis. *Nova. Acta Leopold.*, **80**, pp.47-82.
- GOODFELLOW, M., MANFIO, G.P. and CHUN, J., 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria.

GOKDEMİR, F.S. (2014), Nonomuraea Cinsine Ait İzolatların Multi Gen Dizi Analizine Dayalı Filogenetik Sistematiği. (Unpublished master's dissertation) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye Cumhuriyeti.

GUNN, Alan; PİTT, Sarah J. Review paper microbes as forensic indicators. *Tropical biomedicine*, 2012, **29.3**: 311-330.

GUO, Y., ZHENG, W., RONG, X. and HUANG, Y., 2008. A multilocus phylogeny of the Streptomyces griseus 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **58**(1), pp.149-159.

HAUTHER, Kathleen A., et al. Estimating time since death from postmortem human gut microbial communities. *Journal of forensic sciences*, 2015, **60.5**: 1234-1240.

HAWKSWORTH, David L.; WILTSHIRE, Patricia EJ. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Science International*, 2011, **206.1-3**: 1-11.

JANAWAY, R.C., PERCIVAL, S.L. and WILSON, A.S., 2009. Decomposition of human remains. In *Microbiology and aging*(pp. 313-334). Humana Press.

JANSSEN, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(3), pp.1719-1728.

JEFFREY, L. S. H. Isolation, characterization and identification of Actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 2008, **7.20**.

JEFFREY, L. S. H., et al. Isolation and screening of Actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. *Journal of tropical agriculture and food science*, 2007, **35.1**: 159.

JENKINS, C., LİNG, C.L., CİESİELCZUK, H.L., LOCKWOOD, J., HOPKİNS, S., Mchugh, T.D., GİLLESPİE, S.H. and KİBBLER, C.C., 2012. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of medical microbiology*, **61**(4), pp.483-488.

KAKIZAKI, Eiji, et al. Detection of marine and freshwater bacterioplankton in immersed victims: post-mortem bacterial invasion does not readily occur. *Forensic science international*, 2011, **211.1-3**: 9-18.

KAKIZAKI, Eiji, et al. In vitro study of possible microbial indicators for drowning: Salinity and types of bacterioplankton proliferating in blood. *Forensic science international*, 2011, **204.1-3**: 80-87.

KIM, M., MORRISON, M. and YU, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of microbiological methods*, **84**(1), pp.81-87.

KUMAR, Y., 2007. *Mapping metabolites to the phylogeny of strains belonging to the 'Streptomyces violaceusniger' 16S rRNA gene clade* (Doctoral dissertation, University of Newcastle upon Tyne).

LANE, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp.115-175.

LAUBER, Christian L., et al. Vertebrate decomposition is accelerated by soil microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, **80.16**: 4920-4929.

LECHEVALIER, M.P., DE BIEVRE, C. and LECHEVALIER, H., 1977. Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5**(4), pp.249-260.

LEHMAN, Donald C. Forensic microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2014, **36.7**: 49-54.

LO, C. W., et al. Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker Range Sabah. *ASEAN Review on Biodiversity and Environmental Conservation*, 2002.

LUCCI, Arturo, et al. A promising microbiological test for the diagnosis of drowning. *Forensic science international*, 2008, **182.1-3**: 20-26.

LIU, Z., SHI, Y., ZHANG, Y., ZHOU, Z., LU, Z., LI, W., HUANG, Y., RODRÍGUEZ, C. and GOODFELLOW, M., 2005. Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of '*Microstreptospora cinerea*' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**(4), pp.1605-1610.

MANN, Robert W.; BASS, William M.; MEADOWS, Lee. Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *Journal of Forensic Science*, 1990, **35.1**: 103-111.

MEGYESI, M.S., NAWROCKI, S.P. and HASKELL, N.H., 2005. Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *Journal of Forensic Science*, **50**(3), pp.1-9.

METCALF, J.L., PARFREY, L.W., GONZALEZ, A., LAUBER, C.L., KNIGHTS, D., ACKERMANN, G., HUMPHREY, G.C., GEBERT, M.J., VAN TREUREN, W., BERG-LYONS, D. and KEEPERS, K., 2013. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *elife*, **2**, p.e01104.

METCALF, J.L., XU, Z.Z., WEISS, S., LAX, S., VAN TREUREN, W., HYDE, E.R., SONG, S.J., AMIR, A., LARSEN, P., SANGWAN, N. and HAARMANN, D., 2016. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science*, **351**(6269), pp.158-162.

METCALF, Jessica L., et al. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *elife*, 2013, **2**: e01104.

MONTGOMERY, P. Hepatitis outbreak lessons shared at forum. Manchester (NH) Union Leader, 25 June, 2013 sect. 1A, p. 4.

NASER, S., THOMPSON, F.L., HOSTE, B., GEVERS, D., VANDEMEULEBROECKE, K., CLEENWERCK, I., THOMPSON, C.C., VANCANNEYT, M. and SWINGS, J., 2005. Phylogeny and identification of enterococci by atpA gene sequence analysis. *Journal of clinical microbiology*, **43**(5), pp.2224-2230.

PANDEY, Amit, et al. Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 2011, **2.4**: 384-392.

RELMAN, D.A., 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science*, **284**(5418), pp.1308-1310.

RUAN, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 2013, **53.6**: 521-530.

SCHAAL, K.P., YASSİN, A.F. and STACKEBRANDT, E., 2006. The family actinomycetaceae: The genera actinomyces, actinobaculum, arcanobacterium, varibaculum, and mobiluncus. *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Aktinomisets*, pp.430-537.

SCHLEIFER, K.H. and KANDLER, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, **36**(4), p.407.

SCHLEIFER, K.H. and SEIDL, P.H., 1985. Chemical composition and structure of murein. *SOC. APPL. BACTERIOL. TECH. SER.* 1985.

SCHROEDER, J.M., BOOTON, G.C., HAY, J., NISZL, I.A., SEAL, D.V., MARKUS, M.B., FUERST, P.A. and BYERS, T.J., 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(5), pp.1903-1911.

SHIRLING, E.T. and GOTTLIEB, D., 1966. Methods for characterization of Streptomyces species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **16**(3), pp.313-340.

SPENCER, Robert C. Bacillus anthracis. *Journal of clinical pathology*, 2003, **56.3**: 182-187.

STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G.M., GRIMONT, P.A., KÄMPFER, P., MAIDEN, M.C., NESME, X., ROSSELLÓ-MORA, R., SWINGS, J., TRÜPER, H.G. and VAUTERIN, L., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**(3), pp.1043-1047.

- STIEGLER, P., CARBON, P., ZUKER, M., EBEL, J.P. and EHRESMANN, C., 1981. Structural organization of the 16S ribosomal RNA from *E. coli*. Topography and secondary structure. *Nucleic acids research*, **9**(9), pp.2153-2172.
- STIEGLER, Patrick, et al. Structural organization of the 16S ribosomal RNA from *E. coli*. Topography and secondary structure. *Nucleic acids research*, 1981, **9.9**: 2153-2172.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K. and SWINGS, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **60**(2), pp.407-438.
- VASS, Arpad A., et al. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Science*, 1992, **37.5**: 1236-1253.
- WEISS, Sophie, et al. Carcass mass has little influence on the structure of gravesoil microbial communities. *International journal of legal medicine*, 2016, **130.1**: 253-263.
- WEYLAND, H., 1981. Characteristics of Actinomycetes isolated from marine sediments. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt.: Supplemente*.
- WILSON, K., 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology*, **56**(1), pp.2-4.
- WOESE, C.R., 1987. Bacterial evolution, *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.
- YOUNG, J.M., PARK, D.C., SHEARMAN, H.M. and FARGIER, E., 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, **31**(5), pp.366-377.

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı : Hiba  
Soyadı : Farah Mohamed Abdalla  
Cinsiyet : Kadın  
Uyruğu : Sudan  
Medeni durumu : Bekar  
Doğum yeri ve tarihi : Umman, 08.10.1988  
Telefon : +905398341256  
E-mail : [hiba.hassib@gmail.com](mailto:hiba.hassib@gmail.com)

### II. Eğitim Bilgiler

| DERECE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | BÖLÜM PROGRAM                          | OKUL/ÜNİVERSİTESİ                                                                | YIL                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| İlkokul                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | -                                      | National Private School                                                          | 1993 – 2002                |
| Lise                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -                                      | Duhat Al-Adab for girls<br>Highschool<br>African Council for girls<br>Highschool | 2003 – 2004<br>2005 – 2006 |
| Lisans                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Fen Bilimler<br>Biyoteknoloji          | International University College of<br>Technology TWINTech                       | 2011 – 2013                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Türk dili (Türkçe)                     | Ankara Üniversitesi TÖMER                                                        | 2015 – 2016                |
| Yüksek<br>Lisans                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Disiplinlerarası Adli<br>Bilimler      | Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Ankara<br>Üniversitesi                                | 2016 – 2019                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Yüksek Lisans Tezi Başlığı ve Danışman |                                                                                  |                            |
| “Kana Maruz Kalmış Toprakta 16S rRNA Analizlerine Göre Aktinomiset<br>Çiçetliliğin Belirlenmesi”                                                                                                                                                                                                                               |                                        |                                                                                  |                            |
| Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                        |                                                                                  |                            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Lisans Tezi Başlığı ve Danışman        |                                                                                  |                            |
| Sabah ilçesindeki Mangrov bataklıklarından izole edilen <i>Aspergillus Niger</i> türlerinden alfa<br>amilaz üretimi, substrat olarak katı hal fermentasyonu ve şeker kamışı “baggase”<br>kullanılarak izole edilmesi.<br>Danışman: Madam Nor Asma Binti AB. Razak (International University College of<br>Technology TWINTech) |                                        |                                                                                  |                            |

### III. Dil Beceriler

| DİL     | Arabça | İNGİLİZCE | TÜRKÇE |
|---------|--------|-----------|--------|
| OKUMA   | Anadil | C2        | C1     |
| YAZMA   | Anadil | C2        | C1     |
| KONUŞMA | Anadil | C2        | C1     |

### IV. Bilgisayar Beceriler

| PROGRAM       | DÜZEY       |
|---------------|-------------|
| Ms Word       | İleri Düzey |
| Ms Excel      | İler Düzey  |
| Ms PowerPoint | İleri Düzey |
| EndNote       | Orta Düzey  |