



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

Micromonospora İzolatları Kullanılarak Biber (*Capsicum annuum*) Bitkisinde Bitki
Büyümesinin Artırma Olanaklarının Araştırılması

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Dr. Öğr. Üyesi. Fadime ÖZDEMİR KOÇAK

YARDIMCI ARAŞTIRMACI: Doç. Dr. Dilek ÜNAL

YARDIMCI ARAŞTIRMACI: Doç. Dr. Levent DEĞİRMENCİ

YARDIMCI ARAŞTIRMACI: Biyolog Ayten KUMAŞ

YARDIMCI ARAŞTIRMACI: Biyolog Saadet Gizem ERTEKİN

PROJE NO: 2018-02.BŞEÜ.25-02

BAŞLAMA TARİHİ: 05.03.2019

BİTİŞ TARİHİ: 05.03.2020

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLECİK, 2020



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	3
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	4
ÖZET.....	6
ABSTRACT.....	7
1. GİRİŞ	8
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Nişasta Testi	14
3.2. Sellülaz aktivitesi	14
3.3. Kaseinaz Testi	14
3.4. İndol Asetik Asit testi (IAA).....	14
3.5. Fosfat çözünürlüğü testi	15
3.6. Siderefor Testi	15
3.7. Antifungal Aktivite	17
3.8. Morfolojik testlerin uygulanması	17
3.9. Genomik DNA İzolasyonu.....	18
3.9.1. İşlem Basamakları	18
3.9.2. DNA İzolasyon Kontrolü	19
3.9.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR İşlemi	20
3.10. Tohum Sterilizasyonu	21
4. BULGULAR	23
5. SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR.....	59
7. EKLER	62
EK-1. Proje Mali Etkinlikleri	
EK-2. Bilimsel Etkinlikler.....	



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

TABLolar DİZİNİ

Çizelge 1: 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltımı için PCR reaksiyon şartları

Çizelge 2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Çizelge 3. 16S rRNA gen bölgesinin dizilemesi için kullanılan dizileme primerleri

Çizelge 4. N fikse etme özelliğine sahip *Micromonospora* izolatlarının kaynağı, izolasyon ortamı ve dilüsyon oranı

Çizelge 5. Seçilen izolatların hidrolitik enzim test sonuçları

Çizelge 6. *Micromonospora* izolatlarının morfolojik tanımlama besiyerlerindeki sonuçları

Çizelge 7. 16S rRNA analizi yapılan *Micromonospora* izolatlarının tip türleri içinde benzerlik oranları

Çizelge 8. *C.annuum* bitki tohumlarının günlere bağlı olarak sıcaklık bazında çimlenme oranlarının tablosu

Çizelge 9. *C.annuum* ve *Micromonospora* sp. ile muamele edilmiş bitki tohumlarının günlere bağlı olarak sıcaklık bazında çimlenme oranlarının tablosu

Çizelge 10. *C. annuum* (Kontrol) grubu ve KSC08 (*Micromonospora* sp.) izolatının 21. gün vigor indeks sonuçları



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Seçilen izolatların nişasta testi görüntüleri
- Şekil 2.** Seçilen izolatlara yapılan selülaz enzim testi görüntüsü
- Şekil 3.** Seçilen izolatların kazeinaz testi görüntüleri
- Şekil 4.** Seçilen izolatların indol asetik asit testi görüntüleri
- Şekil 5.** Seçilen izolatların fosfat çözünürlüğü testi görüntüleri
- Şekil 6.** Seçilen izolatların siderefor testi görüntüleri
- Şekil 7.** Seçilen izolatların antifungal aktivite test görüntüleri
- Şekil 8.** Seçilen izolatların oatmeal agar (ISP 3) görüntüleri
- Şekil 9.** GBT13 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 10.** GBT13 izolatının Bennett's Agar görüntüsü
- Şekil 11.** GBT17 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 12.** KSC06 izolatının TSA, NA, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 13.** KSC08 izolatının CDA, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 14.** KSC10 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 15.** KSC56 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 16.** KSC59 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 17.** VYN16 izolatının ISP 4 Agar görüntüleri
- Şekil 18.** VYN17 izolatının TSA, CDA, NA ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 19.** GBT17 izolatının TSA, CDA, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 20.** VYN26 izolatının CDA, NA, TSA, ISP 4 ve Bennett's Agar görüntüleri
- Şekil 21.** SLV11 izolatının ISP 4 Agar görüntüsü
- Şekil 22.** VYN12 izolatının ISP 4 Agar görüntüsü
- Şekil 23.** VYN35 izolatının ISP 4 Agar görüntüsü
- Şekil 24.** GBT07 izolatının ISP 4 Agar görüntüsü
- Şekil 25.** KSC09 izolatının ISP 4 Agar görüntüsü
- Şekil 26.** DNA izolasyonu yapılan izolatların elüsyonlarının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü
- Şekil 27.** 6 İzolatın %1'lik agaroz jeldeki 16S rRNA görüntüsü
- Şekil 28.** *Micromonospora* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik ağacı



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Şekil 29. *C. annuum* bitkisinin 25°C’de tohum çimlenme deney görüntüleri

Şekil 30. KSC08 izolatu ile muamele edilmiş *C. annuum* bitkisinin 25°C’de tohum çimlenme deney görüntüleri

Şekil 31. *C. annuum* bitkisinin toprak/torf/vermikülit karşımındaki 21 günlük görüntüsü

Şekil 32. KSC08 izolatu ile muamele edilmiş *C. annuum* bitkisinin toprak/torf/vermikülit karşımındaki 21 günlük görüntüsü



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

ÖZET

Micromonosporaceae familyasının bir üyesi olan *Micromonospora* cinsi, sekonder metabolitlerin önemli bir kaynağı olarak kabul edilir (Berdy, 2005). Cins, günümüzde tanımlanmış 84 türden ve 7 alttürden oluşmaktadır (<http://www.bacterio.cict.fr/p/micromonospora.html>). *Micromonospora* cins üyeleri, aerobik ve gram pozitif bakterilerdir ve yüksek G+C içeriğine sahiptirler. Bu cinsin üyeleri hava miselyumunun yokluğu ve fragment içermeyen substrat miselyumuna doğrudan bağlı hareketsiz sporları ile karakterizedir. *Micromonospora* cinsine ait suşlar toprak, su, kumtaşı ve kök nodülleri gibi farklı ortamlarda yaygın olarak dağılır. *Micromonospora* cins üyeleri bitki kök nodüllerinde sıkça rastlandığı ve *Frankia* gibi azot fikse etme yeteneklerine sahip olduğu farklı çalışmalarda belirlenmiştir.

Azot fiksasyonunu gerçekleştirebilen bakteriler, bitki gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte fayda sağlayan mikroorganizma grubudur. Bu nedenle projede azot tutma kapasitesine sahip olan *Micromonospora* izolatları seçilmiş ve bu izolatların farklı bitki gelişim enzimlerine sahip olup olmadıkları belirlenmiştir. Bu kapsamda hidrolitik enzim testlerinden selüloz, kazeinaz, indol asetik asit, siderefor ve fosfat çözünürlüğü testleri yapılmıştır. Pozitif sonuç veren izolatlar ile morfolojik olarak farklı olan izolatların tanımlamaları 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak yapılmıştır.

İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin nükleotit dizilimi, 4 oligonükleotit primeri ile MacroGen Inc.(Hollanda) firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. 16S gen bölgesi dizi analizleri MEGA7 yazılımı kullanılarak oluşturulmuş ve filogenetik ağaçlar, neighbour -joining algoritması ile MEGA7 programında hazırlanmıştır. Muhtemel yeni tür olduğu belirlenen suşların verileri Genbank'a (NCBI=National Center for Biotechnology Information, US) deposit işlemleri devam etmektedir.

Mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen test sonuçları ve 16S rRNA analiz sonuçları birarada değerlendirilmiş ve üstün özellikler gösteren KSC08 izolatu bitki denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bitki denemeleri laboratuvar koşullarında biber (*Capsicum annuum*) bitkisi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile *Micromonospora* izolatlarının tarım alanında kullanım olanaklarının olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Micromonospora*, Biber (*Capsicum annuum*), Bitki büyüme teşvik



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

1. GİRİŞ

***Micromonospora* İzolatları Kullanılarak Biber (*Capsicum annuum*) Bitkisinde Bitki Büyümesinin Artırma Olanaklarının Araştırılması**

Dünya genelinde *Micromonospora* bakterileri üzerine oldukça az araştırma olmasına karşın günümüzde bu bakteriler üzerindeki araştırmalar giderek hız kazanmaktadır. *Micromonospora* cinsi Gram-pozitif, kemoorganotropik, aerobik ve yüksek % G+C oranıyla Actinomycetes ordosu içinde yer almaktadır (Vobis, 1992). *Micromonospora*, önemli derecede fizyolojik çeşitlilik sergilemesine rağmen kemotaksonomik, filogenik ve morfolojik açıdan iyi tanımlanan bir cinstir (Kawamoto, 1989).

Micromonospora türlerinde sporlar substrat miselyumunda oluşur, hava miselyumu oluşturmazlar. Nadiren hava miselleri oluşsa bile bu miseller sterildir. *Micromonosporaceae* familyasındaki diğer cinsler gibi bu cinsin üyeleri de benzer mikroskobik hücre morfolojisine sahiptir. Bunlar 0,25-1,5µm çapında dallanmış, bölmeli hifler oluşturur ve koloniler beyaz, turuncu, gül kurusu veya kahverengi renkte olabilirken, besiyerine çözünür pigment salgılayanların da mevcut olduğu bilinmektedir (Hirsch ve Valdés, 2010). Genellikle genç koloniler soluk sarı, açık turuncu gibi renklerde iken yaşlı kolonilerin rengi koyulaşmakta ve koyu turuncu, kırmızı, kahverengi hatta siyah renge dönebilmektedir (Vobis, 2006).

Micromonospora üyeleri özellikle humusça zengin topraklarda yayılış göstermekte ve sahip olduğu hidrolitik enzimler sayesinde organik madde döngüsünde önemli rol oynamaktadır (Songsumanus ve diğ., 2013; Gurovic ve diğ., 2013; Ren ve diğ., 2013). Sahip olduğu hidrolitik enzimlerle selüloz, kitin, lignin ve diğer kompleks polisakkaritleri parçalayabilmektedir (Erikson, 1941; Wilson, 1992; Gacto ve diğ., 2000; de Menezes ve diğ., 2008). Toprak verimliliğini arttıran ve bitki gelişimine katkı sağlayan bu tip mikroorganizmalar, "biyogübreler" olarak adlandırılmakla birlikte tarımda da mikrobiyal aşı materyallerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Çoğu aktinomisetide olduğu gibi *Micromonospora* türleri de bitki sağlığını arttıran ve yüksek verim alınmasına katkı sağlayan maddeleri (Ör. vitaminler ve bitki hormonları gibi) ürettiğinden dolayı toprakta "fitostimulatör" veya bitki büyüme promotorları olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda *Micromonospora* türleri, bitki köklerinde endofitik olarak ürettikleri antibiyotik ve antifungal ajanlarla bitki köklerinde hastalığa sebep olan toprak



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

kaynaklı pek çok bitki patojenine karşı savaşır ve bitki gelişimini destekledikleri için biyokontrol ajanı olarak da kullanılmaktadırlar (El-Tarabily ve diğ., 1996a, 1996b; Kurtböke, 2000; El-Tarabily ve Sivasithamparam, 2006; Kurtböke ve diğ., 2007). Bu bitkiler arasında havuç, buğday, çin lahanası ve salatalık ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (El-Tarabily ve diğ., 1997; Coombs ve Franco, 2003; Lee ve diğ., 2008; El-Tarabily ve diğ., 2009).

Micromonospora türlerinin varlığı karasal habitatlarda; saman, buğday depoları veya evdeki atmosferik ortamı kirleten çevrenin kirletici maddelerin içerisinde tespit edilmiştir. Birçok *Micromonospora* suşu çürümüş yapraklı gübre içinden (Cordon, 1939), bitki köklerinden (Merzaeva ve Shir-okikh, 2006), bataklık ormanları ve turbalar (Thawai ve diğ., 2005), taşkın ovaların çayıruları (Zenova ve Zviangitsev, 2002), kıyı sedimentleri (Zhao ve diğ., 2004) ve sucul alanların sedimentleri (Mincer ve diğ., 2002; Maldonado ve diğ., 2009) gibi farklı ortamlardan izole edilerek tanımlanmıştır.

Aktinobakteriler de dahil olmak üzere çeşitli bakterilerin bitki büyümesini teşvik etme özellikleri birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve bu alanda günümüze kadar birçok araştırma yapılmıştır. Biyokontrol ve bitki büyümesini destekleyen ajanlar ve ikincil metabolitler de dahil olmak üzere agroaktif bileşiklerin kaynağı olarak aktinomisetlere yönelik büyük bir ilgi bulunmaktadır (Behal, 2000). Aktinomisetler bitki rizosferinde yaşar (Suzuki ve diğ., 2000) ve bitki patojenlerine karşı rollerinin yanı sıra bitkilerin gelişimsel ve fizyolojik süreçleri üzerinde geniş etki gösterirler (Ahemad ve Kibret, 2014).

Streptomyces, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium* ve *Rhodococcus* (Tsavkelova ve diğ., 2005; Khamna ve diğ., 2010) türlerinin doğrudan (fitohormonların üretimi) veya dolaylı olarak üretim kabiliyetinde (hücre duvarı bozucu enzimlerin üretimi) etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur (Walter ve Crawford, 1995). Bitki büyümesini teşvik etmek için, fosfor azottan sonra en önemli ikinci pozisyonu alır, ancak mevcudiyeti, çözünmeyen formlar olarak ortaya çıkması nedeniyle topraktaki bolluğuna rağmen bitkilerin alabildiği miktarı ile sınırlıdır. Bitki üreme parçalarının primordia gelişimi için bitki gelişiminin erken aşamalarında fosfor gereklidir. Fosfat çözüldürücü mikroorganizmalar (PSM) kimyasal fosfat kullanımına bağlı olarak kirlenen topraklarda kirliliğin azaltılması için çevre dostu bir çözüm sunmaktadırlar (Sharma ve diğ., 2013).



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında seçilen biber bitkisi hem endüstriyel açıdan hem de biyoteknoloji alanında fitokokimyasal özellikleriyle araştırılan bir tür olmuştur. (*Capsicum annuum*), Asya, kuzey Amerika, güney ve orta Avrupa ve tropikal ve subtropikal Afrika gibi dünya çapında sıcak iklim bölgelerinde yetiştirilen *Solanaceae* familyasına ait yıllık otsu bir bitkidir (Thampi, 2004). Toplam biber üretimi on yılda % 25 artmış (2006'dan 2016'ya, FAOSTAT tarafından bildirilen son veriler), 34,5 milyon ton (MT) üretimi ile dünyanın en ekonomik ve tarımsal açıdan önemli sebze ürünlerinden biri olmuştur. Bu anlamda Çin (17,5 MT), Meksika (2,7 MT), Endonezya (2,0 MT) ve İspanya (1,1 MT) en büyük taze biber üreticileri iken Hindistan (1,4 MT) en yüksek kuru biber üreticisidir (FAOSTAT, 2016). Genellikle, biberler çiğ (dolmalık biber) veya toz halinde baharat (biber) veya renklendirici (kırmızı biber) olarak tüketilir. Biber meyveleri, tatlı, büyük ve kalın, yeşil biber gibi, ince ve acı gibi çeşitlilik gösterir. Meyveler, yeşil, sarı, turuncu ve farklı olgunlaşma aşamalarına ve sentezleyici karotenoidleri veya klorofil kapasitelerine karşılık gelen farklı renklerde olabilir. Lezzet ile ilgili olarak, bu sebze, kırmızı biber gibi tatlı (keskin olmayan) çeşitlerden, biber veya acı gibi sıcak türlere kadar uzanır (Buckenhüskes, 2003). Keskinlik, aroma ve renk gibi duyu sal özelliklerine ek olarak, biberler, C ve E vitaminleri, provitamin A, karotenoidler ve fenolik bileşikler de dahil olmak üzere tüketiciler için sağlık yararları sunan önemli biyoaktif bileşik kaynaklarıdır (Padilha ve diğ., 2015).

Bu proje kapsamında; farklı ortamlardan izole edilen ve N tutma kapasitesine sahip olan *Micromonospora* izolatlarının bitki gelişim üzerine etkisinin tespiti amaçlanmıştır. *Micromonospora* izolatları selü laz, kaseinaz, siderofor varlığı, indol asetik asit (IAA) ve fosfat çözünürlüğü yönünden incelenerek sonuçları kaydedilmiştir. Enzim test sonuçları değerlendirilerek seçilen izolatların genomik DNA'ları izole edilmiş ve PZR amplifikasyonları ile 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılarak dizileme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak test izolatlarının filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Proje kapsamında sunulan tüm analiz sonuçları birlikte değerlendirilerek bitki gelişiminde kullanılmak üzere *Micromonospora* sp. KSC08 izolatu seçilmiş ve biber bitkisinin gelişimine etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda KSC08 izolatu ile inoküle edilmiş biber tohumlarının 21 günlük hasatı yapılmış elde edilen sonuçlar proje raporunda sunulmuştur. 21. gün hasat sonrasında kök, gövde boyu,



**T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU**

çimlenme oranları ve vigor indeksi belirlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek KSC08 izolatının bitki gelişimi üzerine etkileri belirlenmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

2. AMAÇ VE KAPSAM

Proje kapsamında, farklı ortamlardan izole edilen ve N tutma kapasitesine sahip olan *Micromonospora* izolatlarının bitki gelişim üzerine etkisinin tespiti amaçlanmıştır. *Micromonospora* izolatları selüloz, kazeinaz, indol asetik asit (IAA), siderofor, fosfat çözünürlüğü ve antifungal aktivite yönünden incelenmiştir. Bu özelliklerin birden fazlasına sahip olan izolat/izolatlar seçilerek morfolojik özellikleri tripton yeast glukoz agar ve oatmeal agarda belirlenmiştir. Benzer morfolojiye sahip olanlardan sadece bir tanesi seçilerek moleküler analizlere geçilmiştir. Seçilen izolatların genomik DNA'ları izole edilmiş ve PZR amplifikasyonları ile 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılarak dizileme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak test izolatlarının filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Tüm proje kapsamında yapılan analizlerin sonuçları incelenerek bitki gelişiminde kullanılmak üzere *Micromonospora* izolatı belirlenmiştir. Ülke ekonomimiz açısından da önemli bir yere sahip olan biber bitkisi kullanılarak seçilen *Micromonospora* izolatının bitki gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda *Micromonospora* izolatı ile inoküle edilmiş biber tohumları 21 günlük büyüme periyoduna bırakılmıştır. Sonrasında kök, gövde boyu ile vigor indeksi ve çimlenme oranları belirlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek *Micromonospora* izolatının bitki gelişimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Proje kapsamında yapılan çalışmalarla *Micromonospora* izolatının olası biyogübre olma potansiyeli belirlenmesi hedeflenmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Nişasta Testi

Nişasta degradasyonunda, nişasta (% 0.1 w/v) eklenmiş GYEA (glukoz yeast ekstrakt agar) içeren petrilere ekilen test suşları 30°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Beş gün sonunda Lugol's iodin eriyiği ortam üzerinde ince bir tabaka oluşturacak şekilde petrilere dökülmüştür (Cowan ve Steel, 1974). Ortamda nişasta varsa iodin nişasta ile birleşip koyu mavi bir kompleks oluşturacaktır. Oligosakkarit ve diğer basit şekerlerin ortamda varlıkları büyüme alanı civarındaki açık zon ile belirlenebilmektedir ve okuma sırasında bu durum pozitif olarak kaydedilmiştir.

3.2. Sellülaz aktivitesi

İzolatlar CMC agar (tripton, maya özütü, NaCl, CMC Agar) besiyerine (pH:10.0 ve % 10 NaCl içeren) çizgi şeklinde ekilmiş ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutusuna % 0.1'lik kongo kırmızısı çözeltisinden dökülmüş ve örnekler 15 dakika süreyle boyanarak 1M NaCl çözeltisi ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Boyama işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen suşlar selülaz (glukanaz) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Kaseinaz Testi

Skim milk agara mikroorganizmalar nokta inokülasyonu ile ekilmiş ve 37 °C'de 1-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda mikroorganizmanın çevresinde gözlenen şeffaf zonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.4. İndol Asetik Asit testi (IAA)

Seçilen test mikroorganizmaları, triptofan aminoasidi içeren ve triptofan aminoasidi içermeyen LB (Luria Broth) besiyeri ortamlarına inoküle edilmiş ve 30°C'de 3-4 gün



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

çalkalamalı inkübatörde karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 2 ml'lik ependorflara mikroorganizmalardan eklenerek 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve 1 ml süpernatant kısmı test tüplerine alınarak üzerlerine 2 ml Salkowski reagent eklenmiştir. Sonrasında 30 dakika karanlık ortamda tüpler bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında pembe renk oluşumu, indol asetik asit açısından pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.5. Fosfat çözünürlüğü testi

Pikovskaya (PVK) agara mikroorganizmalar nokta inokülasyonu ile ekilmiş ve 30 °C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların etrafında oluşan şeffaf zon pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.6. Siderefor Testi

Siderefor testini uygulamak için hazırlanan ortam (CAS Agar) birkaç basamak içinde hazırlanmıştır.

A. Mavi Boya Hazırlığı;

Solüsyon 1;

0.06 g CAS (casaminoasit) 50 ml ddH₂O içinde çözündürülmüştür.

Solüsyon 2;

0.0027 g FeCl₃-6 H₂O'yi 10 ml 10 mM HCl içinde çözündürülmüştür.

Solüsyon 3;

0.073 g HDTMA'yı 40 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

- Solüsyon 1'den 9 ml alınarak solüsyon 2 ile karıştırılmıştır. Ardından solüsyon 3 ile karıştırın. Çözelti artık mavi renkte olacaktır. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

B. Karışım çözeltisi:

a. Minimal Ortam 9 (MM9) Tuz Çözeltisi

15 g KH₂P₀₄, 25 g NaCl ve 50 g NH₄Cl'yi 500 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

b. % 20 Glikoz Stoku

20 g glikozu 100 ml ddH₂O içinde çözündürülmüştür.

c. NaOH Hazırlığı

25 g NaOH'ı 150 ml ddH₂O içinde çözündürülmüştür; pH ~ 12 olmalıdır.

d. Casamino Asit Çözeltisi

i. 3 g Casamino asidi 27 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

ii. İz demir elementini elimine etmek için kloroform içinde% 3 8-hidroksikinolin ile ekstrakte edilmiştir.

iii. 0,45'lik filtre ile sterilize edilmiştir.

C. CAS agar Hazırlanması:

a. 750 ml ddH₂O'ya 100 ml MM9 tuz çözeltisi eklenmiştir.

b. 32,24 g piperazin-N, N'-bis (2-metansülfonik asit) çözülmüştür. pH~5'in altında çözülmez. pH6'ya kadar pH getirilerek ve karıştırılarak çözündürülmüştür. PIPES çözüldükçe pH düşecektir. Karıştırırken, pH'ı yavaşça 6.8'e getirilmiştir.

c. 15 g Bacto agar eklenmiştir.

d. Otoklavlanarak ve 50°C'ye soğutulmuştur.

e. MM9 / PIPES karışımına 30 ml steril Casamino asit çözeltisi ve 10 ml steril% 20 glikoz çözeltisi eklenmiştir.

f. Yavaşça karıştırmak için yeterli çalkalama sağlanarak 100 ml Blue Dye çözeltisi yavaşça eklenmiştir. Aseptik koşullar altında mediumlar kullanıma hazır hale getirilmek için dökülmüştür.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Chrome azurol S (CAS) agara mikroorganizmalar nokta inokülasyonu ile ekilmiş ve 30 °C’de 10-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların etrafında oluşan turuncu zon pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.7. Antifungal Aktivite

Mueller Hinton Agar (MHA) antifungal aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Aktifleştirilen organizmalar Luria Bertanii (LB)’a aktarılarak ekimleri yapılmıştır. Organizmalar çalkalamalı inkübatörde 30 °C’de 3 gün inkübe edilmiştir. Antifungal aktivite için; *Fusarium* sp. LB ortamına ekimi yapılarak, çalkalamalı inkübatörde 30 °C’de 3 gün inkübe edilmiştir. Organizmalarda üreme gözlendikten sonra MHA ortamında petrinin orta kısmına 7 µl nokta ekim işlemi yapılmıştır. Organizmalar 30 °C’de etüve konulmuştur ve 3. gün sonunda mikroorganizmalara kloroform damlatılarak 40 dakika bekletilmiştir. 200 µl OD₆₀₀ nm 0,1 *Fusarium* sp. yayma ekimleri yapılmıştır. Sonuçlar bakteri inokülasyonunun etrafında şeffaf bir zon oluşması dikkate alınarak kaydedilmiştir.

3.8. Morfolojik testlerin uygulanması

Morfolojik inceleme, temel olarak ISP ve 3 farklı besiyeri ortamında üretilen mikroorganizmaların morfolojik tanımlamalarını temel almaktadır. Projede enzim testlerine göre seçilen izolatlar morfolojik inceleme amacıyla ISP besiyerleri (ISP 2-7 agar) ve Aktinomisetlerin morfolojik tanımlamasında kullanılan diğer besiyerleri (Nutrient Agar, modifiye Bennett’s agar, Triptik soy agar, Czapek’s agar) kullanılmıştır (Ek-A). Burada enzim testleri bir seçim kriteri olarak işlev görmüştür. Enzim testlerinde pozitif sonuç veren izolatlar seçilerek belirtilen ortamlara aktarılmış ve tüm morfolojik özellikleri (substrat, hava miselyum yapıları, diffüzlenebilir pigment, spor morfolojisi, koloni morfolojisi) belirlenmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

3.9. Genomik DNA İzolasyonu

Saf olarak stoklanan test izolatlarının genomik DNA izolasyonu; DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Test organizmaları yoğun olarak gelişebildikleri kültür ortamları hazırlanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir izolattan bir öze dolusu alınarak gelişim gösterdikleri kültür ortama göre 30 ml TYG broth bulunan 50 ml'lik erlenlere steril şartlarda transfer edilmiştir. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de 150 rpm'de 3-10 gün süreyle geliştirilmiştir. Saflıkları kontrol edildikten sonra steril ependorflara kültürlerden 1.5 ml ilave edilerek, 13.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.

Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılıp altta kalan peletler ddH₂O ile 1 defa , TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH:8) tamponunda 2 defa yıkanmıştır. Bu işlemler sonucu hücre peletleri DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir.

3.9.1. İşlem Basamakları

Lizatin Hazırlanışı;

1. İzolatlardan elde edilen her bir hücre peleti üzerine 180 µl lizozim (20 mg/ml) tamponu eklenip kısa süre vortekslendikten sonra 37°C'de 12 saat bekletilmiştir.
2. 2 adet su banyosu 37 °C ve 55°C'ye ayarlanmıştır.
3. 2 µl triton-x ilave edilip pipetaj yapılarak, 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir.
4. 20 µl RNaz ve 20 µl Proteinaz K eklenip kısa vortekslemeden sonra 37°C'de 30-45 dk bekletilmiştir.
5. 200 µl PureLink Genomik Parçalama/Bağlama tamponu eklenerek vortekslenerek, 55°C'de 30 dk bekletilmiştir.
6. Lizata 200 µl %96-100'lük etanol eklenip homojen bir çözelti elde etmek için 5 sn vortekslenerek iyice karıştırılmıştır.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Uygulama;

1. Yaklaşık 640 µl olan lizat PureLink spin kolona aktarılmıştır.
2. Kolon oda sıcaklığında 10.000g'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
3. Toplama tüpü atılmış ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
4. Kolona daha önceden hazırlanan yıkama tamponu 1'den 500 µl eklenmiştir.
5. Kolon oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
6. Toplama tüpü atılmış ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
7. Kolona daha önceden hazırlanan yıkama tamponu 2'den 500 µl eklenmiştir.
8. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüjlenmiş ve toplama tüpü atılmıştır.
9. Spin kolon 1.5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
10. Kolona 25-200 µl PureLink Genomik Ayırma Tamponu eklenmiştir.
11. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 1.5 dk santrifüjlenmiş ve böylece istenilen izolat DNA'sı saf bir şekilde elde edilmiştir.
12. Saflaştırılan DNA örnekleri -20°C muhafaza edilmiştir.

3.9.2. DNA İzolasyon Kontrolü

DNA izolasyon işlemini takiben, örneklerin agaroz jel elektroforez tekniği ile kontrolü sağlanmıştır. İzole edilen DNA örneklerini agaroz jelde görünür hale getirebilmek için jele floresan özellik gösteren etidyum bromür (EtBr) boyası ilave edilmiştir.

Elektroforez tablası kullanımdan önce saf su ile temizlenerek ve kurutularak düz bir zemine bırakılmıştır. DNA ve PCR örnekleri için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Tartımı yapılan agaroz üzerine 1X TBE tamponu eklenerek hazırlanan çözelti mikrodalgada ısıtılıp homojen hale getirilmiştir. Daha sonra çözelti elle tutulur sıcaklığa ulaştığında üzerine 1 µl etidyum bromür eklenmiş ve daha sonra elektroforez tablasına dökülmüştür. Her bir örnekten 3-5 µl ve jel yükleme tamponundan (brom fenol mavisi) 1 µl dikkatli bir şekilde transfer edilmiştir 120 voltta 30-45 dk yürütülmüştür.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

3.9.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR İşlemi

Test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi 27f ve 1525r primerleri kullanılarak Thermal Cycler’da amplifiye edilmiştir.

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için Promega firmasından alınan GoTaq Hot Start Master Mix reaksiyon karışımı aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 1: 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltımı için PCR reaksiyon şartları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	55	2	35
Uzama	72	3	35
Son Uzama	72	8	1
Reaksiyon sonrası saklama	4		

Çizelge 2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Reaktif	Stok yoğunluğu	Miktar (µl)
Hot Start Master Mix	2x	25
27f primeri	10 pmol	1
1525r primeri	10 pmol	1
Kalıp DNA	50-100 ng	2
Nükleaz içermeyen su		X
Toplam Hacim		50 µl



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Çizelge 3. 16S rRNA gen bölgesinin dizilemesi için kullanılan dizileme primerleri

Primer Adı	Sekans (5' ve 3')	Büyüklik	Bandlanma Alanı		Kullanım		Kaynak
			5'	3'	PCR	Sekans	
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	8	27	√	√	Lane (1991)
Mg520f	CAGCAGCCGCGGTAATAC	18	520	536		√	Kageyama vd. (2004)
Mg5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		√	Chun and Goodfellow (1995)
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	1544	1525	√	√	Lane (1991)
800r	TACCAGGGTATCTAATCC	18	800	782		√	Chun and Goodfellow (1995)

3.10. Biber Tohumlarının Sterilizasyonu

Biber bitkisi tohumları, kullanılacak MS ortamları, plastik petripler, kurutma kağıtları ve beherler 10 dakika steril kabinette UV ışığına bırakılarak steril edilmiştir. Daha sonra tohumlar yıkamak için 1:4 oranında çamaşır suyu:distile su karışımı hazırlanarak tohumlar beher içerisinde deterjan solüsyonunda 15 dakika bekletilmiştir. Filtre kağıdından süzdürülerek saf su ile yıkama işlemine geçilmiştir. Birkaç kez saf su ile yıkanarak kloraktın kalmaması sağlanmıştır. Yıkamadan sonra tohumlar filtre kağıdına alınmış ve suyu uzaklaştırılmıştır. Tohumun iyice kurumaması da bu aşamada oldukça önemlidir. Bir sonraki basamakta saf su bulunan behere ve OD₆₀₀ nm:0,1'e ayarlanan KSC08 izolatının bulunduğu behere biber tohumları eklenerek 2 saat 30°C'de bekletilmiştir. 3 farklı sıcaklık denemesi için büyük petrilere kurutma kağıtları eklenmiş ve saf su ile sulanmıştır. 25°C, 35°C, 45°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık denemesi için; hem mikroorganizmalı biber tohumlarının inoküle edildiği iki petri hem de bakterisiz ortamda inoküle edilen saf suda bekletilmiş biber tohumları parafilmle sarılarak gün bazında sıcaklıklarına göre çimlenme durumları gözlemlenerek not edilmiştir.

30 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılan tohumlar 2/1/1; steril toprak/vermikülit/perlit ortamına aktarılmıştır. 21 ve meyve haşatına kadar gececek süre ile 16:8 fotoperiyot ve 25-26±2 °C'ye ayarlanmış iklim odasında gelişime bırakılmıştır. İlk 5 günlük periyotta her gün çimlenen



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

tohum sayısı sayılmış ve çimlenme yüzdesi sayım sonuçlarına göre elde edilmiştir. 21. günün sonunda bitkilerin kök uzunlukları ve gövde uzunluklarının ölçümleri yapılmıştır. Kök uzunlukları, gövde uzunlukları ve çimlenme oranları kullanılarak vigor index hesaplanmıştır. Proje ilk 21 günlük periyotta yapılan denemeleri içermektedir. Ancak proje imkanları dahilinde meyve hasadı için de ek denemeler kurulmuştur. Sonuçlar projede elde edilecek sonuçlar ile birarada değerlendirilecektir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

3. BULGULAR

Projede kullanılan azot fikse etme özelliğine sahip *Micromonospora* izolatlarının kaynağı, izolasyon ortamı ve dilüsyon oranları Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4. N fikse etme özelliğine sahip *Micromonospora* izolatlarının kaynağı, izolasyon ortamı ve dilüsyon oranı

Kösice Toprakları:

İzolat No:	İzolatın Adı :	Kaynakça	İzolasyon Ortamı	Dilüsyon Oranı
KSC01	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC06	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC07	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC08	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC09	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC10	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC14	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC16	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻³
KSC18	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻³
KSC20	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻³
KSC28	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻³
KSC31	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻³



BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

KSC32	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻³
KSC37	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	HV	10 ⁻³
KSC38	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	HV	10 ⁻³
KSC41	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	HV	10 ⁻³
KSC43	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	HV	10 ⁻³
KSC48	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻⁴
KSC49	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	TYG	10 ⁻⁴
KSC50	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻⁴
KSC52	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻⁴
KSC53	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	SM3	10 ⁻⁴
KSC56	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer) , Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻⁴
KSC57	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻⁴
KSC58	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻⁴
KSC59	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer) , Kösice Mevkii- Slovakya	GYM	10 ⁻⁴

Viyana toprakları :

İzolat No:	İzolatın Adı:	Kaynakça	İzolasyon Ortamı	Dilüsyon Oranı
VYN05	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii- Avusturya	TYG	10 ⁻³



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

VYN09	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	GYM	10 ⁻³
VYN12	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	HV	10 ⁻³
VYN13	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	HV	10 ⁻³
VYN16	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	HV	10 ⁻³
VYN17	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	HV	10 ⁻³
VYN20	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	HV	10 ⁻³
VYN25	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	SM3	10 ⁻³
VYN26	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	SM3	10 ⁻³
VYN35	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	SM3	10 ⁻⁴
VYN36	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Viyana Mevkii-Avusturya	GYM	10 ⁻⁴

Gül Baba Türbesi toprakları :

İzolat No:	İzolatın Adı:	Kaynakça	İzolasyon Ortamı	Dilüsyon Oranı
GBT02	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı, Budapeşte Mevkii- Macaristan	HV	10 ⁻³
GBT07	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı, Budapeşte Mevkii- Macaristan	GYM	10 ⁻³
GBT08	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı, Budapeşte Mevkii- Macaristan	GYM	10 ⁻³
GBT09	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı, Budapeşte Mevkii- Macaristan	GYM	10 ⁻⁴
GBT11	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı, Budapeşte Mevkii- Macaristan	TYG	10 ⁻⁴
GBT13	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı,	SM3	10 ⁻⁴



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

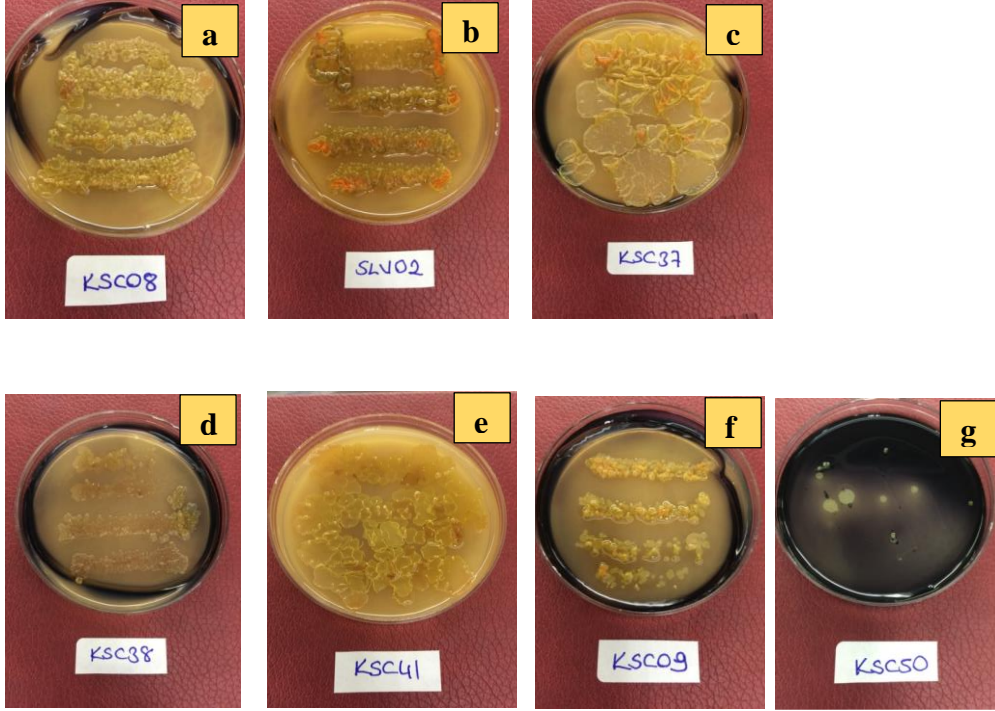
GBT14	<i>Micromonospora</i> sp.	Budapeşte Mevkii- Macaristan F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı,	SM3	10 ⁻⁴
GBT17	<i>Micromonospora</i> sp.	Budapeşte Mevkii- Macaristan F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı,	SM3	10 ⁻⁴
GBT24	<i>Micromonospora</i> sp.	Budapeşte Mevkii- Macaristan F. Özdemir Koçak; Tarla toprağı,	HV	10 ⁻⁴

Slovakya Toprakları:

İzolat No:	İzolatın Adı:	Kaynakça	İzolasyon Ortamı	Dilüsyon Oranı
SLV01	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	GYM	10 ⁻³
SLV02	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	GYM	10 ⁻³
SLV03	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	GYM	10 ⁻³
SLV11	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	SM3	10 ⁻³
SLV12	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	TYG	10 ⁻³
SLV20	<i>Micromonospora</i> sp.	F. Özdemir Koçak; Orman (Rizosfer), Slovakya	TYG	10 ⁻⁴

4.1. Nişasta Degredasyonu

Seçimi yapılan *Micromonospora* izolatlarına uygulanan nişasta hidroliz test sonuçları Şekil 1’de verilmiştir.

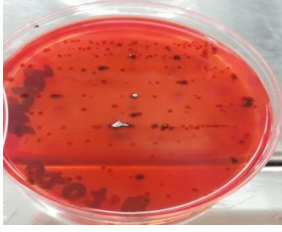


Şekil 1. Bazı izolatların; a; KSC08, b;SLV02, c;KSC37, d;KSC38, e; KSC41, f;KSC09, g;KSC50 nişasta testi görüntüleri

Uygulanan test sonucunda 36 izolat lugol eriyiğini parçalayarak mavi renkte açılmalar sağlamış ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. KSC06, KSC07, KSC08, KSC09 gibi teste kullanılan çoğu organizma nişasta degradasyonunda olumlu sonuçlar vermiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5’de verilmiştir.

4.2. Sellülaz aktivitesi

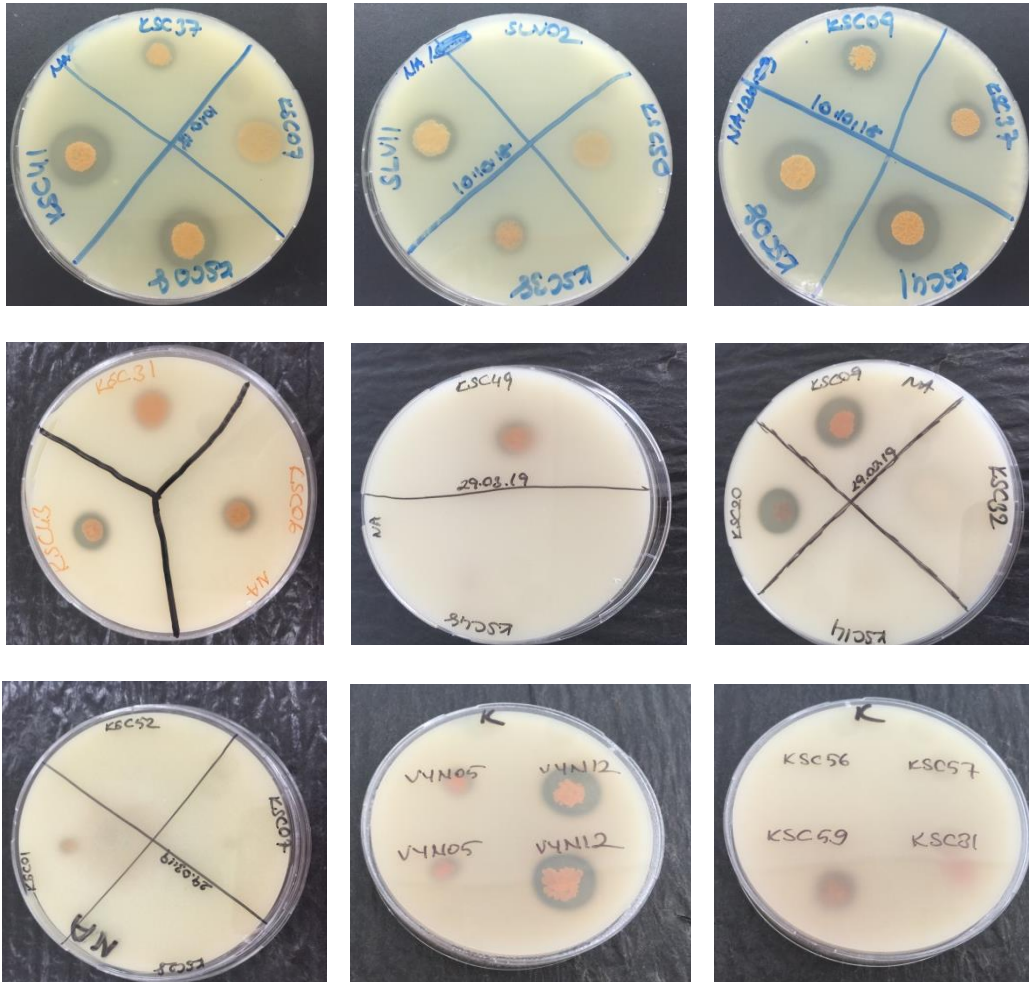
Micromonospora izolatlarının selülaz degradasyonunu belirlemek amacıyla CMC agar ortamına ekilmiş ancak izolatların üreme göstermediği belirlenmiştir. Şekil 2’de *Micromonospora* sp.’nin selülaz enzim test görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 2. *Micromonospora* sp. izolatının selülaz enzim testi görüntüsü.

4.3. Kazeinaz Testi

Kazeini parçalama yeteneklerini belirlemek amacıyla Skim milk agar ortamı kullanılmış ve test edilen *Micromonospora* izolatlarının kazeinaz test görüntüleri Şekil 3’de verilmiştir.



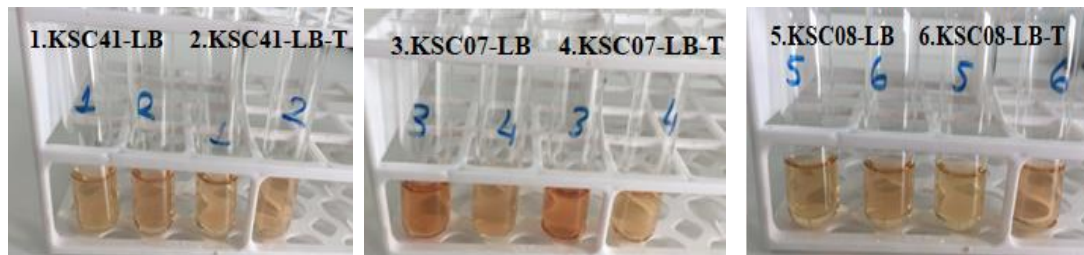


Şekil 3. Seçilen *Micromonospora* izolatların kazeinaz testi görüntüleri

Micromonospora izolatlarının 21 tanesinin bu teste pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Şeffaf bir zon oluşturan KSC01, KSC06, KSC07 ve diğer 18 izolatın kazeinaz enzim varlığı belirlenmiş ve Çizelge 5’de sonuçlar verilmiştir.

4.4. İndol Asetik Asit testi (IAA)

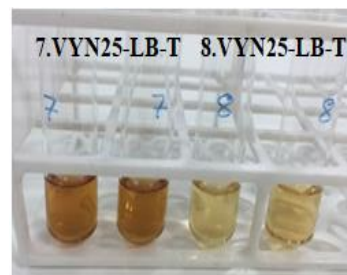
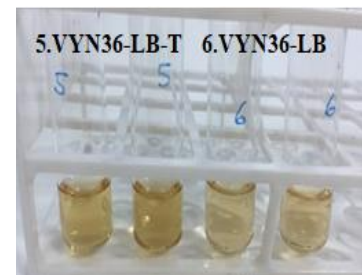
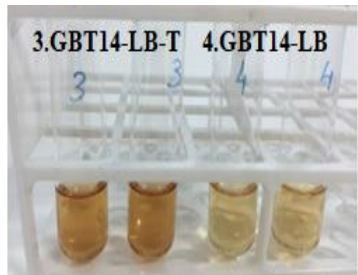
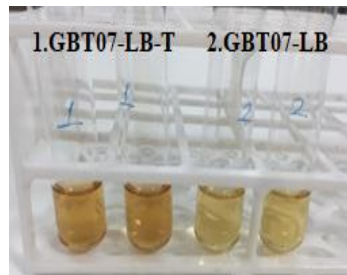
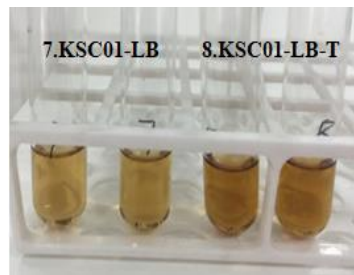
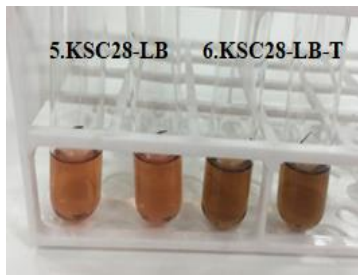
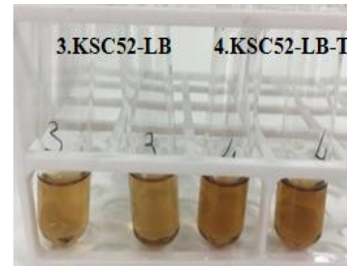
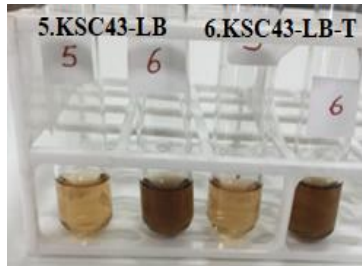
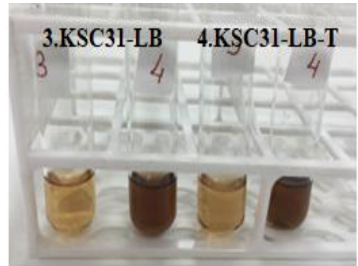
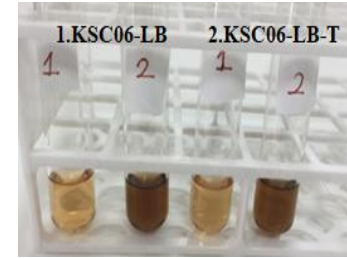
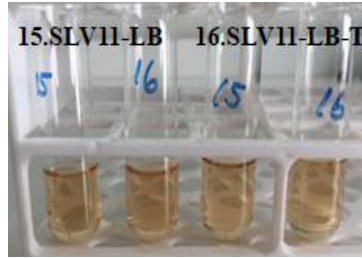
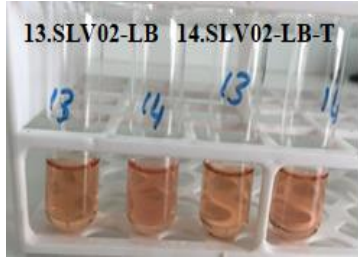
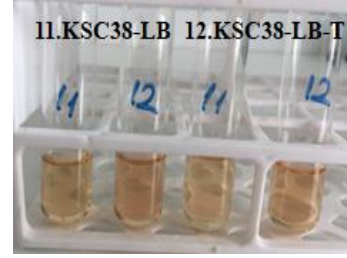
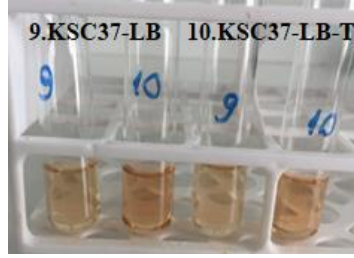
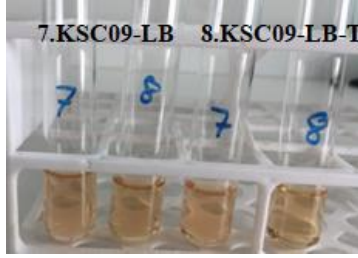
Micromonospora sp. izolatları, triptofan aminoasidi içeren ve triptofan aminoasidi içermeyen LB (Luria Broth) besiyeri ortamlarına aktarılmış ve triptofanı parçalama yetenekleri deneysel süreçlerle belirlenmiştir. Pembe renk oluşumu indol asetik asit varlığını gösterdiği için pozitif olarak değerlendirilmiştir. IAA test görüntüleri Şekil 4’de verilmiştir.

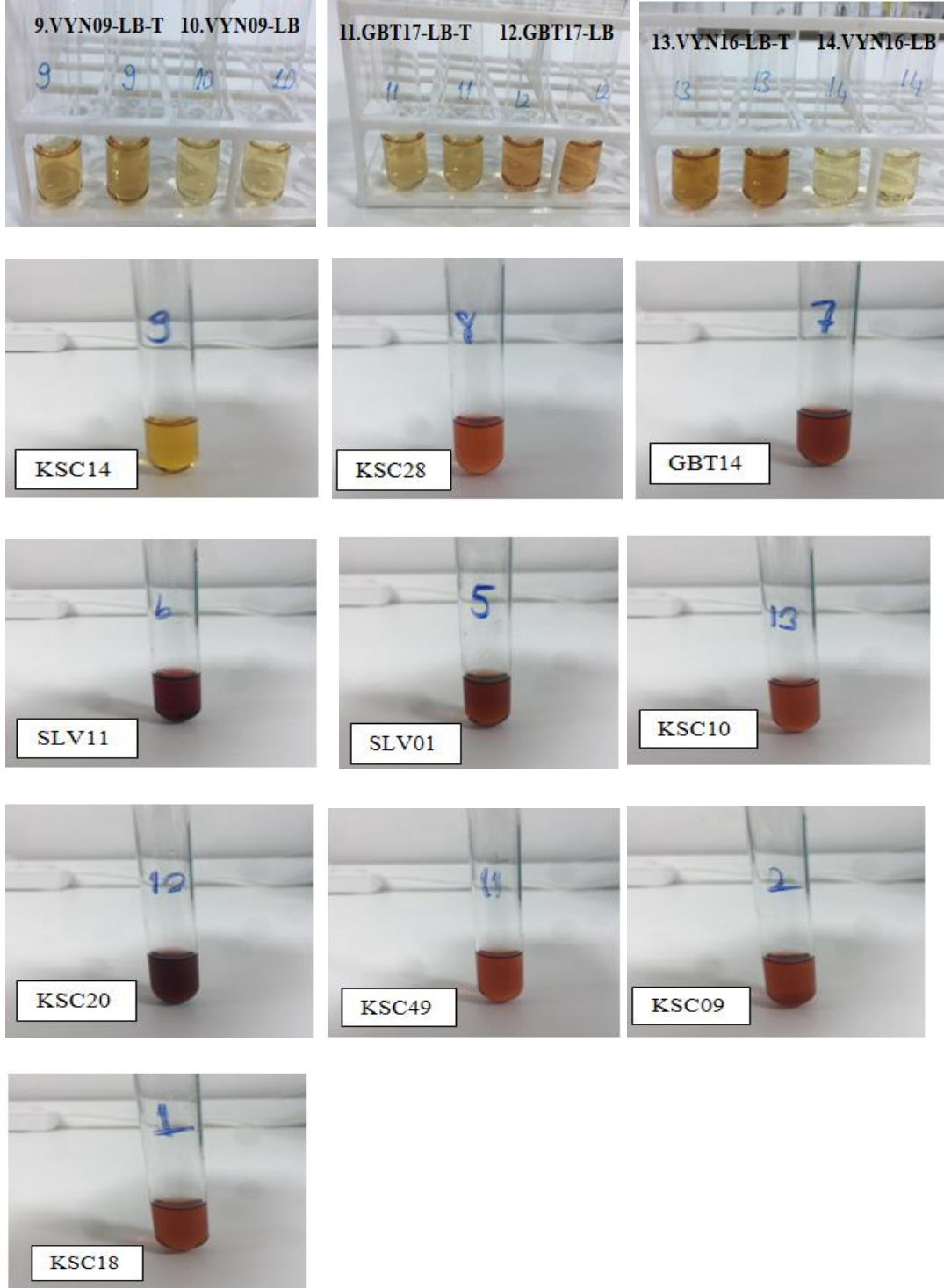




BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU



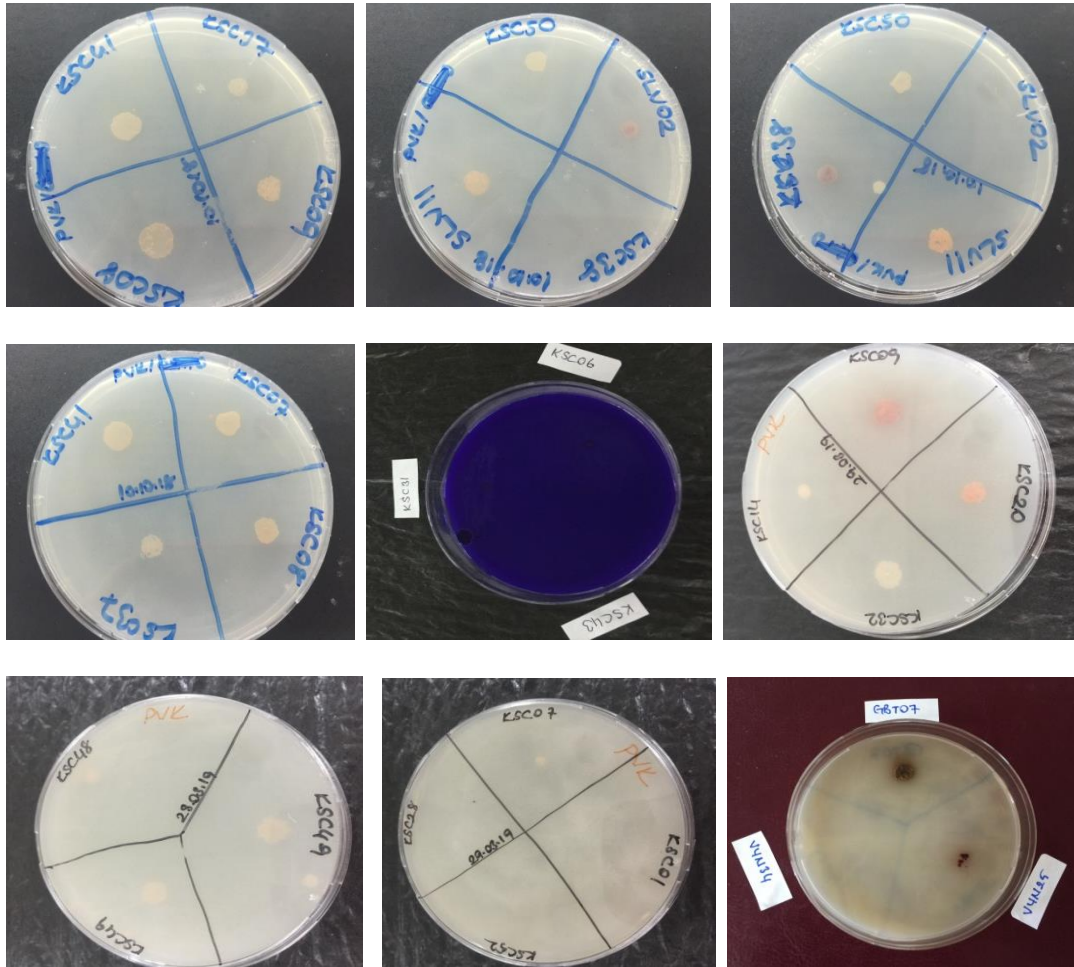


Şekil 4. Seçilen izolatların indol asetik asit testi görüntüleri

Triptofanaz enzim varlığı açısından incelenen izolatların 26'sının pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Pembe renk oluşumu bu enzimin varlığını gösterdiği için KSC08, KSC09, KSC28 ve diğer 23 izolat pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir.

4.5. Fosfat çözünürlüğü testi

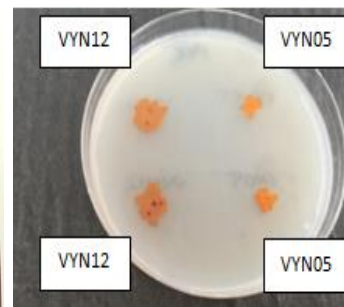
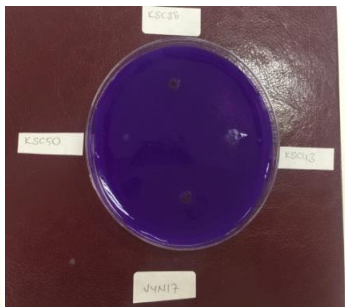
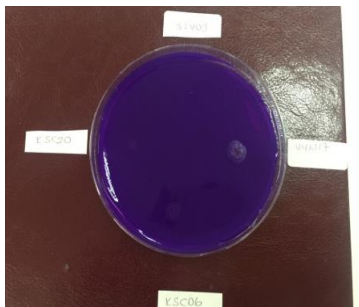
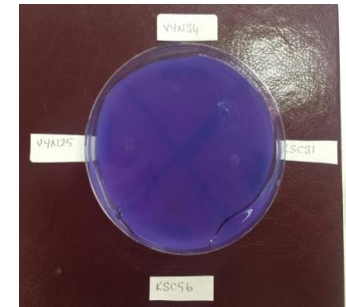
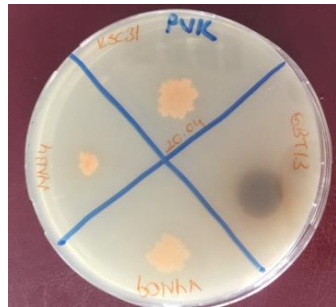
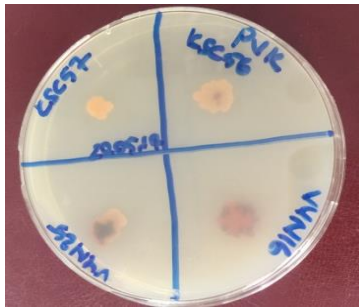
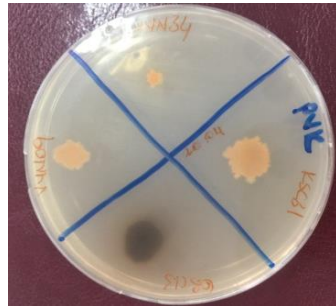
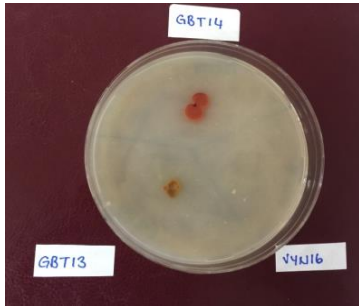
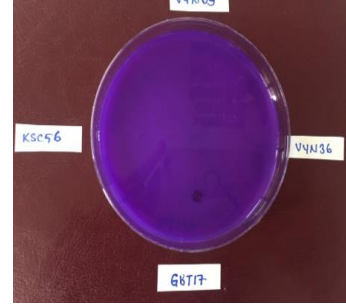
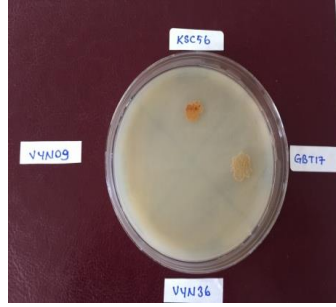
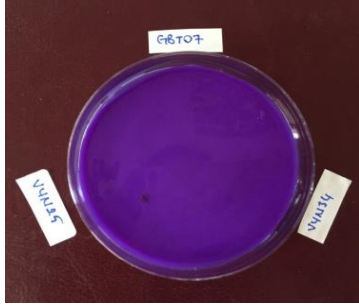
Micromonospora sp. izolatları, fosfatlı bileşikleri parçalama yeteneklerini belirlemek amacıyla Pikovskaya (PVK) agara inoküle edilmiş ve yapılan fosfat çözünürlüğü test görüntüleri Şekil 5'de verilmiştir.

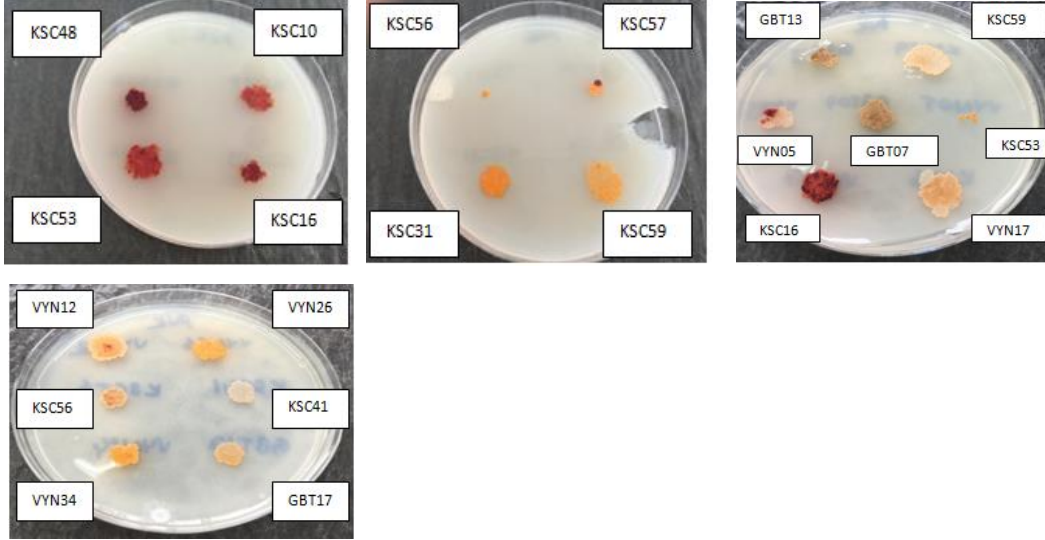




BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU





Şekil 5. Seçilen izolatların fosfat çözünlüğü testi görüntüleri

Bu test sonucunda GBT08, GBT13, GBT14 gibi toplam 16 organizma oluşturduğu şeffaf ve dar bir zonla pozitif sonuç vermiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5’te verilmiştir.

4.6. Siderefor Testi

Micromonospora izolatlarının, siderefor aktivitesinin belirlenmesi için CAS Agar ortamına inokülasyonu Şekil 6’da yer almaktadır.

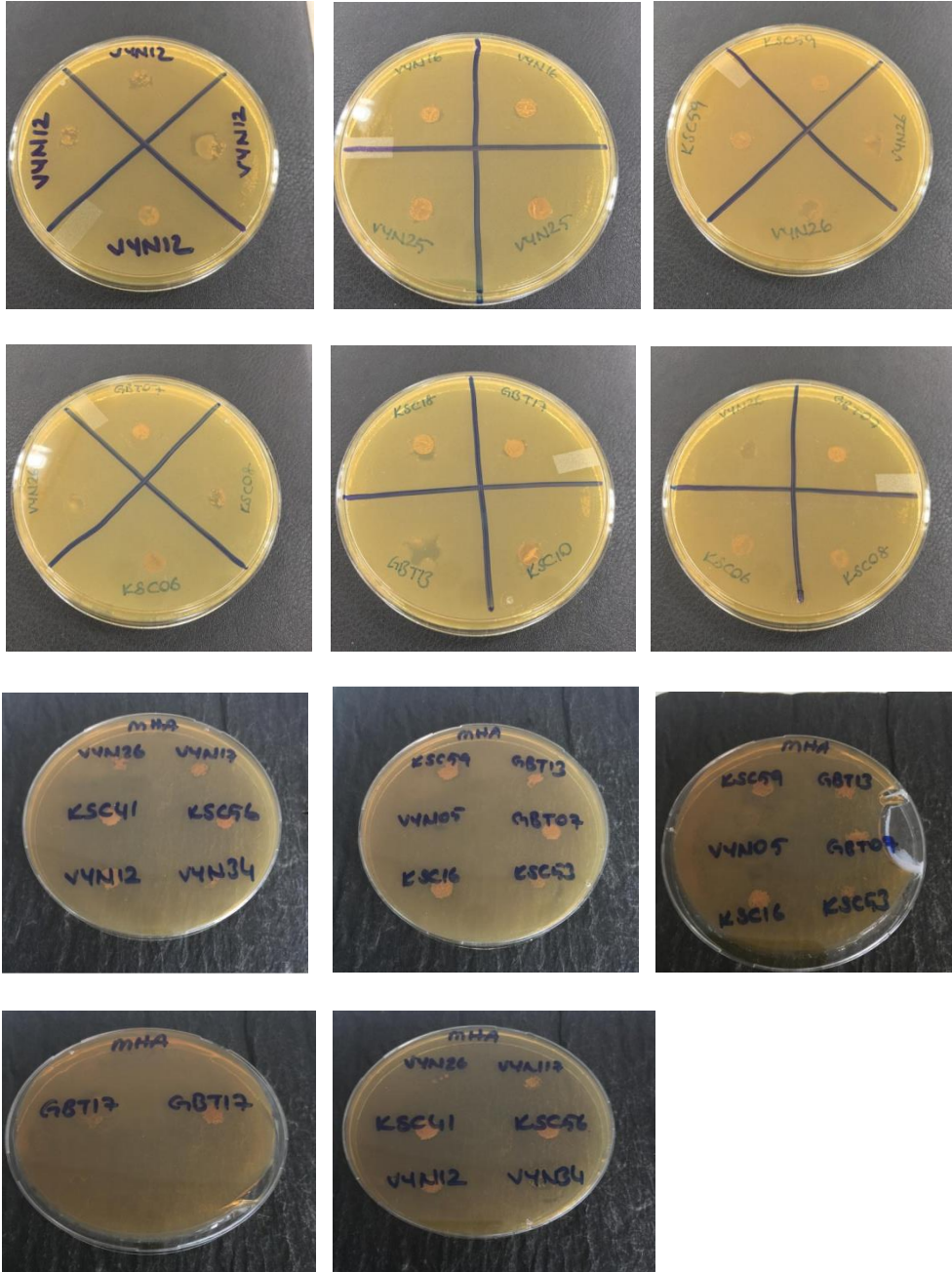


Şekil 6. Seçilen izolatların siderefor testi görüntüleri

Siderefor testi sonucunda KSC08 izolatının siderefor testi pozitif çıkmış diğer izolatlarda ise bir aktivite gözlenmemiştir.

4.7. Antifungal Aktivite

Micromonospora izolatlarının, *Fusarium* sp. fungal patojenine karşı antifungal aktivitesini belirlemek amacıyla Mueller Hinton Agar (MHA) ortamına inoküle edilmiştir. Yapılan antifungal aktivite test görüntüleri Şekil 7’de yer almaktadır.



Şekil 7. Seçilen izolatların antifungal aktivite testi görüntüleri



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Uygulanan testlerde KSC16, KSC53, KSC59, VYN12, GBT07 ve GBT13 izolatları bitki patojeni olan *Fusarium* sp.'ye karşı direnç göstererek şeffat ve dar bir zon vermiştir. Toplamda 11 izolatın *Fusarium* sp. fungal patojenine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5'de verilmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Çizelge 5. Seçilen izolatların hidrolitik enzim testleri ile antifungal aktivite test sonuçları

İzolat Kodu	Filogenetik ilişkili olduğu tür	Azot fikse etme özellikleri	Nişasta	Selülaz	IAA Testi	Kazeinaz aktivitesi	Fosfat çözünürlük	Antifungal aktivite
KSC01		+	+	-	-	+	-	+
KSC06	<i>M.coritariae</i>	+	+	-	-	+	-	-
KSC07	<i>M.parathelypteridis</i>	+	+	-	-	-	-	--
KSC08	<i>M.vinacea</i>	+	+	-	+	+	+	--
KSC09	<i>M.vinacea</i>	+	+	-	+	-	-	-
KSC10	<i>M.vinacea</i>	+	+	-	+	+	+	-
KSC14		+	+	-	+	-	-	-
KSC16		+	+	-	+	+	+	+
KSC18		+	+	-	+	+	+	-
KSC20	<i>M.phytophila</i>	+	+	-	+	+	-	-
KSC28		+	+	-	+	-	-	-
KSC31		+	+	-	-	+	-	-
KSC32		+	-	-	-	-	-	-
KSC37	<i>M.saelicesensis</i>	+	+	-	+	-	-	-
KSC38	<i>M.saelicesensis</i>	+	+	-	+	-	-	-
KSC41	<i>M.saelicesensis</i>	+	+	-	-	+	-	+
KSC43	<i>M.saelicesensis</i>	+	+	-	-	-	-	-
KSC48		+	+	-	-	-	-	-
KSC49		+	-	-	+	+	-	-
KSC50	<i>M.parathelypteridis</i>	+	+	-	+	-	-	-
KSC52		+	+	-	-	-	-	-
KSC53		+	+	-	+	+	-	+
KSC56	<i>M.arida</i>	+	+	-	-	+	+	+
KSC57		+	+	-	-	-	+	-
KSC58		+		-	-	-	-	--
KSC59		+	+	-	+	+	+	+
VYN05		+	+	-	-	-	-	-
VYN09		+	-	-	-	-	-	-



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

VYN12		+	-	-	+	+	+	+
VYN13		+	+	-	-	-	-	-
VYN16	<i>M.vinacea</i>	+	-	-	+	-	+	-
VYN17	<i>M.vinacea</i>	+	-	-	-	+	+	+
VYN20		+	-	-	-	-	-	-
VYN25	<i>M.saelicesensis</i>	+	+	-	+	-	+	-
VYN26		+	+	-	+	+	+	-
VYN34		+	-	-	-	+	+	+
VYN35		+	+	-	+	-	-	-
VYN36		+	+	-	-	-	-	-
SLV01		+	-	-	+	-	-	-
SLV02	<i>M.phytophila</i>	+	+	-	+	-	-	-
SLV03		+		-	-	-	-	-
SLV11	<i>M.zamorensis</i>	+	+	-	+	+	-	-
SLV20		+	-	-	-	-	-	-
GBT02		+	+	-	--	-	-	-
GBT07		+	+	-	+	+	+	+
GBT08		+	-	-	-	-	-	--
GBT09	<i>M.vinacea</i>	+	+	-	-	---	-	--
GBT11		+	-	-	-	-	-	--
GBT13		+	+	-	+	+	+	+
GBT14	<i>M.phytophila</i>	+	-	-	+	--	+	--
GBT17		+	+	-	+	+	-	-
GBT24		+	-	-	--	---	-	-

---: Üreme gerçekleşmeyen izolatlar

Morfolojik testlerin uygulanması

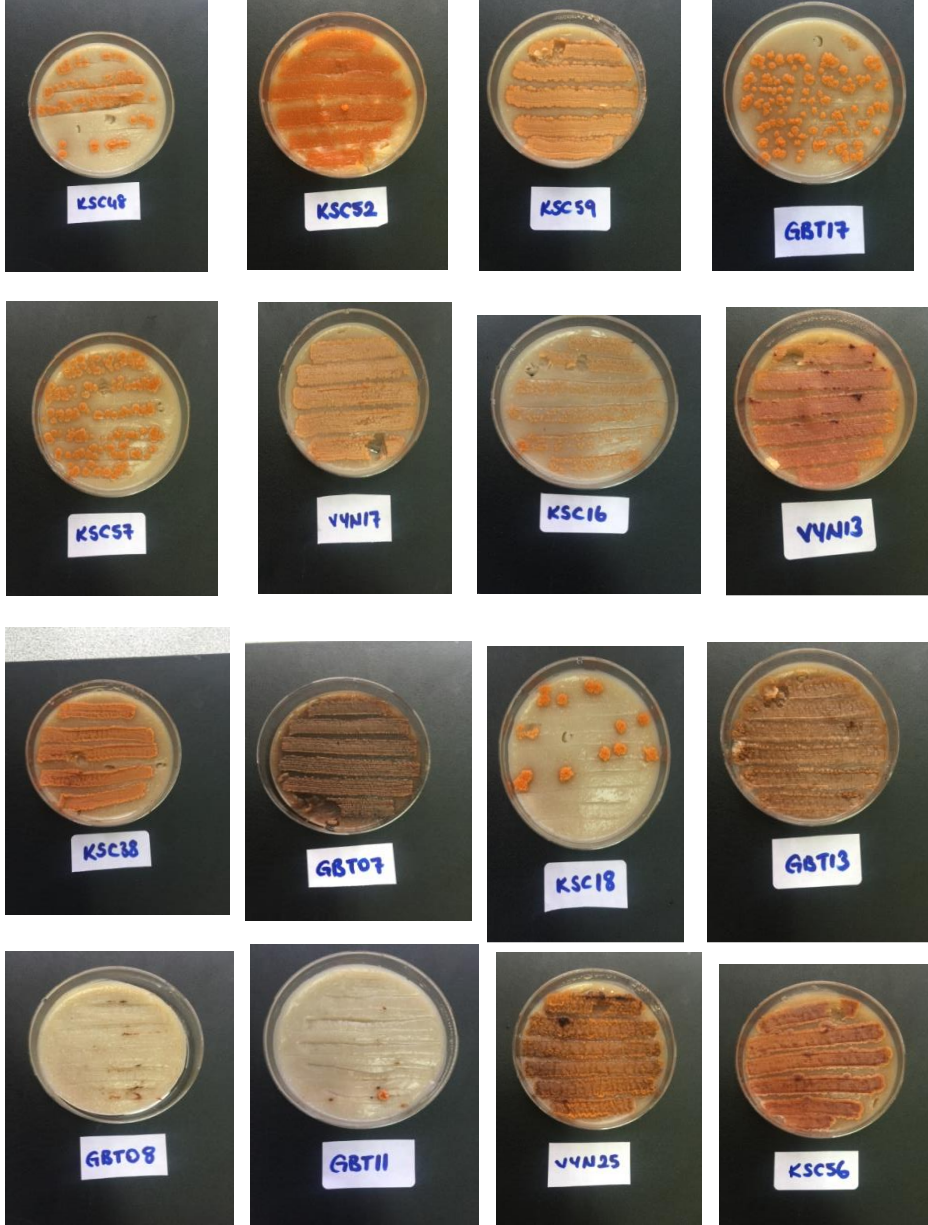
Enzim testlerine göre seçilen izolatların morfolojik incelemesi ISP besiyerleri (ISP 2-7 agar) ve Aktinomisetlerin morfolojik tanımlamasında kullanılan Nutrient Agar, modifiye Bennett's agar, triptikas soy agar ve Czapek's agarda yapılmıştır. Seçilen izolatların morfolojik özellikleri (substrat, hava miselyum yapıları, diffüzlenebilir pigment, spor morfolojisi, koloni

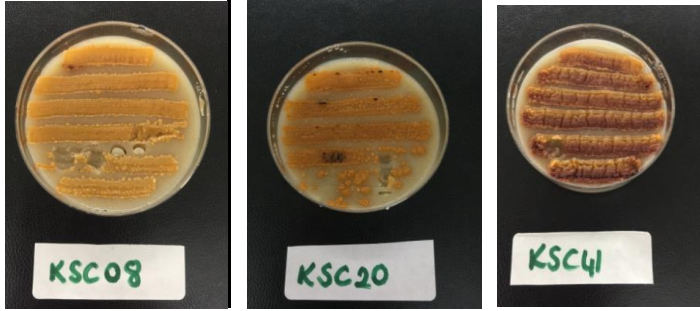


BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

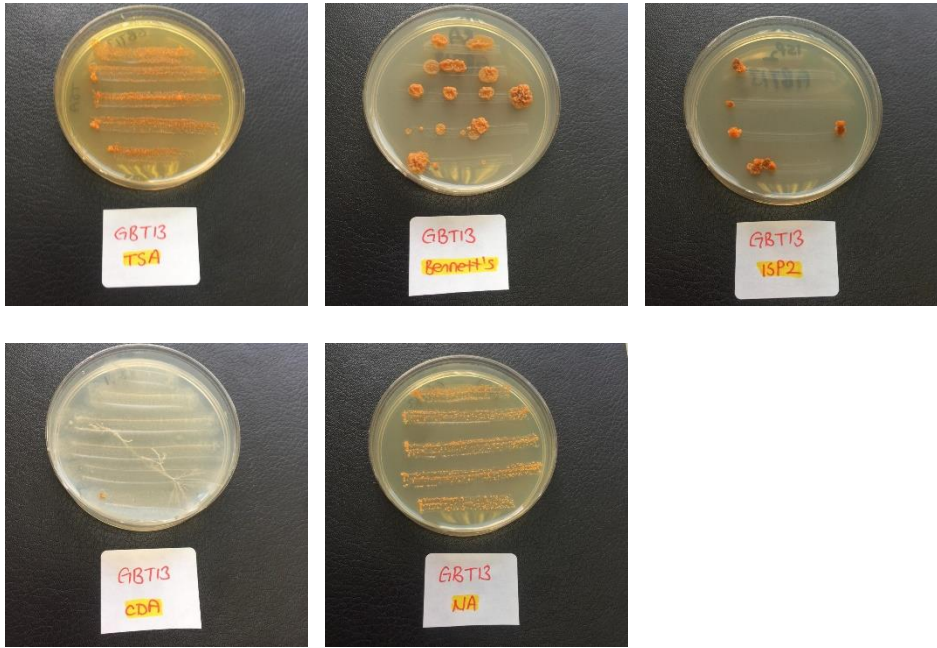
morfolojisi) belirlenmiş ve Çizelge 6 ile Şekil 8 arasında verilmiştir. Bazı *Micromonospora* izolatlarının ISP 3 ortamındaki morfolojik test görüntüleri Şekil 8’de yer almaktadır.



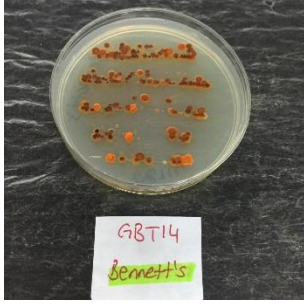


Şekil 8. Seçilen izolatların oatmeal agar (ISP3) görüntüleri

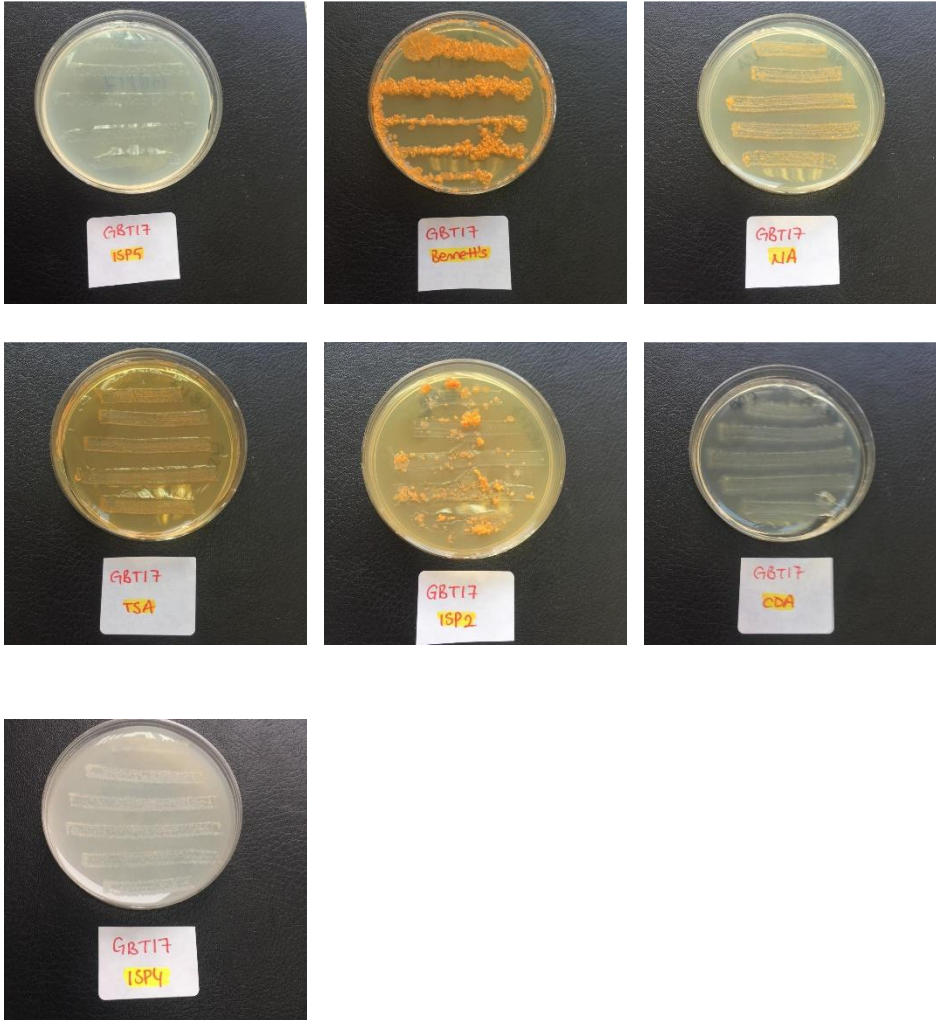
Enzim testlerine göre seçilen izolatların farklı ortamlardaki gelişimleri ve morfolojik özellikleri aşağıda verilmiştir.



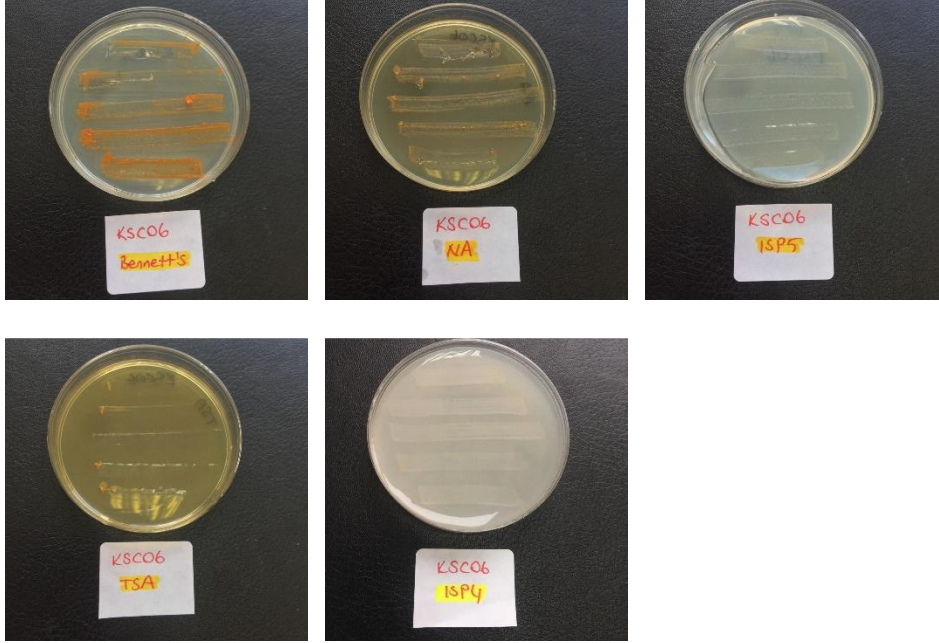
Şekil 9. GBT13 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2 ve Bennett's agar görüntüleri



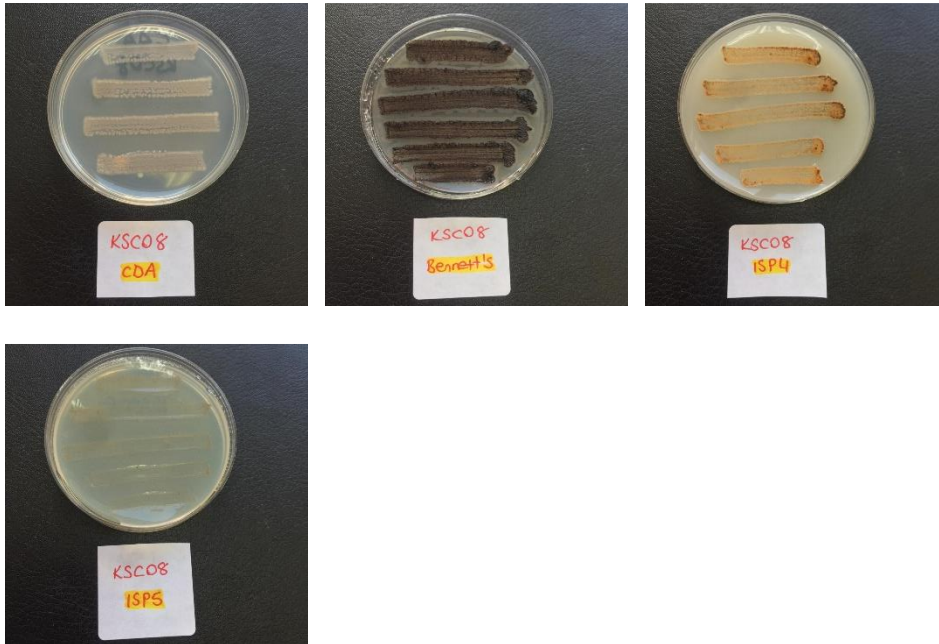
Şekil 10. GBT14 izolatının Bennett's agar görüntüsü



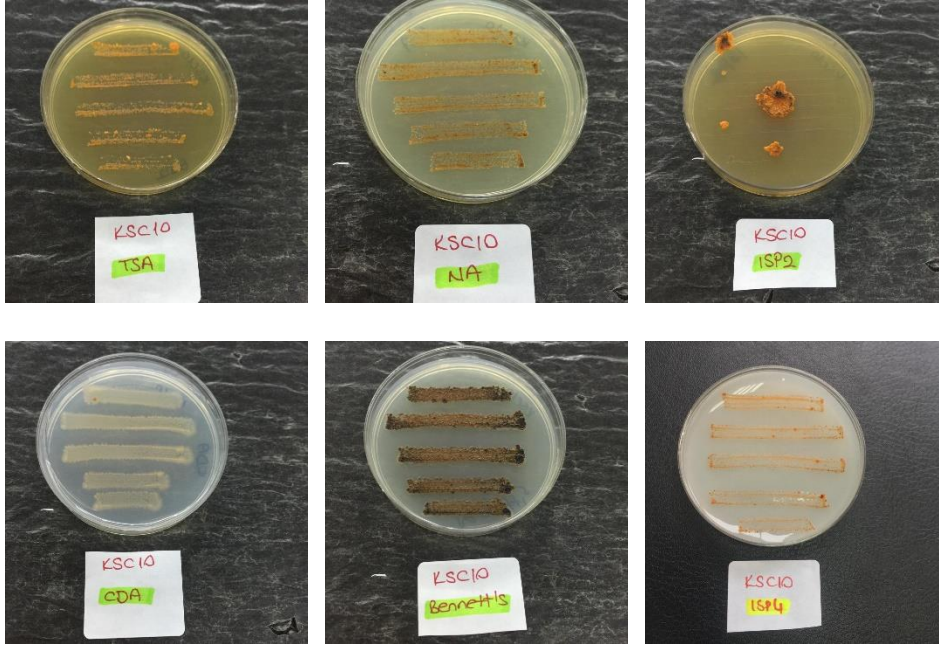
Şekil 11. GBT17 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri



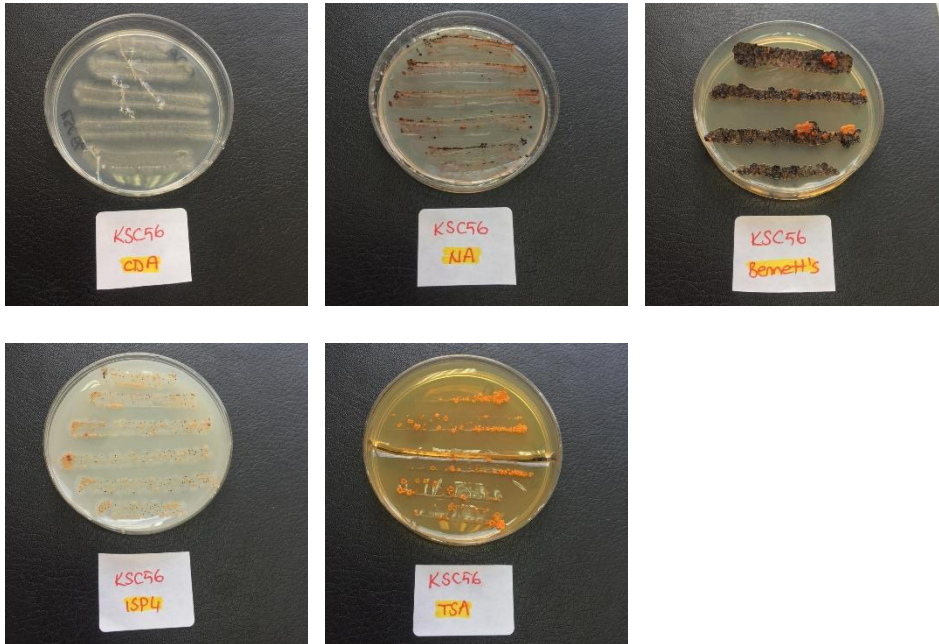
Şekil 12. KSC06 izolatının TSA, NA, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri



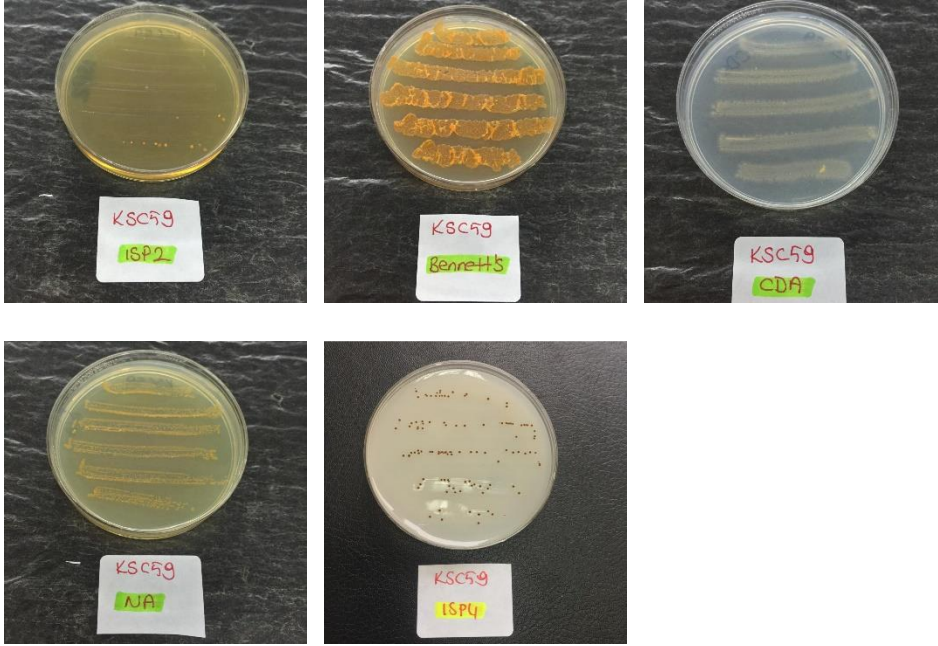
Şekil 13. KSC08 izolatının CDA, ISP 5, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri



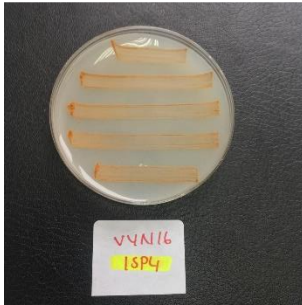
Şekil 14. KSC10 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri



Şekil 15. KSC56 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri

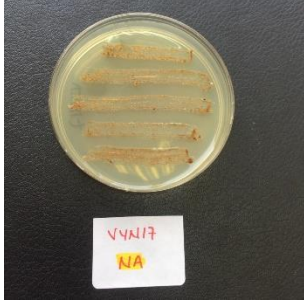


Şekil 16. KSC59 izolatının TSA, CDA, NA, ISP 2, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri

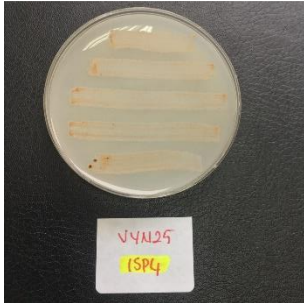
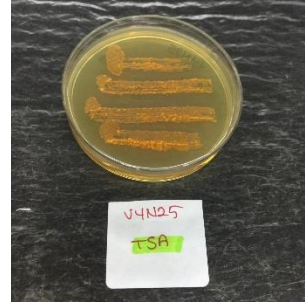
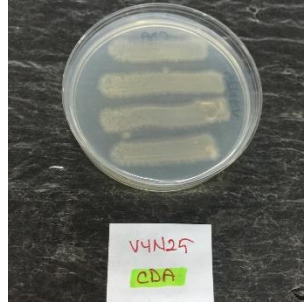
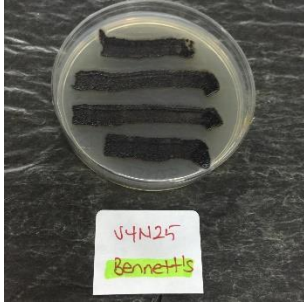


Şekil 17. VYN16 izolatının ISP 4 Agar görüntüleri

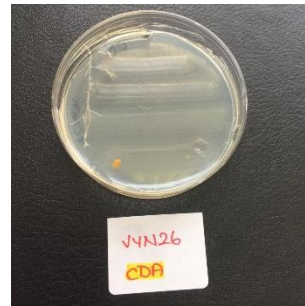
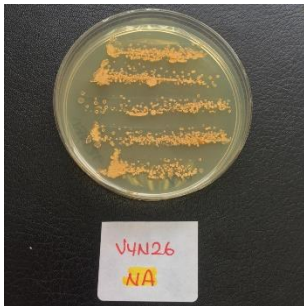


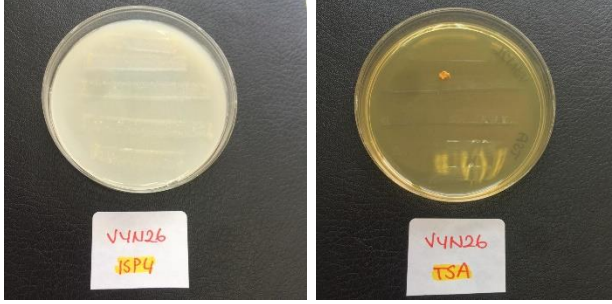


Şekil 18. VYN17 izolatının TSA, CDA, NA ve Bennett's agar görüntüleri



Şekil 19. GBT17 izolatının TSA, CDA, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri

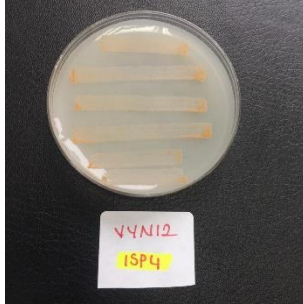




Şekil 20. VYN26 izolatının CDA, NA, TSA, ISP 4 ve Bennett's agar görüntüleri



Şekil 21. SLV11 izolatının ISP 4 agar görüntüsü



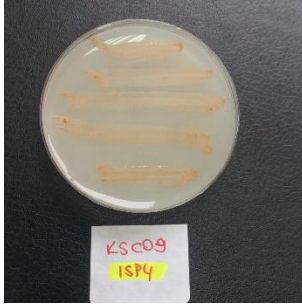
Şekil 22. VYN12 izolatının ISP 4 agar görüntüsü



Şekil 23. VYN35 izolatının ISP 4 agar görüntüsü



Şekil 24. GBT07 izolatının ISP 4 agar görüntüsü



Şekil 25. KSC09 izolatının ISP 4 agar görüntüsü

Micromonospora izolatları tüm belirtilen besiyerlerine ekilmiş ancak tümünde üreme göstermediği için elde edilen sonuçlar Şekil 9-25 arasında verilmiştir. Morfolojik olarak tanımlamada kullanılan *Micromonospora* izolatlarının besiyerlerindeki sonuçları Çizelge 6'de verilmiştir.



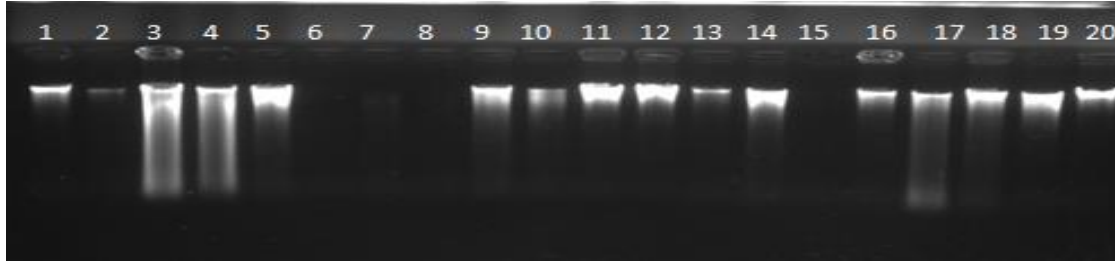
T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

	R :	R : Turuncu	R :	R :	R :	R :	R :	R :	R :	R :
	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :
	S :	S :++	S :	S :	S :	S :	S :	S :	S :	S :
	G :	G :++	G :	G :	G :	G :	G :	G :	G :	G :
GBT11	R :	R : Turuncu	R :	R :	R :	R :	R :	R :	R :	R :
	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :
	S :	S :++	S :	S :	S :	S :	S :	S :	S :	S :
	G :+++	G :+++	G :	G :	G :	G :	G :+++	G :+++	G :++	G :+++
GBT13	R : Turuncu	R : Kahve	R :	R :	R :	R :	R : Turuncu	R : Turuncu	R : Beyaz	R :
	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :
	S :++	S :+++	S :	S :	S :	S :	A :	A :	S :+++	A :
							S :++	S :+		S :++
	G :	G :	G :	G :	G :	G :	G :+++	G :	G :	G :
GBT14	R :	R :	R :	R :	R :	R :	R : Turuncu	R :	R :	R :
	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :
	S :	S :	S :	S :	S :	S :	A :	S :	S :	S :
							S :++			
	G :	G :++	G :+++	G :++	G :	G :	G :+++	G :+++	G :+++	G :+++
GBT17	R :	R : Turuncu	R : Beyaz	R : Beyaz	R :	R :	R : Turuncu	R : Turuncu	R : Beyaz	R :
	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :	A :
	S :	S :++	S :+	S :++	S :	S :	A :	A :	S :++	A :
							S :++	S :++		S :++

G:Germinasyon, R: Renk, S:Spor

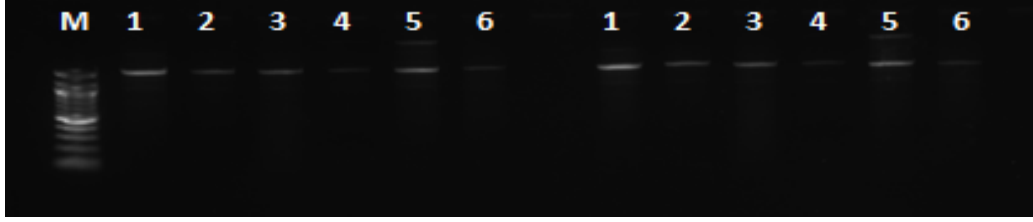
Genomik DNA İzolasyonu

Micromonospora izolatlarının, DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen, USA) kullanılarak yapılan DNA izolasyon sonuçları Şekil 26'de verilmiştir.

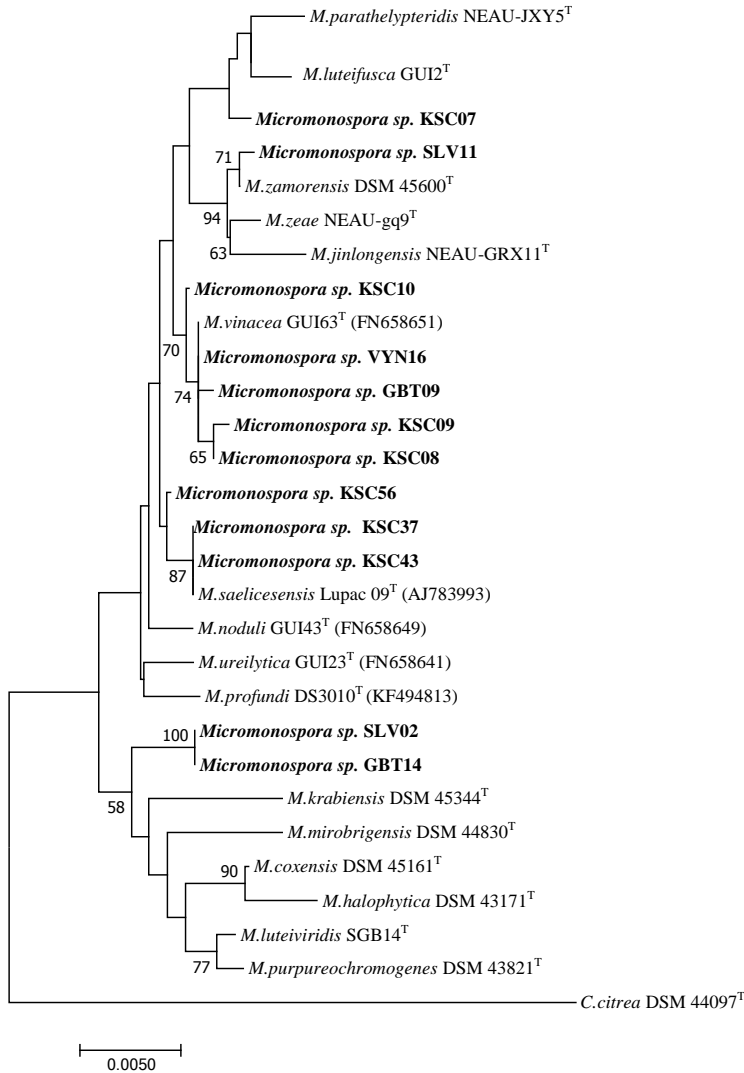


Şekil 26. DNA izolasyonu yapılan izolatların elüsyonlarının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü
1,KSC41; 2,KSC41; 3,KSC07; 4,KSC07; 5,SLV11; 6,SLV11; 7,KSC20; 8,KSC20; 9,KSC37;
10,KSC37; 11,GBT09; 12,GBT09; 13,KSC09; 14,KSC09; 15,KSC38; 16,KSC38; 17,SLV02;
18,SLV02; 19,KSC08; 20,KSC08;

Yapılan 6 izolatın 16S rRNA gen bölgesi için yapılan PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 27'de verilmiştir.



Şekil 27. Yapılan 6 İzolatın %1'lik agaroz jeldeki 16S rDNA görüntüsü; 1,KSC41; 2,GBT09; 3,KSC07; 4,KSC08; 5,SLV11; 6,KSC37; M; marker 100bp.



Şekil 28. *Micromonospora* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda %



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *C.citrea* DSM 44097^T (X93197) kullanılmıştır.

Çizelge 7. 16S rRNA analizi yapılan *Micromonospora* izolatlarının tip türleri içinde benzerlik oranları

	Kod	Dizi uzunluğu	Akraba	Nt farklılığı	% benzerlik
1	GBT09	1376	<i>Micromonospora vinacea</i>	3/1372	99.78
2	KSC07	1383	<i>M. parathelypteridis</i>	4/1383	99.75
3	KSC08	1359	<i>M. vinacea</i>	2/1357	99.78
4	KSC09	1359	<i>M. vinacea</i>	2/1357	99.78
5	KSC37	1427	<i>M. saelicesensis</i>	1/1420	99.93
6	KSC41	1200	<i>M. saelicesensis</i>	24/1200	98.00
7	SLV02	1396	<i>M. phytophila</i>	5/1394	99.64
8	SLV11	1379	<i>M. zamorensis</i>	1/1379	99.93
9	KSC06	1421	<i>M. coriariae</i>	4/1421	99.7
10	KSC38	1483	<i>M. saelicesensis</i>	1/1437	99.93
11	KSC43	1477	<i>M. saelicesensis</i>	2/1437	99.86
12	KSC50	1437	<i>M. parathelypteridis</i>	8/1437	99.44
13	VYN17	1437	<i>M. vinacea</i>	3/1418	99.79

Biber Tohumu Sterilizasyonu

Farklı deney düzeneklerinde benzer şekilde steril edilen *C. annuum* bitki tohumları kullanılmıştır. Petri kaplarında yapılan tohum çimlenme deneylerinde kontrol olarak kullanılan setin verileri Çizelge 8'de günlere ve sıcaklığa bağlı olarak verilmiştir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Çizelge 8: *C. annuum* bitki tohumlarının günlere bağlı olarak sıcaklık bazında çimlenme oranlarının tablosu

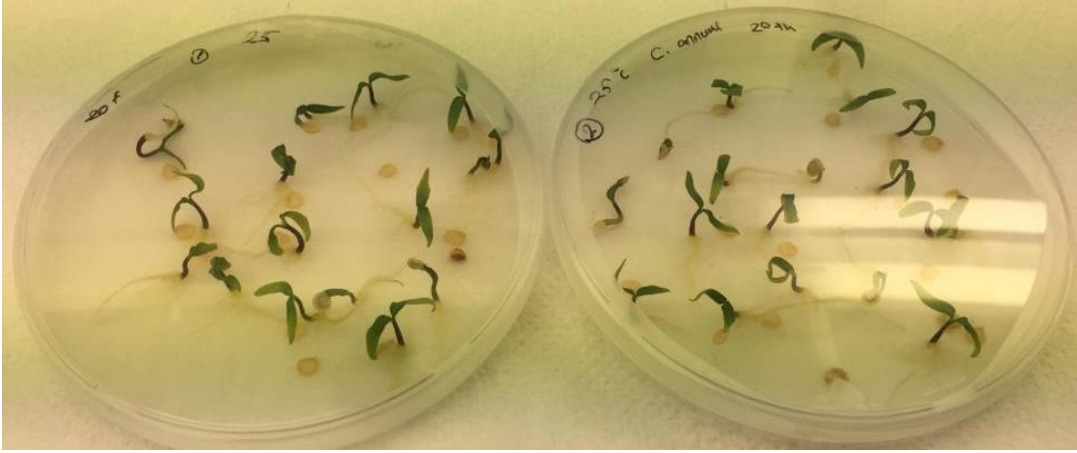
Day / Temperature	1. Day		2. Day		3. Day		4. Day	
	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.
25°C	40	0	40	3	40	10	40	20
35°C	41	0	41	4	41	4	41	4
45°C	42	2	42	4	42	4	42	4

Micromonospora izolatının uygulandığı bitki tohumlarının günlere ve sıcaklığa bağlı olarak çimlenme verileri Çizelge 9’de verilmiştir.

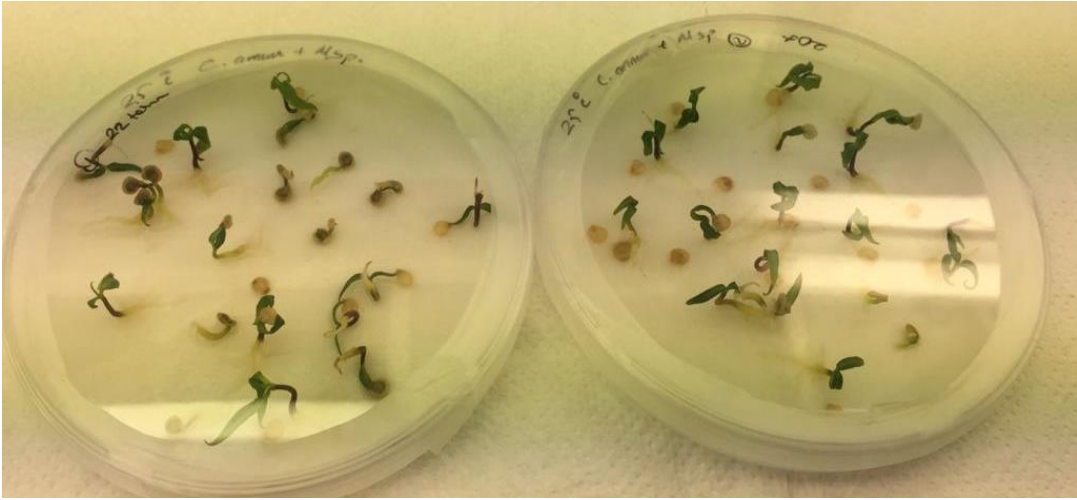
Çizelge 9: *Micromonospora* ile muamele edilmiş *C. annuum* bitki tohumlarının günlere bağlı olarak sıcaklık bazında çimlenme oranlarının tablosu

Day / Temperature	1. Day		2. Day		3. Day		4. Day	
	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.	Toplam T.	Çimlenen T.
<i>C. annuum</i> + <i>Micromonospora</i> sp. (KSC08)								
25°C	42	1	42	5	42	8	42	16
35°C	40	1	40	4	40	5	40	5
45°C	41	4	41	2	41	4	41	4

Sıcaklığa bağlı gelişen stresin azaltılabilmesi amacıyla farklı çalışmalarda mikroorganizma kullanımı mevcuttur. *Micromonospora* sp. (KSC08) izolatının da sıcaklık etkisine bağlı çimlenme oranını değiştirip değiştirmediği incelenmiş ve çimlenme yüzdesinde bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 29. *C. annuum* bitkisinin 25°C’de tohum çimlenme deney görüntüleri



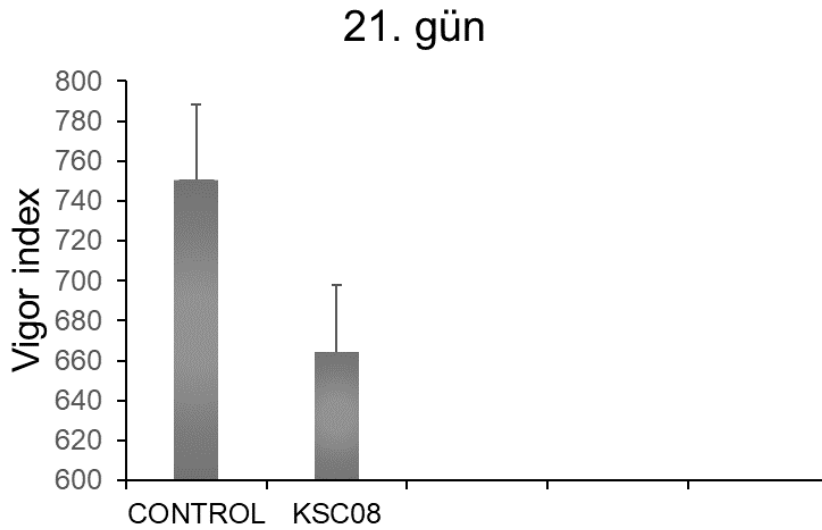
Şekil 30. KSC08 izolatu ile muamele edilmiş *C. annuum* bitkisinin 25°C’de tohum çimlenme deney görüntüleri



Şekil 31. *C. annuum* bitkisinin toprak/torf/vermikülit karşısındaki 21 günlük görüntüsü



Şekil 32. KSC08 izolatu ile muamele edilmiş *C. annuum* bitkisinin toprak/torf/vermikülit karşısındaki 21 günlük görüntüsü



Çizelge 10. *C. annuum* (control) grubu ve KSC08 (*Micromonospora* sp.) izolatının 21. gün vigor indeks sonuçları



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

4. SONUÇ

Micromonospora izolatlarının çeşitli enzim aktiviteleri yapılan testlerle değerlendirilmiştir. Buna bağlı olarak Çizelge 5’de yer alan sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma kapsamında indol asetik asit testi için triptofanaz enzimine sahip olup olmadığı değerlendirilen örneklerden 26 izolat pozitif sonuç vermiştir. KSC08, KSC09, KSC28 ve diğer 23 izolatın indol asetik test sonucu pozitif çıkarak pembe kompleksli renk yapısı oluşturmuş ve bu enzimin varlığını göstermiştir. Çalışma kapsamında kazein degradasyonu için proteaz aktivitesine bakılan *Micromonospora* izolatlarının 21 tanesinin bu teste pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Şeffaf bir zon oluşturan KSC01, KSC06, KSC07 ve diğer 18 gibi izolatların kazeinaz enzim varlığını belirlemiştir. *Micromonospora* izolatlarına uygulanan fosfat çözünebilirlik testi sonucunda GBT08, GBT13, GBT14 gibi toplam 16 organizma bu testte oluşturduğu şeffaf ve dar bir zonla pozitif sonuç vermiştir. Diğer bir testte ise izolatların nişasta gibi polisakkaritleri parçalama yetenekleri test edilmiştir. Uygulanan test sonucunda 36 izolat pozitif sonuç vererek test aşamasında lugol eriyiğini parçalayarak mavi renkte açılmaları sağlamıştır. KSC06, KSC07, KSC08, KSC09 gibi teste kullanılan çoğu organizma nişasta degradasyonunda olumlu sonuçlar vermiştir. Böylece *Micromonospora* izolatlarının nişasta degradasyon yeteneklerinin yüksek olduğu söylenebilir. Proje sürecinde yapılan bir diğer enzim testi izolatların selüloz degradasyon yeteneklerini belirleyebilmek için selüloz enzim testidir. *Micromonospora* izolatları selüloz testi için hazırlanan CMC agar ortamında üreme göstermediği için selüloz aktivitesi tespit edilememiştir. KSC08, VYN25, KSC01 gibi izolatlar yapılan hidrolitik enzim testlerinde diğer organizma gruplarına nazaran yüksek derecede pozitif sonuçlar vermişlerdir.

Proje kapsamında olmayan fakat *Micromonospora* izolatlarının bitkilerin farklı patojenlere karşı direncini arttırmasından yola çıkarak antifungal aktivite deneyleride yapılmıştır. Yapılan deney sonucunda 11 izolatın *Fusarium* sp. fungal patojenine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Uygulanan testlerde KSC16, KSC53, KSC59, VYN12, GBT07 ve GBT13 izolatları bitki patojeni olan *Fusarium* sp.’ye karşı direnç göstererek şeffaf ve dar bir zon vermiştir. *Micromonospora* izolatları çalışma sahaları dar olup henüz literatürde etkin sonuçları yer almamaktadır. Bu bağlamda Bilimsel Araştırma Projesinde yapılan deneyler ile 52 izolat



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

çalışılmış ve tarımsal alanda kullanılabilecek farklı izolatların eldesi tarımsal kullanımlar açısından önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KSC08 izolatu fosforu çözüme, indol asetik asit, siderefor üretimi ve proteini parçalama yeteneğini ile dikkat çeken bir organizma olmuştur. Bu izolat, TÜBİTAK 1002 projesinde kompost denemelerinde de kullanılmış ve kompost düzenleyici olarak etkin olduğu belirlenmiştir. Özellikle kompostta N oranında artışa neden olması ve enzim testlerinde de selülaz testi dışında tüm testlerde pozitif sonuç vermesi aynı zamanda diğer izolatlarla kıyasla daha hızlı üreme yeteneğine sahip olması nedeniyle bitki denemelerinde kullanılmak amacıyla seçilmiştir.

Farklı metotlar kullanılarak *Micromonospora* sp. izolatının biber bitkisi üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. İlk olarak petri kaplarında yapılan farklı sıcaklıklarda çimlenme yüzdelerine etkisi incelenmiş olup *Micromonospora* izolatının etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir.

İkinci olarak toprak/vermikülit/torf karışımı kullanılarak yapılan denemelerde *Micromonospora* izolatının 15. günde etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle hasat 21. güne ertelenmiştir. 21. günde ise *Micromonospora* izolatının etkinliğinin arttığı ve yaprak aya genişliklerini arttırdığı belirlenmiştir. Vigor indeksi ise çimlenme oranının düşük olması nedeniyle düşük olarak tespit edilmiştir. 2. hasatın ise ürüne kadar gidilerek yapılması planlanmıştır. *Micromonospora* izolatının yavaş üremesinin bir sonucu olarak bitki üzerindeki etkilerinde geç ortaya çıktığı düşünülmektedir. Meyveye kadar gidilerek izolatın bitkiye etkisi total olarak değerlendirilecektir. Projede ürüne kadar gidilmesi planlanmamış olup proje süresinde sona ermesi nedeniyle bu sonuçlar proje kapsamında verilememiştir.

Micromonospora izolatının bitki gelişimine etki ettiği yapılan denemeler ile belirlenmiştir. Bu projede hedeflenen en temel sonuç bu olmasının yanında yapılan 16S rRNA dizi çalışmaları ile de KSC50, SLV02, KSC06 ve KSC07 izolatlarının da olası yeni birer tür olma ihtimalleri projenin diğer önemli bir çıktısı olarak değerlendirilebilir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Projede belirtilen proje amaçları ve süreci uygun şekilde tamamlanarak '*Micromonospora* İzolatları Kullanılarak Biber (*Capsicum annuum*) Bitkisinde Bitki Büyümesinin Artırma Olanaklarının Araştırılması' adlı proje başarı ile tamamlanmıştır.

Projede mali olarak herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır. Proje, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında ve BAP biriminin karşıladığı bütçe ile yürütülmüştür.

Proje çalışmalarımızın sonuçlarından uluslararası kongrelerde sunulmak üzere **bildiri** hazırlanmıştır. Bu çalışmada Acknowledgement bölümüne proje numarası belirtilerek finansal desteği sağlayan kuruluş olarak Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi BAP birimine teşekkür edilmiştir. Ancak tüm dünyayı etkisi altına alan Covid 19 nedeniyle kongre katılımları gerçekleştirilememiştir. Normalleşme sürecinde kongre katılımları sağlanarak bilimsel olarak çalışma sonuçlarımızın literatüre kazandırılması hedeflenmektedir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

5. KAYNAKLAR

Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria, current perspective.and Francis Ltd.

Behal, V., 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. Adv. Appl. Microbiol. 47, 113–157.

Buckenhuskes, H. J. (2003). Current requirements on paprika powder for food industry. In: Krishna, A. (Ed.). *Capsicum: The genus Capsicum*, (pp. 223-230). London: Taylor

Conn, V.M., Walker, A.R., Franco, C.M.M., 2008. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 208_218.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E. St.J., Sivasithamparam K., Hussein A.M., Kurtböke I.D., 1997. The potential for biological control of cavityspot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes, New Phytol., 137, 495-507.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E., Sivasithamparam K., Kurtböke I.D., 1996a. Microbiological differences between limed and unlimed soils and their relationship with cavity spot disease of carrots (*Daucus carota* L.) caused by *Pythium coloratum* in Western Australia, Plant and Soil., 183, 279-290.

El-Tarabily K.A., Nassar A.H., Hardy G.E. St.J., Sivasithamparam K., 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. J. of App, Microbiol., 106, 13-26.

El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, Soil Biology and Biochemistry, 38 (7), 1505-1520.

El-Tarabily K.A., Sykes M.L., Kurtböke I.D., Hardy G.E. St.J., Barbosa A.M., Dekker R.F.H., 1996b. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root-rot of *Banksia grandis*, Canadian Journal of Botany., 74, 618–624.

Erikson D., 1941. Studies on some lake-mud strains of *Micromonospora*. Journal of Bacteriology, 41, 277-300.

FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>; Accessed 14.08.18



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Gacto M., Vicente-Soler J., Cansado J., Villa T.G., 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells, J.of App. Microbiol., 88, 961-967.

Gurovic M. S. V., Müller S., Domin N., Seccareccia I., Nietzsche S., Martin K. and Nett M., 2013. *Micromonospora schwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil, Int J Syst Evol Microbiol., 63, 3812–3817
J. King Saud Univ.-Sci. 26, 1–20.

Kawamoto I., Okachi R., Kato H., Yamamoto S., Takahashi I., Takasawa S., Nara T., 1974. The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization, J. Antibiot., 27, 493-501.

Krasil'nikov, N. A. 1938. Ray fungi and related organism – Actinomycetales. Akademia Nauk SSSR, Moscow.

Maldonado, L.A., Fragosa-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., Quintana, E.T., 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. AntonieVan Leeuwenhoek 95, 111-120.

Merzaeva, O.V., Shirokikh, I.G., 2006. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. Microbiology 75, 226-230.

Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman , C.A., Fenical , W., 2002. Widespread and persistent population of a major actinomycete taxon in ocean sediment. Applied and Environmental Microbiology 68, 5005-5011

Padilha, H. K. M., Pereira, E. d. S., Munhoz, P. C., Vizzotto, M., Valgas, R. A., & Barbieri,R. L. (2015). Genetic variability for synthesis of bioactive compounds in peppers (*Capsicum annuum*) from Brazil. *Food Science and Technology*, 35, 516-523.

Ren J., Li L., Wei B., Tang Y. L., Deng Z. X., Sun M. and Hong K., 2013. *Micromonospora wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. Int. J. Syst. Bacteriol., 63, 2389–2395

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes, sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus 2, 587.

Shimizu, M., Meguro, A., Hasegawa, S., Nishimura, T., Kunoh, H., 2006. Disease resistance induced by non antagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue-cultured seedlings of rhododendron. J. Gen Plant Pathol. 72, 351_354.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Shimizu, M., Yazawa, S., Ushijima, Y., 2009. A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of Cucumber anthracnose. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 27_36.

Songsumanus A., Tanasupawat S., Igarashi Y. and Kudo T., 2013. *Micromonospora maritima* sp. nov., isolated from mangrove soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 554–559

Suzuki, S., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Nakanishi, N., Komatsubara, S., 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetologica* 14, 27–33.

Thampi, P.S.S. (2004). A glimpse of the world trade in Capsicum. *Chapter 2. Capsicum, the genus Capsicum. De A.K., (Ed.).* CRC Press Inc., Taylor & Francis Group, London, UK.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, k., Kudo, T., 2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov. isolated from a Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 55, 417422.

Trujillo, M.E., Kroppenstedt, R.M., Ferná'ndez-Molinero, C., Schumann, P., Martí'nez-Molina, E., 2007. *Micromonospora lupin* sp. nov. And *Micromonospora licesensis* sp.nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (12), 2799_2804.

Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I., 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Mikrobiologiya* 74, 55–62.

Vobis G., 2006. The genus *Actinoplanes* and related genera. In *The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, volume 3, Chapter 1.1.9., Springer, 623-653, Springer.

Walter, M.Y., Crawford, D.L., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3119–3128.

Wilson D., 1992. Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 45-63.

Zenova, G.M., Zviagintsev, D.G., 2002. Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in meadow ecosystems. *Microbiology* 71, 662-666.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

6. EKLER

Ek-A.

Kültür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı

Humik Asit Vitamin Agar (HV agar, Hayakawa ve Nomomura, 1987)

Humik asit vitamin agar (HV agar), nocardioform ve nadir aktinomisetlerin izolasyonunda selektif besiyeri olarak kullanıldı.

Humik asit	1 gr
Na ₂ HPO ₄	0,5 g
KCl	1,7 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	50 mg
FeSO ₄ -7H ₂ O	10 mg
CaCO ₃	10 mg
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Ortama ilave edilmeden önce, humik asit 10 ml 0,2 N NaOH içinde çözüldü ve diğer ortam bileşenleriyle birlikte birkaç dakika homojen olana kadar kaynatıldı ve oda ısısında biraz soğutulduktan sonra pH'sı 0,1 M NaOH veya HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilip homojen hale gelene kadar karıştırılarak kaynatıldı. Kaynama esnasında buharlaşan su kısmı tamamlandı ve hazırlanan kültür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Distile suda çözülen vitamin karışımı, steril 0,45 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edildi ve stoklama yapılan şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C'de saklandı. Otoklavlanan ve 55°C'de bir süre bekletilen besiyeri ortamına antibiyotiklerle birlikte her 400 ml'ye 1 ml olacak şekilde vitamin stok solusyonundan ilave edildi.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Vitamin Stok Solusyonu

Thiamine hydrochloride	0,5 mg
Riboflavin	0,5 mg
Niacin	0,5 mg
Pyridoxine hydrochloride	0,5 mg
İnositol	0,5 mg
Calcium pantothenote	0,5 mg
p-Aminobenzoik acid	0,5 mg
Biotin	0,25 mg
Distile su	10 ml

Nutrient agar besiyeri

8 g nutrient broth, 15 g agar tartımları yapılarak 1000 ml suda çözüldü. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirildi. Petrilere döküldü.

SM3 besiyeri

10 g glukoz, 3 g tripton, 5 g pepton, 5 g NaCl, 15 g agar tartımları yapılarak 1000 ml suda çözdürüldü. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirildi. Otoklavdan çıkan besiyeri, antibiyotiğin etkisinin kaybolmaması için soğumaya bırakılarak soğumasına yakın 2.5 ml nalidix asit eklendi ve petrilere dökümleri steril kabinette karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Tyriptone Yeast Extract Agar

3 g tripton, 5 g yeast extract, 5 g glukoz, 15 g agar tartımları yapılarak 1000 ml suda çözdürüldü. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirildi. Otoklavdan çıkan besiyeri, antibiyotiğin etkisinin kaybolmaması için soğumaya bırakılarak soğumasına yakın 2.5 ml rifampicin, sikloheksimid, nalidix asit eklendi ve petrilere dökümleri steril kabinette karanlık ortamda gerçekleştirildi.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Glucose Yeast Extract Agar

4 g glukoz, 4 g yeast extract, 10 g malt extract, 12 g agar tartımları yapılarak 1000 ml suda çözdürüldü. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirildi. Otoklavdan çıkan besiyeri, antibiyotiğin etkisinin kaybolmaması için soğumaya bırakılarak soğumasına yakın 2.5 ml rifampicin, sikloheksimid, nalidix asit eklendi ve petrilere dökümleri steril kabinette karanlık ortamda gerçekleştirildi.

ISP 2 (Yeast Malt Ekstrakt agar)

Yeast Ekstrakt 4 g

Malt Ekstrakt 10 g

Dektroz 4 g

Agar 15 g

Distile su 1000 ml

pH 7.2 ± 0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

ISP 3

Oat Meal 20.000 g

Agar 18.000 g

Ferric sulphate heptahydrate 0.001 g



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Trace salts, -

Manganese chloride tetrahydrate 0.001 g

Zinc sulphate heptahydrate 0.001 g

Distile su 1000 ml

pH 7.3±0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutulularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

ISP 4 (Inorganic Salt Starch Agar)

Starch, soluble 10.000 g

Dipotassium phosphate 1.000 g

Magnesium sulphate. heptahydrate 1.000 g

Sodium chloride 1.000 g

Ammonium sulphate 2.000 g

Calcium carbonate 2.000 g

Ferrous sulphate, heptahydrate 0.001 g

Manganous chloride, 7H₂O 0.001 g

Zinc sulphate, 7H₂O 0.001 g

Agar 20.000 g

Distile su 1000 ml

pH 7.2±0.2



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

ISP 5 (Glycerol Asparagine Agar Base)

L-Asparagine 1000 g

Dipotassium phosphate 1000 g

*Trace salt solution (ml) 1000 g

Agar 20000 g

Distile Su 1000 ml

1ml of Trace salt solution contains -

Ferrous sulphate heptahydrate 0.001 g

Manganese chloride tetrahydrate 0.001 g

Zinc sulphate heptahydrate 0.001 g

pH 7.4±0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. 10 ml gliserol eklendi. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

ISP 7 (Tyrosine Agar)

L-Asparagine 1000 g



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

L-Tyrosine 0.500 g
Dipotassium phosphate 0.500 g
Magnesium sulphate. 7H₂O 0.500 g
Sodium chloride 0.500 g
*Trace salt solution (ml) 1000
Agar 20000 g
Distile su 1000 ml
*Trace salt solution contains -
Ferrous sulphate, 7H₂O 1.360 mg
Copper chloride, 2H₂O 0.027 mg
Cobalt chloride, 6H₂O 0.040 mg
Sodium molybdate, 2H₂O 0.025 mg
Zinc chloride 0.020 mg
Boric acid 2.850 mg
Manganese chloride, 4H₂O 1.800 mg
Sodium tartarate 1.770 mg
pH 7.3±0.1

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. 15 ml gliserol eklendi. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutulularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

Bennet's Agar

Yeast extract 1000 g
Beef extract 1000 g



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Casein enzymic hydrolysate 2000 g

Dextrose 10000 g

Agar 15000 g

Distile su 1000 ml

pH 7.3±0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutulularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

Czapek Dox Agar

Sucrose 30000 g

Sodium nitrate 2000 g

Dipotassium phosphate 1000 g

Magnesium sulphate 0.500 g

Potassium chloride 0.500 g

Ferrous sulphate 0.010 g

Agar 15.000 g

Distile su 1000 ml

pH 7.3±0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 20



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutulularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

Tryptic Soy Agar

Tryptic soy broth 30000 g

Agar 15 g

Distile su 1000 ml

pH 7.3±0.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121°C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlandı. Ardından cam şişeler 60 °C'ye kadar su banyosunda soğutulularak steril ortamda plastik petri kaplarına döküldü.

DNA İzolasyon Bileşenleri ve Hazırlıkları

Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0,5 M EDTA, pH 8

EDTA (Merck) 186,1 g

DDH₂O (Double distile su) 1000 ml

800 ml DDH₂O içerisine 186,1 g EDTA ve 20 g NaOH pelleti ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşınca kadar çözüldü. Son hacim DDH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

1 M Tris, pH 8

Tris (Merck) 121,1 g

DDH₂O 1000 ml

800 ml DDH₂O içerisine 121,1 g tris ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C'de berraklaşınca kadar çözülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH 8'de 1 M Tris elde etmek için solüsyon içerisine 42 ml %38'lik HCl ilave edildi. Son hacim DDH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

TE tamponu, pH 8

0,5M EDTA, pH 8 (Merck) 2 ml

1M Tris, pH 8 10 ml

DDH₂O 1000 ml

Tampon 1000 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrolü yapıldı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Lizozim (50 mg/ml)

Lizozim (Sigma) 500 mg

TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) 10 ml

500 mg lizozim 10 ml TE tampon içerisinde çözülerek hazırlandı. 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18°C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

Proteinaz K (2 mg/ml)

Proteinaz K (AppliChem) 2 mg

TE tamponu 10 ml

2 mg proteinaz K 10 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18°C'de kullanım zamanına kadar saklandı.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

%70'lik etanol

%100'lük alkol 70 ml

DDH₂O (otoklav edilmiş) 30 ml

Steril 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişe içerisinde steril cam pipetler kullanılarak solüsyon hazırlandı ve -18°C'de saklandı.

RNAaz (10 mg/ml)

RNAaz (AppliChem) 10 mg

TE tamponu 1 ml

10 mg RNA az 1 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18°C'de saklandı.

DNA İzolasyonu Kontrolünde Kullanılan Çözeltiler

TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA; 10x, pH 8)

Tris 121,10 g

Borik asit (Merck) 61,83 g

EDTA (susuz) 5,84 g

DDH₂O 1000 ml

Solüsyon içerikleri tartıldı ve 1000 ml'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 ml DDH₂O ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmaya kadar tutuldu. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanıp, %33'lük HCl kullanılarak pH 8'e ayarlandı ve +4°C'de saklandı. Presipitat oluştuğu takdirde kullanılmamalıdır.

1XTBE, pH 8

10xTBE tamponu 50 ml

DDH₂O 450 ml

Solüsyon içerikleri mezürle ölçülüp, ağzı kapaklı 500 ml'lik cam şişe içine konularak oda sıcaklığında tutuldu.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Etidyum Bromür (10 mg/ml stok)

Etidyum bromür (Sigma) 100 mg

DDH₂O 10 ml

100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişe içerisine 100 mg etidyum bromür ve 10 ml DDH₂O su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak hazırlandı. Şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılarak +4°C'de saklandı. Hazırlanan bu solüsyondan her 100 ml agarozu 5 µl olacak şekilde ilave edilmektedir. Agaroz hazırlarken etidyum bromürün buharlaşmasını engellemek için sıcaklık ~ 60°C'ye gelince ilave edilmelidir.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

EK-1. Proje Mali Etkinlikleri

T.C. BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNATÖRLÜĞÜ Avans/Kredi talebi				
Proje Bilgileri				
Proje Yürütücüsü	Dr.Öğr.Üyesi Fadime ÖZDEMİR KOÇAK			
Proje Numarası	2018-02.BŞEÜ.25-02			
Projenin Türü	A. 1) GENEL AMAÇLI PROJELER			
Projenin Adı	Micromonospora İzolatları Kullanılarak Biber (Capsicum annuum) Bitkisinde Bitki Büyümesinin Artırma Olanaklarının Araştırılması			
Proje Süresi	12 Ay			
Proje Kalan Bütçe	4,132.96 TL			
Önceden Avans Kullanmış mı? Kullanmış ise Miktarı	---			
Talep Edilen Avans Miktarı	2,812.55 TL			
Avans ile alınacak malzeme/hizmet listesi				
No	Malzeme/Hizmet adı	Miktarı	Birim Fiyatı	Toplam Tutarı
1	Dizilme analizi	60 Adet	41.72 TL	2,503.20 TL
2	Purifikasyon	23 Adet	13.45 TL	309.35 TL
Avans için görevlendirilen harcama yetkilisi metemeli				
Adı Soyadı	: Fadime ÖZDEMİR KOÇAK			
T.C. Kimlik No	: 18305823538			
Banka Adı	: Halkbank			
Banka Hesap/IBAN	: TR 29 0001 2009 3640 0001 0115 12			
Avans Talebi Gerekçesi ve Açıklaması				
BAP projesi kapsamında N tutma kapasitesine sahip olduğu belirlenen Micromonospora benzeri izolatlar, bitki gelişimini teşvik eden farklı mekanizmalar açısından incelenecektir. Bu mekanizmaların varlığı ise Sellüloz aktivitesi, Kaseinaz Testi, İndol Asetik Asit testi (IAA), Siderofor testi ve Fosfat çözünürlüğü testi ile belirlenmiştir. İzolatlar bu testlerin sonuçları göz önünde bulundurularak morfolojik benzerlikler açısından da incelenmiştir. Tüm bu değerlendirmeler neticesinde seçilen Micromonospora izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi analizlerinin yapılabilmesi amacıyla Macrogen Inc (Hollanda) firmasından hizmet alımı yapılacaktır. Elde edilen dizilerin filogenetik analizleri yapılarak izolatlar arasındaki akrabalık ilişkileri belirlenecektir. Tüm sonuçlar değerlendirilecek ve biber bitkisinde kullanılacak aday/adaylar belirlenecektir.				

AVANS TALEP DİLEKÇESİ

Yürütücüsü bulunduğum projem kapsamında, yukarıda belirtmiş olduğum gerekçeler ve açıklamalar doğrultusunda **avans talebimin** karşılanması hususunda;
Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Proje Yürütücüsünün		
Unvanı / Adı SOYADI	TARİH	İMZA
Dr.Öğr.Üyesi Fadime ÖZDEMİR KOÇAK	03-01-2020	



BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Dr.Öğr.Üyesi Fadime ÖZDEMİR K

Proje Kasaları

Proje Düzenle

- Proje Özeti
- Detay Bilgileri
- Proje Kasaları 2
- Satınalma Talepleri 1
- Bursiyer Talepleri
- Yolluk Talepleri
- Diğer Ek Talepler 2
- Malzeme Listesi
- Demirbaş Malzemeler 44

Hesap Kodu	Hesap Adı	Bütçe	Harcanan	Kalan
830.03.02.06.01	Laboratuvar MALZemesi İle Kimyevi ve Temrinlik Malzeme Alımları	10,179.04 TL	10,178.08 TL	0.96 TL
830.03.05.09.90	diğer Hizmet Alımları	4,132.00 TL	3,234.01 TL	897.99 TL
Toplam :		14,311.04 TL	13,412.09 TL	898.95 TL

Harcama Bilgileri

Tarih	Belge No	Ödeme Yapılan	Ödeme miktarı	Ödenek	Avans
18-02-2020	202000043	Fadime ÖZDEMİR KOÇAK	421 TL	-421.46 TL	
14-02-2020	202000010	Fadime ÖZDEMİR KOÇAK (AVANS KAPATMA)	2,813 TL	-2,812.55 TL	+2,812.55 TL
31-01-2020	202000005	Fadime ÖZDEMİR KOÇAK (AVANS ALIMI)	2,813 TL		-2,812.55 TL
03-09-2019	201900157	BEND MÜHENDİSLİK	10,178 TL	-10,178.08 TL	
Toplam Harcanan :			13,412.09 TL		0.00 TL
Toplam Kalan :				898.95 TL	898.95 TL