

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Onchorhynchus mykiss*) ÇİFTLİKLERİNDE HASTALIK
OLUŞTURAN *PSEUDOMONAS* TÜRLERİNİN GENETİK ANALİZİ

ZEYNEP ZEHRA İPEK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FİKRİ BALTA
TEZ JÜRİLERİ
PROF.DR. İLHAN ALTINOK
DOÇ.DR. ŞEVKİ KAYIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2015
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(Onchorhynchus mykiss) ÇİFTLİKLERİNDE HASTALIK OLUŞTURAN
PSEUDOMONAS TÜRLERİNİN GENETİK ANALİZİ**

Doç. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında, Zeynep Zehra İPEK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08/06/15 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
Üye	: Doç. Dr. Fikri BALTA
Üye	: Doç. Dr. Şevki KAYIŞ

İmzası




Prof. Dr. Selami SAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda, Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşuğu alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde, hastalıklara sebep olan *Pseudomonas* cinsinin 16S rRNA, *rpoD* ve *rpoB* genleri kullanılarak tanımlanması ve filogenetik ilişkisinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikri BALTA'ya, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarında ve örneklemelelerde yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşım İsmail AKSU'ya ve bu süreçte gösterdikleri manevi destekler için iş arkadaşlarım Arş. Gör. Hazel BAYTAŞOĞLU ve Arş. Gör. Esra DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Hayatımın her anında desteklerini gördüğüm, başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışmasını 2013.103.02.1 no'lu projeye destekleyen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep Zehra İPEK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Gökkuşığı Alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) Çiftliklerinde Hastalık Oluşturan *Pseudomonas* Türlerinin Genetik Analizi başlıklı bu tez, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 12/05/2015

Zeynep Zehra İPEK

Uyarı: *Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchorhynchus mykiss*) ÇİFTLİKLERİNDE HASTALIK OLUŞTURAN *PSEUDOMONAS* TÜRLERİNİN GENETİK ANALİZİ

Zeynep Zehra İPEK

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Fikri BALTA

Bu çalışmada, 2013 Ocak ve 2014 Haziran tarihleri arasında, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki balık çiftliklerinden izole edilen *Pseudomonas* türleri üç tane referans gen ile çalışılmıştır (16S rRNA, *rpoD* ve *rpoB*). Daha iyi bir tanımlama amacıyla, 28 tane *Pseudomonas* suşu biyokimyasal testler ve *Pseudomonas* türleri için özel primerler tarafından analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, gen ağaçları *Pseudomonas fluorescens* grubu ve *Pseudomonas putida* grubu olarak adlandırılan iki gruba ayrılmıştır. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşları genellikle, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas sp.* olarak ve iki suş *Pseudomonas lundensis* ve bir suş ise *Pseudomonas baetica* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma aynı zamanda *Pseudomonas* suşları için, *rpoD* geninin 16S rRNA ve *rpoB* genine göre daha iyi bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiştir.

2015, 92 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas*, Balık Hastalıkları, Genetik, 16S rRNA, *rpoD*, *rpoB*.

ABSTRACT

THE GENETIC ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS* SPECIES WHICH FORMING DISEASES IN RAINBOW TROUT (*Onchorhynchus mykiss*) HATCHERIES IN THE EASTERN BLACK SEA REGION

Zeynep Zehra İPEK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fikri BALTA

In this study, between January 2013 and June 2014, *Pseudomonas* species, which were isolated from fish farms of the Eastern Black Sea Region, studying with three housekeeping genes (16S rRNA, *rpoD* and *rpoB*). The purposes of improved identification, 28 *Pseudomonas* strains were analyzed using biochemical tests and special primers for *Pseudomonas* species. As a result of this study, gene trees discrimination of two groups, called *Pseudomonas fluorescens* group and *Pseudomonas putida* group. *Pseudomonas* strains, which were used in this study, were determined as *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas sp.* and two strains were of these *Pseudomonas lundensis* and one of *Pseudomonas baetica*. This study also demonstrated that the *rpoD* genes have improved discriminative power than 16S rRNA and *rpoB* genes for *Pseudomonas* strain.

2015, 92 pages

Keywords: *Pseudomonas*, Fish Disease, Genetic, 16S rRNA, *rpoB*, *rpoD*.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. <i>Pseudomonas</i> Sınıflandırmasının Tarihi	4
1.1.2. Sistematikte Kullanılan Teknikler	10
1.1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	10
1.1.2.2. DNA Dizi Analizi	11
1.1.2.3. Filogenetik Analiz Metotları	13
1.1.2.3.1. Mesafe Temelli Yöntemler	14
1.1.2.3.1.1. UPGMA (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup) Metodu	14
1.1.2.3.1.2. Neighbour-Joining (Komşu Katılım) Metodu	14
1.1.2.3.2. Karakter Temelli Yöntemler	15
1.1.2.3.2.1. Maksimum Parsimoni (Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi)	15
1.1.2.3.2.2. Maksimum Likelihood (En Yüksek Olasılık Yöntemi)	16
1.1.2.3.2.3. Bayesian Çıkarsama Metodu	16
1.1.3. <i>Pseudomonas</i> Ayrımında Kullanılan Markerlar.....	17
1.1.4. Bazı Önemli <i>Pseudomonas</i> Türleri	17
1.2. Literatür Özeti	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	24
2.1. Materyal	24
2.2. Yöntem	24
2.2.1. İzole Edilen Suşların Morfolojik Karakterlerinin Belirlenmesi.....	24
2.2.2. Biyokimyasal ve Fiziksel Testler	25

2.2.2.1.	Hareket Testi	25
2.2.2.2.	Gram Boyama Testi	25
2.2.2.3.	Oksidaz Testi	25
2.2.2.4.	Katalaz Testi	26
2.2.2.5.	Eskülin Ayrışması Testi	26
2.2.2.6.	Jelatin Hidrolizasyon Testi	26
2.2.2.7.	TSI (Triple Sugar Iron) Testi	27
2.2.2.8.	Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) Testi	27
2.2.2.9.	Sitrat Testi	27
2.2.2.10.	İndol Testi	28
2.2.2.11.	Üreaz Testi	28
2.2.2.12.	Voges-Proskauer (VP) ve Metil Kırmızısı (MR) Testleri	28
2.2.2.13.	Nitrat Redüksiyon Testi.....	29
2.2.2.14.	Tuzluluk Adaptasyon Testi	29
2.2.2.15.	Dekarboksilaz (Arjinin-Ornithin-Lizin) Testi	29
2.2.3.	Antimikrobiyal Hassasiyet Testi	30
2.2.4.	DNA izolasyonu	30
2.2.5.	Kullanılan Primerler ve PZR Uygulamaları	32
2.2.6.	DNA İzolasyon ve PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kalitesinin Tayini	34
2.2.7.	DNA Dizin Analizi	34
2.2.8.	Genbank Taraması, Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz	34
3.	BULGULAR	36
3.1.	Bakterilere Ait Bulgular	36
3.2.	Antibiyotik Dirençliliği	39
3.3.	Moleküler İdentifikasyonda 16S rRNA Primeri Kullanılarak Yapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması	41
3.4.	Moleküler İdentifikasyonda <i>rpoB</i> Primeri KullanılarakYapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması	51
3.5.	Moleküler İdentifikasyonda <i>rpoD</i> Primeri Kullanılarak Yapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması.....	63
3.6.	Birleştirilmiş Filogenetik Ağaçlar.....	72
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	77
5.	ÖNERİLER	83

KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>Pseudomonas</i> türlerine ait grupların dağılımı	9
Şekil 2.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 'in alt gruplarının dağılımı	10
Şekil 3.	DNA dizi kromotagramı	12
Şekil 4.	Triple Sugar Iron Agar Testleri	36
Şekil 5.	Sitrat Testleri	36
Şekil 6.	Jelatin Hidroliz Testi	38
Şekil 7.	Üre Testi	38
Şekil 8.	Oksidasyon ve/veya Fermentasyon Testi	38
Şekil 9.	Arjinin Dihidrolaz Testi	38
Şekil 10.	Antibiogramda test edilen antibiyotiklere karşı <i>Pseudomonas</i> suşlarına ait toplam direnç miktarı (%)	41
Şekil 11.	Maksimum Likelihood (ML) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı	42
Şekil 12.	Neighbour-Joining (NJ) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı	43
Şekil 13.	Maksimum Parsimony (MP) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı ...	44
Şekil 14.	Maksimum Likelihood (ML) analizine göre <i>rpoB</i> filogenetik ağacı	52
Şekil 15.	Neighbour- Joining (NJ) analizine göre <i>rpoB</i> filogenetik ağacı	53
Şekil 16.	Maksimum Parsimony (MP) analizine göre <i>rpoB</i> filogenetik ağacı	54
Şekil 17.	Maksimum likelihood (ML) analizine göre <i>rpoD</i> filogenetik ağacı	64
Şekil 18.	Neighbour-Joining (NJ) analizine göre <i>rpoD</i> filogenetik ağacı	65
Şekil 19.	Maksimum Parsimony (MP) analizine göre <i>rpoD</i> filogenetik ağacı	66
Şekil 20.	Maksimum Likelihood (ML) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i>) filogenetik ağacı	73
Şekil 21.	Maksimum Parsimony (MP) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i>) filogenetik ağacı	74
Şekil 22.	Neighbour-Joining (NJ) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i>) filogenetik ağacı	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Filogenetik analizler sonucunda benzer bulunan diğer <i>Pseudomonas</i> türleri	19
Tablo 2.	Laboratuvara Getirilen Balıkların Alındığı Çiftlik Kodları ve Bulunduğu İller	24
Tablo 3.	Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotik disk konsantrasyonu ve ölçülen inhibisyonzon çaplarına göre duyarlılık aralıkları	30
Tablo 4.	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar	32
Tablo 5.	16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>rpoD</i> genlerinin artırılması ve dizin analizi için kullanılan primerler	33
Tablo 6.	Kullanılan Primerler için PZR döngü koşulları	33
Tablo 7.	Nitrat, Üçlü şeker ve % 7'lik tuzda üreme testlerin sonuçları	37
Tablo 8.	Antibiyogram test sonucuna göre <i>Pseudomonas</i> suşlarına ait direnç profilleri	40
Tablo 9.	P1, P13, P84, P60 ve P28'in 16S rRNA gen analizi sonucu benzediği türler	45
Tablo 10.	P48 ve P66'nın 16S rRNA gen analizi sonucu benzediği türler	45
Tablo 11.	P47'nin 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	46
Tablo 12.	P91, P67 ve P54'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	46
Tablo 13.	P58'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	47
Tablo 14.	P7, P49, P64, P8 ve P9'un 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	48
Tablo 15.	P85 ve P73'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	48
Tablo 16.	P65'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	49
Tablo 17.	P52 ve P5'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	49
Tablo 18.	P56 ve P38'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	50
Tablo 19.	P2'nin 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	50
Tablo 20.	P24'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	50
Tablo 21.	P50 ve P53'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler	51
Tablo 22.	P53 ve P50'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları ..	55
Tablo 23.	P24'ün <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	55
Tablo 24.	P56'nın <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	55
Tablo 25.	P38'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	56
Tablo 26.	P2'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	56

Tablo 27.	P52'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	56
Tablo 28.	P5 ve P65'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	57
Tablo 29.	P7'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	57
Tablo 30.	P49'un <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	58
Tablo 31.	P8 ve P9'un <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	58
Tablo 32.	P58'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	58
Tablo 33.	P73 ve P85'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları ...	59
Tablo 34.	P64'ün <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	59
Tablo 35.	P82'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	59
Tablo 36.	P28'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	60
Tablo 37.	P67 ve P47'nin <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	60
Tablo 38.	P91 ve P54'ün <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	61
Tablo 39.	P13'ün <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	61
Tablo 40.	P1 ve P60'm <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	62
Tablo 41.	P84'ün <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	62
Tablo 42.	P48, P66 ve P61'in <i>rpoB</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	62
Tablo 43.	P1, P13, P84 ve P60'm <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	67
Tablo 44.	P28'in <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	67
Tablo 45.	P48 ve P66'nın <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	67
Tablo 46.	P82'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	68
Tablo 47.	P91 ve P54'ün <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	68
Tablo 48.	P58'in <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	68
Tablo 49.	P7'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	69
Tablo 50.	P85, P73, P65, P5 ve P52'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	69
Tablo 51.	P47 ve P67'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	70
Tablo 52.	P49'un <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	70
Tablo 53.	P8, P9 ve P64'ün <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	71

Tablo 54.	P38'in <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	71
Tablo 55.	P2'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	71
Tablo 56.	P53 ve P50'nin <i>rpoD</i> gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları	72
Tablo 57.	Çoklu gen analizi sonucu benzer bulunan <i>Pseudomonas</i> türleri ve suşların biyokimyasal özellikleri	76

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ATP	: Adenozintrifosfat
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
ddH₂O	: İki kere distile su
ddNTP	: Dideoksiribonükleozittrifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozittrifosfat
G	: Guanin
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakika başına dönme hızı
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetik asit-Etilendiamintetraasetik asit
T_m	: Primerlerin erime sıcaklığı
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
vd	: Ve diğerleri
16S rRNA	: 16S ribozomalribonükleik asit
°C	: Derece Santigrad
µl	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyum Klorür
KNO₃	: Potasyum Nitrat
pmol	: Pikomol

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya genelinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), etinin lezzetinden dolayı tercih edilen bir tür olmuştur. Bunun yanı sıra gerek besin değerinin yüksek olması, gerekse kültüre edilmesinde problemlerin çözülmüş olması ve diğer türlere oranla yetiştiriciliğinin daha kolay olması nedeniyle ülkemizdeki üretimi son yıllarda oldukça artmıştır. Dünyadaki ve ülkemizdeki hızla artan insan nüfusunun hayvansal protein ihtiyacını karşılamak için su ürünleri üretimi arttırılarak sucul hayvansal protein maliyetleri, karasal ortamdaki hayvansal protein üretim maliyetlerinden daha ucuza getirilmesi amaçlanmaktadır.

Su ürünleri içerdiği esansiyel amino asitler, doymamış yağ asitleri, oldukça yüksek mineral maddeler ve bol miktarda vitamin içermesinin yanı sıra, özellikle kalp sağlığı ve çocuklarda zeka gelişimini destekleyen, insan sağlığı açısından oldukça önemli olan hayvansal besin kaynağıdır. Son yıllarda bilinçli tüketici kitlesinin artması ile alabalık üretimi daha da cazip hale gelmektedir. Ülkemizde, bilinçsiz avlanma nedeniyle avcılık yoluyla yapılan üretimin hızla azalmasına paralel olarak son 40 yılda kültür balıkçılığında yetiştiricilik yoluyla yapılan üretiminin önemi her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda, su ürünleri yetiştiriciliği yoluyla birim hacimden daha fazla sürdürülebilir üretimi elde etmek için balıkların aşırı stoklanması, aşırı yemlenmesi ve balıklara yapılan işlemlerin artması (elleme, boylama, nakil, havuzların temizlenmesi, vs işlemler) üretimi sınırlandıran problemleri de beraberinde getirmektedir.

Akuakültür şartlarında karşılaşılan en önemli problemlerden biri balıklarda görülen salgın hastalıklardır ve çok ciddi üretim kayıplarına neden olmaktadır ve bakteri, parazitler, virüs ve mantarlar tarafından oluşturulmaktadır. Bu etkenlerden bakteriyel hastalık etkenleri, akuakültürde en sık karşılaşılan ve büyük ekonomik kayıplara neden olan etkindir. Bakteriyel patojenler, genellikle aerobik, hareketli, gram-negatif ve çubuk şeklinde bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. Kültür balığı yetiştiriciliğinde, balıkların birbiri ile çok yakın temasta bulunmaları, suların çabuk

kirlenmesi ve su kalitesinin optimal değerlerin dışına çıkması gibi nedenlere bağlı olarak oluşan stres nedeniyle balıklar arasında bakterilerden kaynaklanan enfeksiyöz hastalıklar yoğun olarak görülmektedir. Balıklar için uygun zamanda koruyucu önlemler alınmadığında, değişen yaşam koşulları dztilmediği takdirde ve hastalıkların tam olarak tedavileri yapılmadığında yüksek mortalite oranlarının meydana gelmesi kaçınılmaz olmaktadır (Terzi, 2013).

Birçok bakteriyel takson, balık hastalıklarıyla ilişkili bulunmaktadır. Bu taksonlar, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi gram pozitif bakteriler grubuna ait cinsler olabileceği gibi, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Yersinia* ve *Pseudomonas* gibi gram negatif bakteriler grubuna ait bakteri cinsleri tarafından da oldukça geniş aralıklarda temsil edilebilmektedirler. Birçoğu oportünistik (fırsat) bakteriler sınıfına girmekte olan bu bakteriler, balıkların veya suyun normal mikroflorasında bulunabilirler, bazıları ise balıklarda obliganttırlar (“zorunlu, primer” patojen) (*Aeromonas salmonicida* ve *Renibacterium salmoninarum*) (Austin ve Austin, 2007).

Pseudomonas cinsi patojenler ise fırsat bakteriler sınıfına girer ve akuakltrdeki hastalıkları temsil eden önemli cinslerden birini temsil etmektedir. *Pseudomonas* cinsi, doğal ortamda (karasal, tatlı su ve denizel) oldukça yüksek miktarda bulunan, ekolojik olarak öneme ve çeşitliliğe sahip bir bakteri grubunu oluşturmaktadır. Bunlardan bazıları aynı zamanda bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda patojen olup, gıda zehirlenmesine de sebep olduğu bildirilmektedir (Altınok, 2006).

Pseudomonas cinsi Pseudomonaceae familyasına ait 10 cinsten birini oluşturmaktadır. Bu cinsler: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azorhizophilus*, *Rhizobacter*, *Rugomonas*, *Serpens*, *Mesophilobacter*, *Azomonotrichon* ve *Cellvibrio*’dur. Bütün cinslerde aerobik, kemoorganotropik metabolizma, fermentasyon ve fotosentezin yokluğu gibi özellikler yaygındır. Bu genel özelliklerden birkaç istisna bulunsa da, genel itibariyle fenotipik karakterler ailenin tüm üyelerinde yaygındır (Dworkin vd., 2006; Cornelis, 2008; URL-1, 2015).

Pseudomonas cinsinin ilk tanımlanması 1894'ün başları olarak belirtilmesine rağmen, aslında ilk bulunuşu 1895'te Walter Migula tarafından, Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe'de olmuştur. Migula (1895), üzerinde yedi yıl çalıştığı "Ueber ein neues System der Bakterien" makalesinde *Pseudomonas* cinsini tanımlamış ve bütün bilinen bakterilerle kıyaslandığı rapor edilmiştir (Dworkin vd., 2006).

Son on yılda tanımlanmış *Pseudomonas* türleri, dünyadaki eşsiz bakteri cinslerinden biri olduğunu ortaya koymuştur ve farklı türler, çok çeşitli ekolojik nişlerden izole edilmiştir. Örneğin, *P. plecoglossicida* balıklar için patojendir, *P. simiae* maymunların klinik örneklerinden izole edilmiştir. *P. salomonii* ve *P. palleroniana* bitkiler için parazitik türlerdir ve *P. constantinii* yenilebilir mantarlarda patojen olduğu bildirilmektedir (Gardan vd., 2002; Peix vd., 2009). *P. marincula* gibi bazı türler denizel ortamlardan izole edilmiştir (Lyudmila vd., 2008). Birkaç tür, *P. duriflava*'nın çöl toprağından, psikotolerant bir bakteri olan *P. guinema*'nin antarktik toprağından, *P. psikotolerans*'ın bir veteriner kliniğinden ya da 55°C büyüeyebilen *P. termotolerans*'ın klinik hayvan örneklerinden izole edilmesi gibi, ekstrem çevrelerden izole edilebilirler. Dünya üzerinde farklı coğrafik bölgelerde yayılımın sebebi, genetik ve fizyolojik olarak yüksek adaptasyon gösterebilmelerine bağlanmaktadır (Peix vd., 2009).

Pseudomonas cinsi, metabolik değişkenliği ve genetik esnekliğiyle bilinmektedir. *Pseudomonas*'ın türleri genellikle hızlı büyürler ve özellikle, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar gibi toksik organik kimyasalların dahil olduğu substratların büyük miktarını metabolize edebilmeleriyle bilinirler. *Pseudomonas* türünün suşları sıklıkla antibiyotiklere, dezenfektanlara, deterjanlara, ağır metallere ve organik bileşenlere karşı dirençlidir (Dworkin vd., 2006).

Pseudomonas türlerinin çoğu, çevre ile ilişkili olarak su ve toprağa yerleşmiş saprofitik canlılardır ve bunlar ilginç biyoteknolojik uygulamalara sahiptirler. Antibiyotik ya da siderophor üretimi, *Pseudomonas* türlerini bitkilerin patojenlerinin biyolojik kontrolü için kullanışlı yapmaktadır. Birçok tür, bitkinin büyümesini destekleme yeteneğine sahip, bitkilerde sistemik direnç, fosfat çözünürlüğü boyunca

besinlerin taşınmasını ya da fitohormon üretimini içeren endofitlerdir. Bazı türler, aynı zamanda toprağın ve suyun ıslah çalışmalarında ve biyosensörlerin tasarımı gibi yeni biyoteknolojik alanlarda kullanılırlar (Dworkin vd., 2006).

Pseudomonas cinsi bakteriler ilk keşfinden beri sayısız taksonomik değişim geçirmiştir. Sadece içerdiği türler açısından değil, aynı zamanda tanımı için kullanılan kriterler açısından da değişmiştir. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin güncel versiyonu, *Pseudomonas* taksonomisinin kullanıldığı kapsamlı bir metotlar listesini içermektedir. Bu metotlar, *Pseudomonas* tanımlaması için olan çalışmaları ortaya koymaktadır. Buna ilaveten hücrenin morfolojisini ve yapısını, hücre duvarı kompozisyonunu, pigment türlerini, antibiyotik üretimini, öteki organizmalar için patojenitesini, antijenik yapısını, genetik ve ekolojik karakterlerini, metabolik ve beslenme karakterleri ile farklı bileşiklere duyarlılığını içermektedir (Peix vd., 2009).

1.1.1. *Pseudomonas* Sınıflandırmasının Tarihi

Pseudomonas cinsi, Migula (1894) tarafından tanımlanmıştır ve bu nedenle Bakteriyoloji biliminin başlangıcından itibaren, tarihinin bir parçası olmuştur. Yirminci yüzyılın başlarında Orla-Jensen (1909), bakteriyel taksonomide temel kriter olarak fizyolojik özelliklerin de kullanılmasını önermişlerdir. Bergey's Manual Determinative Bacteriology'nin ilk (1923) baskısında, fenotipik karakterler temel alınmıştır ve *Pseudomonas* cinsini inceleyen bir bölüm bulunmaktadır. *Pseudomonas* cinsi tanımlandığından itibaren zamanla endişe verici oranlara ulaşabilen çok sayıda tür tarafından sürekli değişikliğe uğramıştır (Peix vd., 2009).

Stainer ve arkadaşları tarafından, 1960'lı yıllarda, *Pseudomonas* cinsinin sınıflandırmasını açıklığa kavuşturmak amacıyla, 1000'den fazla atıf alan ve bakteriyel taksonomi üzerine klasik bir çalışma olarak kabul edilen, 146 farklı organik bileşikleri üzerinde 267 süşun besinsel ve diğer özelliklerinin geniş bir yelpazesinin rapor edildiği, 112 sayfalık bir çalışma yayınlanmıştır (Stainer vd., 1966). Aynı yıllarda, hücredeki DNA'nın içeriğine yönelik metodolojinin gelişmesi, Marmur tarafından DNA renatürasyonunun geliştirilmesi ile DNA homologlarında ilk çalışmaların yapılması ve

bakteriyel taksonomide genetik karşılaştırmanın uygulanmasının mümkün olduğu bildirilmiştir (Marmur, 1961).

Pseudomonas cinsinin sınıflandırılmasında genotipik karakterlerin, 1970’li yıllarda Palleroni ve arkadaşları tarafından kullanılması ile önemli bir başarıya ulaşıldığı bildirilmektedir (Palleroni ve Doudoroff, 1972). Palleroni, bu bakteriyel grupları RNA-DNA ilişkisinin ölçülmesine göre beş rRNA alt grubuna ayırmıştır. 1973’te bu ilgi çekici sonuçlar yayınlanmasına rağmen, türlerin tanımında genetik bir bilgi olarak sadece G+C içeriğinin dahil olduğu fenotipik karakterlerden temel alınmış ve *Pseudomonas* cinsinin sınıflandırılmasının bulunduğu, Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology’nin 8. baskısına (1974) dahil edilmemiştir. Bu baskıda, bu cins, Gram negatif, aerobik, hareketli ve bazı azot ayırıcı bakterilere dahil edilmiştir ve fenotipik tanımlama dışında ki türlerin uzun bir listesi bunlara dahil edilmesine rağmen, *Pseudomonas* cinsinin sadece 29 türü tanımlanmıştır. Fenotipik tanımlanmayla beraber fizyolojik karakterlerine göre bu türler iki grup altında incelenmektedir: Büyüme faktörüne ihtiyaç duymayan türleri içeren grup I ve büyüme faktörüne ihtiyaç duyanların olduğu grup II. Grup I ise, poly- β -hidroksibütirat birikimine veya yokluğuna göre iki alt gruba ayrılmıştır ve floresan pigmentinin varlığı, arjinin dihidrolaz ve denitrifikasyonu ve DL-arjinin veya betatinin kullanımı bu alt gruplara ayırıda kullanılan kriterlerdir (Peix vd., 2009).

Bergey’s Manual’in 1974’ten Sistematik Bakteriyoloji Manual 1984’e kadar geçen 10 yıllık süre zarfında, *Pseudomonas* cinsine ait türlerde çok fazla değişiklik kaydedilmiştir. *Pseudomonas* cinsi, Gram negatif, aerobik, çubuk şeklindeki bakterilerin bulunduğu bölüme dâhil edilmiştir. *Pseudomonas* türlerinin düzenlemesi ribozomal RNA grubuna göre yapılmış ise de, bu türlerin tanımlanmasına hala fenotipik testler baz alınarak devam edildiği bildirilmektedir (Peix vd., 2009; Mulet vd., 2010; Palleroni, 2010).

Woese ve arkadaşları 1984 yılında, farklı bir genotipik yöntem önermişlerdir. Bu yöntem kayıtlara, ribozomal RNA’nın ilk kısmı tarafından RNA kataloglama yöntemi olarak geçmiş ve çalışmanın sonucunun daha önce Palleroni ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmadaki beş RNA grubuyla örtüşen sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir (Woese vd., 1984). Bakteriyel taksonomideki köklü değişiklik, Woese'un teklifiyle beraber, kendi ribozomal RNA'larının sekansının kabulünden ortaya çıkmıştır. Bakterilerin filogenetik sınıflandırılması, daha sonra *Protobacteria* olarak adlandırılacak, üç tane alt grubun tespit edilmesine yardımcı olacak, 16S rRNA genleri olan "alfa", "beta" ve "gama" ya dayanmaktadır. Bu yolla, *Pseudomonas acidovarans* ve *P. testesteroni*'nin dâhil olduğu rRNA grup III, yeniden sınıflandırılarak 1987'de *Comomonas* cinsine dâhil edilmiştir. Hidrojen oksitleyici türler *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* ve *P. carboxysidoflava* iki yıl sonra yeniden sınıflandırılarak *Hydrogenophaga* cinsine dâhil edilmiştir. Diğer yeniden sınıflandırılmalar, 80'lerin sonunda, *Pseudomonas*'ın sensu stricto serilerinin birbirinden farklı suşlarıyla (örneğin *P. oryzihabitans* ve *P. luteola* sırasıyla *Flavimonas* ve *Chryseomonas* cinslerine transfer edilmiş birkaç yıl sonra seriler *Pseudomonas* sensu strictoya dahil olmuş ve bu yüzden bu iki cins *Pseudomonas*'ın küçük sinonimi olmuştur) beraber birçok suşun DNA homologlarının kökeninden yapılmıştır (Peix vd., 2009).

16S rRNA geninin sekanslanmasıyla beraber sekansların benzerliğini temsil eden ağaç yapılarının matematik modellerinin gelişimi, prokaryotların filogenetik sınıflandırılmasına imkân vermiştir. Bu analizlerin sonucu olarak, türlerin yeniden sınıflandırılması, Palleroni'nin devam eden rRNA gruplarına dâhil edilmiştir. 2000'li yıllarda, 16S rRNA gen sekans analizleri vasıtasıyla *Pseudomonas* cinsinin en detaylı taksonomik revizyonu Anzai ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir, fakat bu derleme yayınlanmadan önce birçok tür başka cinsler ve türler içine yeniden sınıflandırılarak katılmıştır. Bu bilim adamları, "*P. syringae* grup", "*P. chlororapsis* grup", "*P. fluorescens* grup", "*P. putida* grup", "*P. stutzeri* grup", "*P. aeruginosa* grup" ve "*P. pertucinogena* grup" olarak 7 tane alttakıma ayrılan *Pseudomonas*'ın anlamlı dizileri olan 57 suşunu, temelde Palleroni ve arkadaşlarının filogenetik sınıflandırmasıyla tutarlı olacak şekilde bulduklarını rapor etmişlerdir (Anzai vd., 2000).

Pseudomonas cinsi 2000'lerden bu yana yeniden sınıflandırmaya tabi tutulmuş ve birçok *Pseudomonas* türü, *Protobacteria*'nın farklı sınıflarına ait farklı yeni türlere

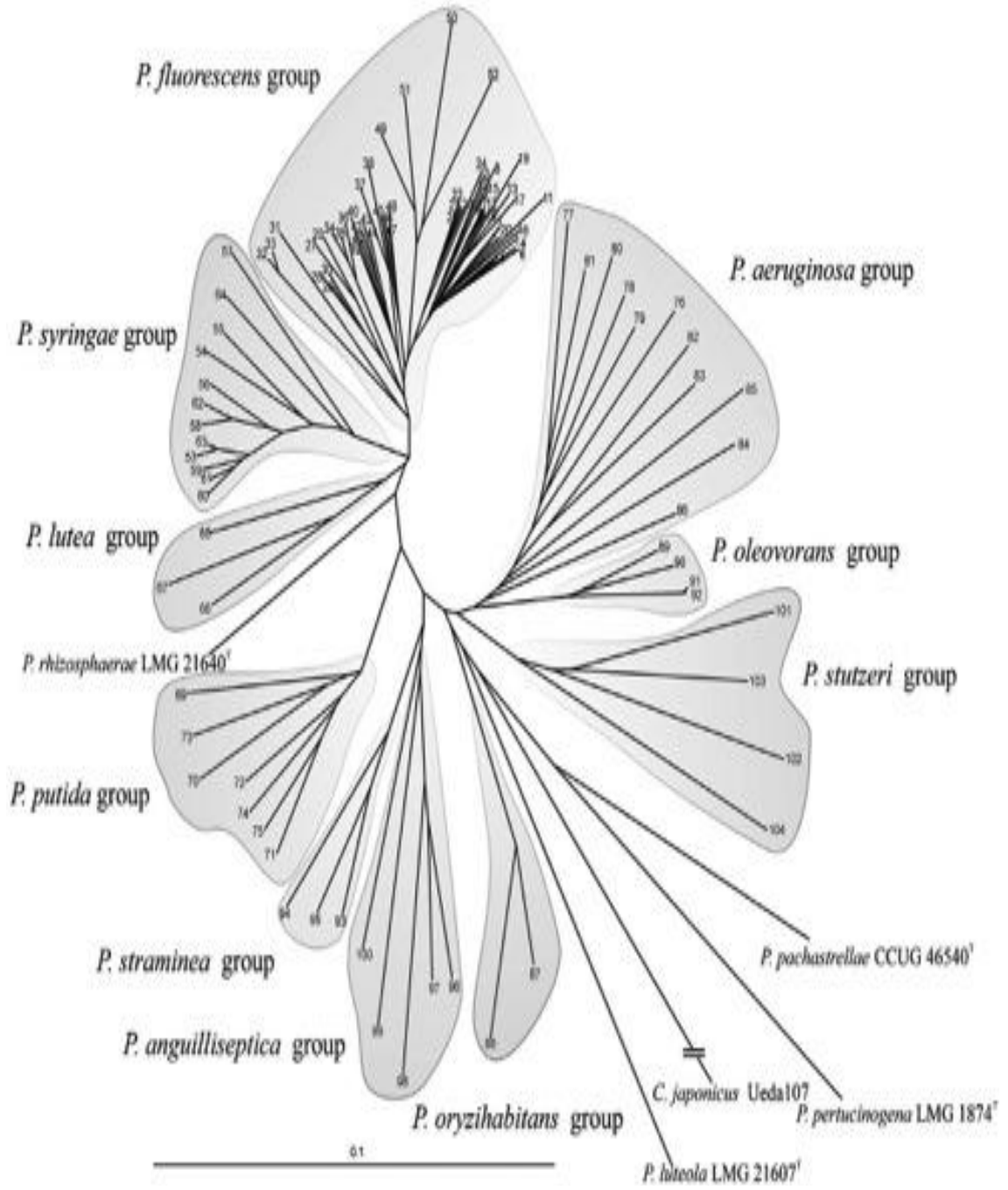
değişmiştir. Birçok yeniden sınıflandırma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Bütün bu değişiklikler, *Pseudomonas* cinsinin dâhil olduğu modern taksonomide kullanılan kriterlerin kapsamlı bir derlemesi olan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 2005'teki baskısında kaydedilmiştir. 2005 yılından bu yana, *Pseudomonas* cinsinin birçok yeni türü tanımlanmış ve sayıları sürekli artmıştır (Peix vd., 2009).

Pseudomonas cinsinde enteresan bir taksonomik yaklaşım, ilk olarak floresan ve daha sonra floresan olmayacak şekilde Meyer ve arkadaşları tarafından uygulanan siderotyping'dir. Bu yöntem, ana siderophorlar ve pyoverdinlerin izoelektroforetik karakterizasyonuna dayanır ve tür seviyesindeki birçok *Pseudomonas* suşunun karakterizasyonu için yol göstermiştir. Taksonomik bir araç olarak siderotyping ayırıştırma gücü ve duyarlılığı kütle spektrometresi tarafından pyoverdinlerin moleküler kütlelerini tespiti tarafından özellikle son zamanlarda geliştirilmiştir (Peix vd., 2009).

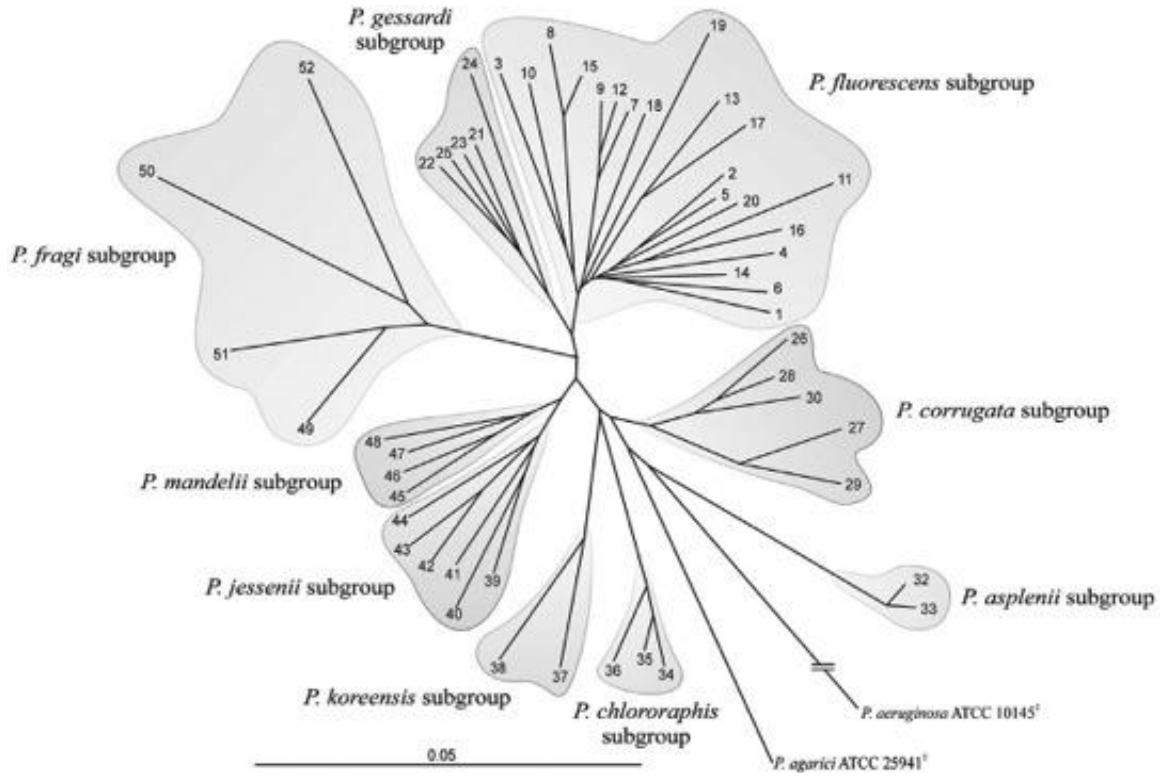
Fenotipik ve ekolojik çalışmalarla beraber tüm bu kemotaksonomik yaklaşımların uygunluğuna rağmen, *Pseudomonas*'ı da kapsayan bakteri taksonomisinde, gen sekanslama çalışmalarının oldukça büyük bir avantaj sağladığı açıktır. Ribozomal genler, diğer genlerde yoksun olan özel karakterlere sahiptirler. Bunlar, yaşam (protein sentezi) için aynı temel fonksiyonlara sahip bütün organizmalarda vardır ve evrimin başlangıcından beri mevcuttur. Bakterilerde, 16S rRNA geni güncel bakteriyel sınıflandırmasının temeli olsa bile, şu anda, birbirine çok yakın akraba bakteri türlerinin arasında bu gene dayalı farklılaşmanın olmadığı bilinmektedir. Bundan dolayı son 10 yıl içerisinde, *Pseudomonas* cinsi içerisindeki tür farklılaşmasını ortaya koymak için kullanışlı olan "referans" genler (*recA*, *atpD*, *carA*, *gyrB*, *rpoB*, vd.) gibi taksonomik çalışmalarda filogenetik moleküler markerler olarak, diğer gen sekanslarının kullanıldığı bildirilmiştir (Yamamoto vd., 2000; Ercolini vd., 2007; Peix vd., 2009; Mulet vd., 2009; Mulet vd., 2010; Ghyselinck vd., 2013).

Yapılan birçok filogenetik çalışmanın sonucunda *Pseudomonas*'ların genel olarak floresan özelliği gösterenler ve göstermeyenler olarak iki ana gruba ayrıldığı ortaya konulmuştur. Bir tane grup ve ilaveten üç tane suş ise bu ana gruplar içinde

bulunmamaktadır. Bunlar ise grup olarak *P. orzyhabitans* ve tür olarak *P. luteola*, *P. pachastrellae* ve *P. pertucinogena*'dır. Ana gruplardan ilki *P. aeruginosa* ana grubu (lineage) olup, floresan özelliği göstermeyen *Pseudomonas* türleri bu grupta bulunmaktadır. *P. aeruginosa* ise kendi içinde üç tane gruba temsil edilmektedir. Bunlar: *P. aeruginosa*, *P. oleovarians* ve *P. stutzeri* grubudur. İkinci grup ise *P. fluorescens* ana grubu (lineage) olup, kendi içerisinde gruplara ayrılmıştır. Bu gruplar sırasıyla: *P. fluorescens*, *P. lutea*, *P. syringae*, *P. putida*, *P. straminea* ve *P. anguilliseptica* grubudur. Ayrıca tür olarak *P. rhizopherea*'da bu ana grupta diğer tip suşlarından ayrı bir dalda yerleşmişlerdir. *P. fluorescens* grubu ise kendi içerisinde 9 tane alt gruba ayrılmıştır. Bunlar, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* ve *P. asplenii* alt gruplarından oluşmaktadır. *P. agarici* ise topolojik olarak bu grup içerisindedir fakat özel olarak bir alt gruba dâhil olmamıştır (Mulet ve ark., 2010). *Pseudomonas* türlerine ait grupların ve alt grupların dağılımı Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 1. *Pseudomonas* türlerine ait grupların dağılımı (Mulet vd., 2010)



Şekil 2. *Pseudomonas fluorescens* türüne ait alt grupların dağılımı (Mulet vd., 2010)

1.1.2. Sistematikte Kullanılan Genetik Teknikler

1.1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), 1985 yılında ABD'nin Cetus şirketinden Kary Mullis, Henry A. Erlich ve Randall K. Saiki tarafından ilk uygulaması yapılan ve belirli bir DNA parçasının milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını *in vitro* ortamda kimyasal olarak kısa zamanda çoğaltılmasına olanak sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem belli aşamalardan oluşmaktadır. Birinci basamakta DNA çift sarmalının 94-97 °C arasında bir sıcaklıkta birbirinden ayrılmasından sonra sıcaklık düşürülür. İkinci basamakta, oligonükleotid primerler (15-30 nükleotid uzunluğunda) çoğaltılacak olan DNA parçası üzerinde karşılıklı olarak eşlenik dizilere primerlerin nükleotid içeriğine bağlı olarak 40-70°C'de bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık, bu polimerizasyonun (zincir uzamasının) gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa çıkarılır. Son basamakta ise, DNA polimeraz enzimi primerlerin arasında kalan bölgeyi 72 °C de sentezler. DNA çift sarmalı tekrar denatüre edilir, yeni primerler bağlanır ve yeni zincir

sentezi tekrar tekrar gerçekleşir. Bu işlem genelde 30-50 döngü arasında tekrarlanmaktadır.

Bir ısıl döngüleyici (thermal cycler) sayesinde süreç için gerekli olan sıcaklık-zaman değerleri ayarlanabilmektedir. Bu süreçte genellikle, termofilik bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ve yüksek sıcaklıklarda çalışabilen *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılabilir. Bu enzim, PZR döngüleri esnasındaki DNA çift sarmalın açılması için gerekli olan yüksek sıcaklığa dayanabilmektedir. Bu süreç oldukça basittir, ancak kontaminasyona neden olan herhangi bir DNA parçası da bu şekilde çoğaltılabildiğinden, DNA'nın başka bir DNA ile kontaminasyonunun istenmeyen bir durum olduğu bildirilmektedir (Zyskind ve Bernstein, 1992).

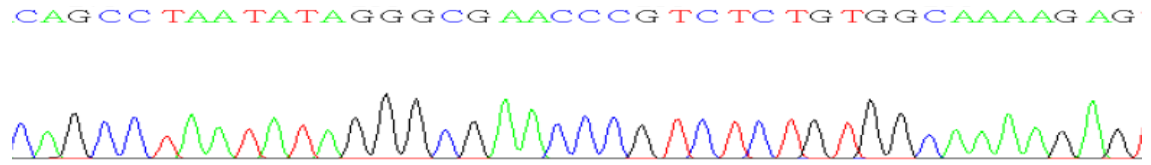
1.1.2.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılmaktadır.

DNA dizi analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem, Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma (Maxam ve Gilbert, 1977) ve Sanger zincir sonlandırma yöntemleri olarak bildirilmiştir (Sanger vd.,1977). Her iki teknik de, DNA'nın hazırlanması, PZR reaksiyonları ve yüksek voltajlı jel elektroforezi gibi üç temel basamaktan oluşmaktadır. Bu iki yöntemden, Sanger zincir sonlandırma yöntemi, Maxam ve Gilbert'in önerdiği ve kullandığı yöntemle kıyasla daha verimli olduğu, daha az radyoaktif ve toksik madde gerektirdiği için kısa sürede hızla yaygınlaşmış ve günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

İnsan genom projesi ve filogenetik çalışmaları çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışmaların iş gücü ve uzun zaman alması sebebiyle otomatik DNA dizi analizleri gelişmiştir. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de

yarar sağlamıştır. Otomatik DNA dizi analizi, Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır. Bu yöntemden tek farkı radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir (Sambrook vd., 1989).



Şekil 3. DNA dizi kromotogramı

Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar Şekil 3'teki kromatogram olarak bilgisayar ekranına aktarılır. Kromatogram üzerinde dört ayrı renkte pik vardır. Burada her renk bir bazı işaret etmektedir. Adenin bazı yeşil, sitozin bazı mavi, timin bazı kırmızı ve guanin bazı siyah renkle gösterilir. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook vd., 1989).

Bu DNA dizilemesinde sık rastlanan sorunlar arasında ilk 15-40 baz dizisinin kötü kaliteli olması ve 700-900 bazdan sonra dizileme kromatogramının kalitesinin kötüleşmesidir. Mevcut yöntemler tek bir reaksiyonda sadece nispeten kısa (300-1000 nükleotit uzunlukta) DNA parçalarını doğrudan dizileyebilmektedir. Bu limitin üzerindeki DNA parçalarının dizilenmesindeki ana engel, uzunluk farkı bir nükleotit olan büyük DNA parçaları için ayırım gücünün yetersiz olmasıdır (URL-1, 2015).

1.1.2.3. Filogenetik Analiz Metotları

Filogenetik, çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkinin araştırması olup, bu ilişkiler filogeni olarak adlandırılmaktadır. Filogenetik terimi Yunanca kökenli olup, "kabile, ırk" anlamına gelen *file* veya *filon* ile doğumla ilişkili anlamındaki *genetikos* terimlerinden türetilmiştir. Organizmaların sınıflandırması ve adlandırması olan taksonomi, filogenetikten büyük miktarda etkilenmiştir ama yöntemsel ve mantıksal olarak farklıdır. Bu iki saha, "kladizm" veya "kladistik" olarak bilinen filogenetik sistematik bilim dalında örtüşmektedir. Filogenetik sistematiğe taksonları birbirinden ayırt etmek için sadece filogenetik ağaçlar kullanılır. Evrimsel hayat ağacının araştırılması için filogenetik analiz yöntemleri vazgeçilmez hâle gelmiştir (URL-2, 2015).

Toplulukların zaman içinde değişimi ve bunun sonucu farklı dallar halinde türleşmesi, birbiriyle melezlenmesi veya tükenmesi olarak son bulur. Bu süreçler evrimin aşamalarını temsil eder ve bir filogenetik ağaç olarak gösterilebilir. Filogenetiğin çözmeye çalıştığı sorun, genetik verilerin sadece bugüne ait olması, fosil kayıtlarının ise tesadüfi ve güvenilmez olmasıdır. Tüm ağacın çizilebilmesi için evrimin nasıl çalıştığı hakkındaki bilgiler kullanılmaktadır. Dolayısıyla filogenetik ağaç, evrimsel olayların meydana gelme sırasıyla ilgili bir hipoteze bağlanmıştır (URL-2, 2015). Filogenetik ağaç oluşturma metotları iki ana kategori içerisinde sınıflandırılabilir. Bunlar; mesafeye dayalı fenetik metotlar ve karaktere dayalı kladistik metotlardır.

Mesafe temelli yöntemler şunlardır: Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu (UPGMA) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ve Neighbour-Joining (Komşu Katılım) Metodu olup; karakter temelli yöntemler ise, Maksimum Parsimoni, Maksimum Likelihood ve Bayesian Çıkarsama Metodu'dur.

1.1.2.3.1. Mesafe Temelli Yöntemler

Dizi hizalanması yapılarak hesaplanan dizi çiftleri arasındaki farklılıkların miktarına (mesafeye) dayanmaktadır. Dizi hizalanması sonucu hesaplanan evrimsel mesafeler, her bir dizi çifti arasındaki mesafelerin matrisinin oluşturulmasında kullanılabilirler. Matristeki bu dizi çifti arasındaki mesafe skorları ile tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilir (Felsenstein, 1987).

1.1.2.3.1.1. Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup (UPGMA) Metodu

Aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup (UPGMA) metodu, bir kümelenme yöntemidir. Başlangıçta her türün kendi başına bir kümeyi ifade ettiği düşünülerek mesafe hesaplaması yapılır. Daha sonra iki küme birleştirilip, iki kümenin ortalaması alınarak tek bir küme gibi mesafesi hesaplanır. Bütün türler tek bir kümede birleştirilinceye kadar aynı işlemler tekrar edilir (Li, 2004).

Bu yöntem evrimsel kökeni yansıtmaya amacı olmayan fenetik bir işlemdir. Bu yöntemde tahmin edilen mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeler tam olarak uyuşmamaktadır. Bu da yöntemin yeterince başarılı olmadığını göstermektedir. Bu yöntem genetik ağacın dalları boyunca değişiklik hızının sabit olduğunu varsaymaktadır. Bu nedenle hesaplamaları yaparken ağacın kökünü de hesaplamaktadır.

1.1.2.3.1.2. Neighbor-Joining (Komşu Katılım) Metodu

Komşu katılım yönteminde ise kümelenme temelli algoritmada olduğu gibi taksonların kökten eşit uzaklıkta olduğu varsayılmamaktadır. Bu yöntem ile sadece bir tane ağaç oluşturulur ve diğer olası ağaç topolojileri test edilmez. Bu sorunun giderilmesi için geliştirilmiş komşu katılım yöntemi geliştirilmiştir. Komşu katılım metodu bilgisayarlı hesaplama yoluyla hızlı ve yüksek kesinlikli filogenetik sonuçlar verdiği için filogenetik ağaç oluşturmada çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Gadagkar, 2000). Bu metod UPGMA metodundan oldukça hızlı ve daha iyi sonuçlar vermektedir. Aynı zamanda bu yöntem, geniş veri kümelerini analiz edebilir fakat tüm

olası topolojileri inceleyemez ve bu yöntem için MEGA yazılımı kullanılabilir (URL-3, 2015).

1.1.2.3.2. Karakter Temelli Yöntemler

Karaktere dayalı yöntemler atasal ilişkileri belirlemek için bilinen bütün evrimsel bilgiyi kullanmaktadır. Bu evrimsel bilgiler, diziler arasındaki bireysel değişimlerle temsil edilmektedir. Bu yöntem mesafeye dayalı yöntemlere göre daha yavaş olup, daha çok bilgisayar işlemi gerektirmektedir (Li, 2004). Karakter temelli yöntemlerden bazıları; Maksimum parsimoni (MP), Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian çıkarsama metodudur.

1.1.2.3.2.1. Maksimum Parsimoni (Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi)

Maksimum parsimoni (MP) yöntemi çok az bir hipotez gerektirdiğinden dolayı bu yöntemde verilerin en basit şekilde açıklanması tercih edilmiştir. Bu yöntemde ortak bir atadan türediği için bütün dizilerin en az değişmiş olduğu filogenetik ağaç MP ağacı olarak kabul edilmektedir (Li, 2004). İki birim arasında en az değişiklik gerektiren ağaç, en makul olan ağaçtır. Bu yöntem, incelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir. MP, minimum evrimsel metot (parsimony = tutumluluk) olarak da tanımlanabilmektedir. MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınmış olup, MP ile genetik ağaçların oluşturulmasında kesin ve tahmini yaklaşımlar söz konusudur. Maksimum parsimoni metodunu kullanmak için en çok tercih edilen yazılım PHYLIP'tir (URL-4, 2015). Bu alanda oldukça kabul gören bir program da ücretli yazılım olan PAUP'tur (URL-5, 2015). Basit olması, moleküler ve morfolojik verilerde kullanılabilmesi, benzerlik çeşitlerini ayırt edebilmesi (sinapomorfik, plesiomorfik, homoplasi) ve karakter ve orantı analizlerinde kullanılabilmesi avantajları arasında olup, yüksek seviyede homoplasilerde yanılması dezavantaj olarak değerlendirilmektedir.

1.1.2.3.2.2. Maksimum Likelihood (En Yüksek Olasılık Yöntemi)

Maksimum likelihood (ML), maksimum parsimoni (MP)'ye alternatif olarak Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında ortaya konulmuş bir yöntemdir (Felsenstein, 1987). MP yöntemi gibi ML yöntemi de bir uyum içinde her pozisyonu kullanır ve olası tüm filogenetik ağaçları değerlendirmektedir. Bu yöntemin çalışma prensibi olası ağaç için bütün olasılıkları hesaplaması ve maksimum olasılığı aramasıdır. Her bir dizi belirli bir evrimsel modelde gözlemlenen bilgiyi olasılık değerlendirmeyle belirleyip, her bir dizi için olasılık hesabı oluşabilecek bütün ağaçları sağlamak için çarpılır. En iyi ve en bilgilendirici ağacı vermesine rağmen, ML yöntemi çok yavaş ve oldukça yoğun bir matematiksel işlem gerektirmektedir (Li, 2004). Bu yöntem için MEGA yazılımı kullanılabilir (URL-6, 2015). Mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olması, karakter ve oran analizlerinde kullanılabilmesi, sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilmesi ve nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer veri tiplerine uygulanabilir olması bu yöntemin avantajlarıdır. Fakat diğer pek çok metotta olduğu gibi basit ve sezgisel değildirler ve parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılsızdır.

1.1.2.3.2.3. Bayesian Çıkarılma Metodu

Filogenetiğin en popüler metodu olan bu metod, temelde maksimum likelihood ile benzerlik gösterir ancak sonraki olasılık kullanımı ile bu yöntemden ayrılmaktadır. Bu yöntemin amacı tek bir doğru filogeniyi bulmayı değil, oluşabilecek bütün filogenilerin sonraki olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. Bunun için bazı evrimsel parametrelerin olasılıklarını ve önceki olasılık dağılımlarını kullanmaktadır. Çok sayıda oluşabilecek olan filogenetik ağacın analizi için Monte Carlo algoritmasına dayanan metodlar kullanılmaktadır (Larget ve Simon, 1999; Yang ve Rannala, 1997). Bu yöntem için MrBAYES yazılımı kullanılmaktadır (URL-7, 2015).

1.1.3. *Pseudomonas* Ayrımında Kullanılan Markerlar

Daha önceden de bahsedildiği gibi, son yıllarda *Pseudomonas*'lar üzerinde yapılan genetik çalışmalarda, ribozomal genler sınıflandırma için oldukça büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar 16S rRNA'nın cins ayırımında oldukça güçlü olduğunu, fakat cins içi (tür bazında) ayırma yetersiz kaldığını belirtmişler ve "referans" genlerinin (*recA*, *atpD*, *carA*, *gyrB*, *rpoB*, vd.) *Pseudomonas*'ın cins içi ayırımında başarılı birer marker olduğunu belirtmişlerdir (Yamamoto vd., 2000; Ercolini vd., 2007; Peix vd., 2009; Mulet vd., 2009; Mulet vd., 2010; Ghyselinck vd., 2013).

Bu çalışmada da kullanılan *rpoD* geni, RNA polimerazın beş farklı alt ünitesinden biri olan sigma70 (σ^{70}) alt ünitesini kodlayan bir genidir. *rpoD* geni, *Pseudomonas* için ayırıcı bir özelliği olan *gyrB* geni ile Yamamoto ve arkadaşları tarafından *P. putida*'nın başlangıçtaki filogenetik karakterizasyonu için (Yamamoto ve Harayama, 1998) ve daha sonra *Pseudomonas* cinsinin 31 tane türünün analizi için kullanılmıştır (Yamamoto vd., 2000). RNA polimerazın beta-alt ünitesini kodlayan *rpoB* geni ise, klinik mikrobiyolojistler için bakterilerin tanımlanması ve genetik analizleri için iyi bir aday olarak kabul edilmiştir (Mulet vd., 2009). Genel olarak birden çok genle çalışılan bu analizlere multi lokus sekans analiz denilmektedir. Mulet ve arkadaşları bu analiz yöntemi için özel bir veri tabanı geliştirmişlerdir (Mulet vd., 2010).

1.1.4. Bazı Önemli *Pseudomonas* Türleri

Balıklarda görülen Pseudomonad enfeksiyonlarının başlıca etkeni önceleri *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. fluorescens* ve *P. chloropsis* olarak rapor edilirken, günümüzde çeşitli balık türlerinden ve su canlılarından *P. pseudomallei*, *P. putrefaciens*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes* ve *P. luteola* türlerinin izole edildiği de rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Bu çalışmada ise, filogenetik ve biyokimyasal testler sonucunda bulunan türler hakkında bilgi verilmektedir.

Pseudomonas fluorescens 1984'de Migula tarafından tanımlanmış ve bu zamana kadar *Pseudomonas* cinsinin en yaygın bakterisi türlerinden biri olmuştur. Floresanlı *Pseudomonas* grubuna dahil olan bu bakteri toprakta bulunur ve akuakültürün de içinde bulunduğu, tarımsaldan medikale birçok alanda varlığını göstermektedir. Tatlı su ekosisteminin baskın bir üyesi olan *P. fluorescens*, akuakültürde, gümüş sazanı, big head, japon balığı, kadife balığı, ot sazanı, siyah sazan ve gökkuşağı alabalığının da dâhil olduğu balık türlerinin geniş bir aralığında hastalıklara sebep olarak rapor edilmiştir. Genellikle *P. fluorescens* yüzgeç ya da kuyruk saplarını erozyona uğratan enfekte alanlarla ilişkilendirilmektedir. Kiliz yavrularında, derideki ve yüzgeç kaidelerindeki hemorojik lezyonları içeren hastalık belirtileriyle, yüksek mortaliteye (popülasyonda %99'lara varan oranlarda) sebep olduğu bildirilmiştir. 1981 yılında yapılan bir araştırmada, benzer semptomların gümüş sazanı ve big head'lerde gözlemlendiği rapor edilmiştir. Başka bir araştırmada ise, 1989'da, gökkuşağı alabalıklarının solungaçlarında ve yüzgeçlerindeki hemoroji ve ülserlerin varlığıyla rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

Pseudomonas fluorescens, gram-negatif, oksidatif, birden çok flagellalı ve hareketli bir çubuk bakteridir. Arjinin dihidrolaz, katalaz üretimi pozitif, 4°C'de üreyen ama 41°C'de üremeyen, floresan ve jelatin pozitif bir bakteridir. H₂S, indol, üre, Voges Proskauer reaksiyonu negatif olup, sitrat pozitifdir. Palleroni ve Doudoroff, 1972 yılında yaptıkları çalışmada *P. fluorescens*'i biyokimyasal özelliklerine göre 7 tane biyotipe ayırmıştır (A'dan G'ye) (Palleroni ve Doudoroff, 1972).

Pseudomonas putida, kanser hastaları, nötropeni, bakteriyemi ve yeni doğanlardaki septisemiyle beraber üriner sistemlerin iltihabından sorumlu oportünistik bir insan patojenidir. Aynı zamanda göz enfeksiyonlarına, diyareye, kulak enfeksiyonlarına, lezyon ve deri enfeksiyonlarına sebep olan *P. putida* klinik enfeksiyonlarda, özellikle çocuklarla ilişkilendirilmektedir. Akuakültürde çok yaygın bir patojen olmamakla birlikte, 1976'da ayu balığından, 1996'da sarıkuyruktan, 1998'de sazan ve japon balıklarından, 2006'da ise gökkuşağı alabalığından izole edilmiştir (Altınok vd., 2006). Altınok ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada, *P. putida*'nın alabalıklarda *Flexibacter columnare* tarafından oluşturulan columnaris, *F. psychrophilum*

tarafından oluşturulan bakteriyel soğuk su ve *Aeromonas sp.* tarafından oluşturulan motil *Aeromonas* septisemi (MAS) hastalığıyla benzer semptomlara sahip bulunduğu rapor edilmiştir.

Pseudomonas putida, gram-negatif, spor oluşturmeyen, düz ya da çok az kıvrılmış çubuk bakterilerdir. Aynı zamanda floresan pigmente sahip, hareketli, arjinin ve oksidaz üretimi pozitif, H₂S ve indol negatif, 4°C’de üreyen ama 41°C’de üremeyen, eskülin, jelatin ve üre ile etkileşime girmeyen bir bakteridir (Austin ve Austin, 2007). Oksijenin olduğu su ve toprak habitatlarında fazlaca bulunan bu bakteri oldukça hızlı üremektedir (Altınok vd., 2006).

Bu çalışmada ağırlıklı olarak *Pseudomonas*’a ait üç adet bakteri türü belirlenmiş olup (*P. fluorescens*, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.*), filogenetik analizler sonucu benzer bulunan diğer *Pseudomonas* türleri ve izole edildikleri ortamlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo.1. Filogenetik Analizler Sonucunda Benzer Bulunan diğer *Pseudomonas* türleri

<i>Pseudomonas</i> Türü	İzole Edildiği Ortam
<i>Pseudomonas lundensis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Çürümüş et (Molin vd., 1986)• Çürümüş et ve tavuk, süt ürünleri (Ercolini vd., 2007)
<i>Pseudomonas baetica</i>	<ul style="list-style-type: none">• Çiğ süt (Marchand vd., 2009)• Dil balığı (Lopez vd., 2012)

1.2. Literatür Özeti

Pseudomonas’ın taksonomisine büyük katkısı olan Norberto Palleroni, bu cinsin tanımlanmasıyla ilgili çok fazla çalışma yapmış ve çalışmalarını binden fazla atıf almıştır. Palleroni ve Doudoroff, 1972 yılında yaptıkları çalışma ile *Pseudomonas*’ları G+C (Guanin-Sitozin) içeriğine göre gruplandırmış ve beş alt gruba ayırmışlar ve *P. fluorescens* için yedi adet biyotip tanımlamışlardır (A-G). Palleroni ve arkadaşları 1973 yılında ise, *Pseudomonas*’ların sınıflandırılmasında rRNA:DNA hibridizasyonunun önemli bir özellik olduğunu belirtmişler ve beş tane alt grup tanımlamışlardır.

Kersters ve arkadaşları, 1996 yılında yaptıkları derleme çalışmasında çoğu *Pseudomonas* türünün aslında yakın cinslere ait olduğunu ortaya koymuşlardır. *Pseudomonas* rRNA grup II'nin (β -altsınıfı) *Burkholderia* ve *Ralstonia* cinslerine, rRNA grup III'ün (β -altsınıfı) *Acidovarax*, *Comamonas* ve *Hydrogenophaga* cinslerini içeren Comamonadaceae familyasına, rRNA grup IV'ün (α -altsınıfı) *Brevundimonas* cinsine, rRNA grup V'in ise önceden *Xanthomonas* olarak tanımlanan daha sonra *Stenotrophomonas* olarak değiştirilen cinse aktarıldığını belirtmişlerdir. Kersters ve arkadaşları yaptıkları bu derlemede şu anki *Pseudomonas*'ların rRNA grup I (γ -altsınıfı) ile temsil edildiğini belirtmişlerdir.

Anzai ve arkadaşları, 2000 yılında yaptıkları çalışma ile 59 tane *Pseudomonas* suşunu 16S rRNA gen sekansı ile karşılaştırmışlar ve Palleroni'nin bildirdiği beş tane rRNA grubuna göre sınıflandırmışlardır.

Yamamoto ve Harayama'nın, 1998 yılında, *gyrB* ve *rpoD* genleriyle üç *Pseudomonas* türüne (*P. putida*, *P. fluorescens* ve *P. chlororaphis*) ait 20 suş üzerinde yaptıkları çalışma, 16S rRNA gen sekansı dışındaki genlerle çalışılarak yapılan ilk çalışma olmuştur. Bu çalışmada *gyrB* ve *rpoD*'nin, 16S rRNA'ya göre daha iyi yol göstericiler olduğunu bildirmişlerdir. Yamamoto ve arkadaşları, 2000 yılında da, 31 tane tanımlanmış *Pseudomonas* türü ile (toplam 135 suş) aynı genleri çalışmışlar ve yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* sınıflandırılmasında, tanımlanması ve algılama sistemlerinde *gyrB* ve/veya *rpoD* sekanslarının daha kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir.

Mulet vd. (2009), yaptıkları çalışmada 112 tanımlanmış *Pseudomonas* suşu ve 96 adet tip suşunun, ITS1 (16S ve 23S arasındaki bölge) bölgesini analiz etmişler ve *rpoD* geni için evrensel primer olarak kullanılan PsEG30F/PsEG790R primerlerini dizayn etmişlerdir. Çalışmanın sonunda *rpoD* sekansının, *Pseudomonas* cinsindeki türlerin tanımı için güvenilir olduğuna dikkat çekilmiştir.

Mulet vd. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada, 107 tane *Pseudomonas* suşu öncelikle 16S rRNA evrensel primeriyle cins düzeyinde tanımlanmış ve tür düzeyinde tanımlanması için *gyrB*, *rpoB* ve *rpoD* genleri kullanılmıştır. Bu çalışmada

multi-genic bir yaklaşımı kullanarak, *Pseudomonas* gibi kompleks bir cinsin filogenetik ilişkilerine yeni bir bakış getirmek amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda, üç tane sıralı genin (16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*) analizinin, *Pseudomonas* cinsinin güvenilir filogenetik analizinde başarılı olduğunu, *rpoB*'nin ise bazı durumlarda dahil edilebileceğini, fakat suş seçiminin ayrımı sırasında çözüm geliştirmediğini belirtmişlerdir.

Mulet vd. (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, *Pseudomonas putida*'ya ait biovar A ve biovar B, 16S rRNA, *gyrB* ve *rpoD* gen bölgelerini karşılaştırarak incelenmiştir. Çalışmada 133 tip suşu, 31 tane tanımlanmış *P. putida* suşu kullanılmış olup, çalışma sonucunda *P. putida* suşlarının filogenetik ağaç üzerinde dağılımına bakılmış ve biovar B'nin *P. fluorescens* grubuna daha yakın olduğu, hatta filogenetik ağaç üzerinde *P. fluorescens*'i temsil eden suşlar arasında olabildiği de gözlemlenmiştir.

Türkiye'deki çalışmalarda ise, *Pseudomonas* özellikle balık hastalıkları alanında 16S rRNA geni ile çalışılmış, bunun dışında bazı zirai ve biyolojik uygulamalarda çoklu gen analizi yöntemi kullanılmıştır.

Kayış, 2009 yılında yaptığı tez çalışmasında, iki yıl boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) çiftliklerinden hastalık gösteren toplam 558 balıktan örneklemeler yapmış ve yersiniosis, furunkulozis, vibriosis, motil *Aeromonas* septisemi, soğuk su hastalığı dışında birkaç salgında *Pseudomonas* enfeksiyonu bulunduğunu rapor etmiştir. Enfeksiyonların etkenlerini *P. putida* ve *P. luteola* olarak belirleyen Kayış, *P. solanacearum*, *P. fluorescens*, *P. dimunata*, *P. aeruginosa*, *P. caryophyllii*, ve *P. diafaldi*'nin de balıklar üzerinde görüldüğünü rapor etmiştir.

Altinok vd. (2006), bir gökkuşağı alabalığı çiftliğinde %35 ölümle sonuçlanan salgından yaptıkları izolasyon, histopatolojik ve genetik çalışmalar sonucunda, insanlarda klinik enfeksiyona sebep olan ve Flavobakteriosisle benzerlik gösteren *Pseudomonas putida* etkenine rastlamışlardır. Bu çalışmada, *P. putida*'nın 16S rRNA

geni kullanılarak sınıflandırılması yapılmış ve balıklar üzerinde, Japonya dışında, bildirilen ilk enfeksiyon olduğu rapor edilmiştir.

Altinok vd. (2007) başka bir çalışmada ise, hastalık salgını görülen bir çiftlikten ortalama ağırlıkları 10 ile 40 gram arasında değişen gökkuşağı alabalıklarından örnekleme yapmışlardır. Yapılan API 20 NE testi, diğer biyokimyasal testler, genetik (16S rRNA geni) ve histopatolojik çalışmalar sonucunda etkenin genellikle insanlarda klinik enfeksiyonlarla ilişkilendirilen *Pseudomonas luteola* olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, balıklarda bildirilen ilk *P. luteola* enfeksiyonu olma özelliğini taşımaktadır.

Balık hastalıklarıyla alakalı olmayan bir diğer çalışma ise, Ertimurtaş tarafından 2012 yılında yapılan bir tez çalışması olup, şeftali ve kiraz gibi sert kabuklu meyvelerin ağaçlarında kanser yapan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının çoklu gen analiziyle identifikasyonuna dayandığı için önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, *P. syringae*'yi tanımlamak için 6 adet primer (*syrB*, *cfl*, *cts*, *rpoD*, *gapA* ve *gyrB*) kullanılmıştır.

Bu çalışmada rastlanan yeni türlerle alakalı yapılan çalışmalar ise şunlardır:

Molin vd. (1986) yaptıkları çalışmada, %20 oranında soğutulmuş inek ve domuz etleri üzerinde farklı bir *Pseudomonas* suşu bulmuştur. Bu suşu, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens* ve *P. chlororopsis*'le karşılaştırmış ve yeni bir *Pseudomonas* türü olduğu sonucuna varmışlardır. Buldukları bu yeni türe İsviçre'nin Lund kentinden referansla *Pseudomonas lundensis* adını vermişlerdir. *P. lundensis*, ilerleyen yıllarda Tryfinopoulou tarafından (2002) çürümüş deniz çipuralarından (*Sparus auratus*), Ercolini vd. (2007) tarafından bozulmuş et, tavuk ile peynirden ve Marchand vd. (2009) tarafından çiğ süttten izole edilmiştir.

Lopez vd. (2012), İspanya'nın güneybatısında, deniz yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde ekonomik olarak önemli yassı balıklardan dil balığında (*Dicologlossa cuneata*, Moreau) *Pseudomonas baetica*'yi tanımlamıştır. Çalışmada, salgın sırasında alınan dil balıklarının karaciğerinden beş tane suş izole edilmiş ve balıklarda hastalık oluşturulduğu bilinen *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarıyla ve diğer

Pseudomonas suşlarıyla karşılaştırılarak tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca 16S rRNA, *gyrB* ve *rpoD* genleriyle çalışılarak filogenetik analizleri yapılmış ve Hispania Baetica bölgesinden esinlenerek bu *Pseudomonas* türüne *P. baetica* ismi verilmiştir.

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Rize, Trabzon ve Gümüşhane illerindeki alabalık çiftliklerinde, hastalık vakalarından izole edilen *Pseudomonas* spp.'lerin genetik tanımlanması ve türler arasında genetik olarak akrabalıkların çoklu gen analiz yöntemiyle (MLSA) ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Rize, Trabzon ve Gümüşhane illerindeki gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği yapan 8 farklı işletmenin kuluçkahanesinden, 2013 Ocak - 2014 Haziran tarihleri arasında, hastalık vakalarında örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Hastalığın mevcut olduğu kuluçkahane ve normal havuzlardan alınan ve hastalık semptomlarına sahip, ölmek üzere olan 10'ar balık incelenmek üzere laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen balıklara, ışık mikroskobu altında kazıntı alınarak yapılan parazit muayenesinin ardından, otopsi yapılmıştır. İzole edilen *Pseudomonas*'ların izole edildikleri çiftliklerin kodu ve izole edildiği döneme ait bilgiler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo.2. Laboratuvara Getirilen Balıkların Alındığı Çiftlik Kodları ve Bulunduğu İller

Çiftlik Kodu	Bulunduğu İlçe/İl
R1	Çamlıhemşin/RİZE
T1	Uzungöl/TRABZON
R2	Fındıklı/RİZE
R3	Güneysu/RİZE
T2	Maçka/TRABZON
R4	İyidere/RİZE
T3	Çaykara/TRABZON
G1	Kürtün Barajı/GÜMÜŞHANE

2.2. Yöntem

2.2.1. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Karakterlerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakteriler 20°C'de, genel bir besi yeri olan Tryptic Soy Agar (TSA)'da, 24 ile 48 saat arasında üretildikten sonra, morfolojik özelliklerinin

belirlenmesi amacıyla hareket ve Gram boyama testleri yapılmıştır. Bakteri türlerinin tanımlanması için, önce katalaz ve oksidaz testleri yapılmış ve test sonuçları pozitif olanların *Pseudomonas* - *Aeromonas* için seçici olan Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) besi yerine ekimi yapılmıştır. Bu besiyerinde mor renk oluşturan koloniler *Pseudomonas* spp. olarak kabul edilmiştir. Bakterilerin izolasyonu için biyokimyasal analizler manuel olarak uygulanmıştır.

2.2.2. Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

2.2.2.1. Hareket Testi

Normal Triptic soy agar (N-TSA)'da üreyen 24 saatlik saf kolonilerden hareket muayenesi yapılmıştır. Bu amaçla; steril öze yardımıyla bir loop steril %85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) alınmış ve temiz bir lam üzerine konulmuştur. TSA'daki saf kolonilerden steril şartlarda alınan bakteriler FTS ile hafifce karıştırılarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2.2. Gram Boyama Testi

Bu test, mikroorganizmaları hücre duvarlarındaki peptidoglikan ve lipopolisakkarit yapısının farklılıklarına göre ayırt etmek amacıyla yapılmaktadır.

Saf kültürler, lam üzerinde üç kere alevden geçirilerek fikse edildikten sonra, sırasıyla birer dakika kristal viyole ve lügolde bekletilmiş ve boyaları akıtmak için saf su kullanılmıştır. Daha sonra absolut alkolde dekolere edilmiş ve saf su ile yıkandıktan sonra bir dakika boyunca safranla boyanmıştır. Tekrardan saf su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılan preparatlar, ışık mikroskobu altında (x100), immersiyon yağı damlatılarak incelenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2.3. Oksidaz Testi

Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidaz enziminin (sitokrom-C-oksidad) varlığını ortaya koymada kullanılmıştır. Oksidaz

reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade etmektedir (URL-8, 2015).

Saf kültürlerden, pasteur pipeti yardımıyla kurutma kağıdına dökülmüş oksidaz ayracına bir loop konulmuş ve renk değişimi gözlenmiştir. Pozitif kültürler, 5-10 saniye içerisinde ayraç üzerinde mavi-mor renk oluşturmuş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2.4. Katalaz Testi

Bu test, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen katalaz enzimini (hidrojenperoksit oksidoredüktaz) saptamak amacıyla yapılır ve bakterilerin identifikasyonunda kullanılır. Bu enzim ekseri sitokrom ihtiva eden aerobik bakterilerde ve bazı fakültatiflerde bulunur. Katalaz enzimi, hidrojen peroksidi (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrıştırır. Hidrojen peroksidin ayrışmasında, bir molekülü substrat donör olarak görev yapmaktadır (URL-8, 2015).

Saf kültürlerden, pasteur pipeti yardımıyla lam üzerine dökülmüş H_2O_2 ayracına bir loop konulmuş ve kabarcık(O_2 gazı) oluşturup oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Kabarcık (O_2 gazı) oluşumu pozitif (+) olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2.5. Eskülin Ayrışması Testi

Saf kültürler, %35 oranında eskülin agarla hazırlanan ve deney tüplerine yarı yatık olacak şekilde 5 ml dökülen besi yerlerine ekilmiştir. Besi yerleri $20^\circ C$ 'lik etüvde inkübe edilmeye bırakılmış, kahverengi renk pozitif (+) olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar bir hafta boyunca her gün gözlemlenmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılmaktadır. Yaz mevsiminde %14, kış mevsiminde ise %12

oranında hazırlanan ve cam tüplerde steril edilmiş besiyerine, ucu sivri öze yardımı ile batırılarak ekilen saf kültürler, 20°C'de bir hafta süreyle inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar her gün gözlemlenmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.7. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi

Bu test, besiyerinin birleşiminde bulunan hidrojen sülfür, glikoz, laktoz ve sakkarozun varlığının, mikroorganizmalar tarafından kullanılıp kullanılmadığını ve glikozdan gaz (CO₂) oluşumunun tespiti amacıyla yapılmaktadır. Saf kültürler, %6.5 oranında Triple Sugar Iron Agar (TSIA) ile hazırlanan ve deney tüplerine 10 ml yarı yatık olarak dökülen steril besi yerlerine, dibe daldırma ve yüzeye yayma yöntemiyle ekilmiştir. Besi yerleri 20°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış, sonuçlar ilk 24 saatte de kontrol edilerek, değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir. Siyah renk oluşumu H₂S varlığı, sarı renk ise yarı yatık besiyerindeki konumuna göre şeker kullanımı olarak değerlendirilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.8. Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) Testi

Bu test, mikroorganizmaların OF Basal Medium'da karbonhidratları (özellikle, %1 glikoz) ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptamak için yapılan ve ayrıca bakterilerin identifikasyonunda da yararlanılan bir testtir. Saf kültürler, her bir suş için biri oksidatif biri fermentatif olacak şekilde iki besiyerine iğne uçlu özeyle ekilmiştir. Fermentatif ortam için besiyerlerinin üzerine hava ile teması kesecek şekilde, yaklaşık 1 cm kalınlığında sıvı steril parafin ilave edilmiştir. Kültürler, 20°C'de bir hafta inkübe edilmiş, ve sonuçlar her gün kontrol edilerek kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.9. Sitrat Testi

Bu test, mikroorganizmaların, besi yerlerine katılan sitrati karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamak için yapılmıştır. Bakteriler tarafından sitratin ayrışması (sitrata metabolizması) enzim sistemi

tarafından gerçekleştirilir ve bu enzime sitritaz (citrate oxalacetate-lyase) veya sitrat demolaz adı verilir. Saf kültürler, %35 oranında hazırlanmış ve deney tüplerine yatık olarak dökülmüş besi yerlerine, dibe daldırma ve yüzeye yayma yöntemiyle ekilmiş ve 20°C’de 2-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar 24 saatten sonra, her gün kontrol edilerek kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.10. İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılmaktadır. Saf kültürler, 5ml’lik peptonlu sulara ekildikten 48 saat sonra, 0,5 ml Kovacs ayracı dökülerek tüpün üst kısmında kırmızı renkte bir halkanın oluşması ile sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.11. Üreaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılmaktadır. Saf kültürler, Christensen Üre Agar’a ekimi yapıldıktan sonra, 20°C’de inkübe edilmiş, pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir ve sonuçlar 7 gün boyunca her gün kontrol edilerek kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.12. Voges-Proskauer (VP) ve Metil Kırmızısı (MR) Testleri

Voges-Proskauer (VP) testi, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente edilerek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol’u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılmaktadır. Metil Kırmızısı (MR) testi ise, glikozun fermentatif metabolize olması sonu besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH’nın düştüğünü ortaya koymak için yapılmaktadır. Bu çalışmada VP ve MR testleri, üreme ortamı aynı olduğu için aynı besi yerinde yapılmıştır (URL-8, 2015).

Saf kültürler, MR/VP buyyonuna ekilmiş ve 20°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra MR testi yapmak üzere, her suş için başka bir tüpe 1 ml sıvı

besiyeri alınmış ve metil kırmızısı ayracıyla sonuçlar gözlenmiştir. VP testi için ise, 1'er ml sıvı besiyerlerine önce 600µl α-naphthol, daha sonra 200µl %40'lık potasyum hidroksit (KOH) damlatılmış ve 15-20 dakika bekledikten sonra sonuçlar kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.13. Nitrat Redüksiyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılmaktadır. Saf kültürler, nitratlı (KNO₃, %0.1) sıvı besiyerlerine ekilmiş ve 1-5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Griess-Ilosvay ayrıçalarının [α-naftilamin %0.5 (A) - sulfanilik asit %0.8 (B)] her birinden 500µl damlatılarak sonuçlar gözlenmiştir. Negatif çıkan sonuçlar için, enzim aktivitesini hızlandırmak amaçlı, toz halinde çinkodan (Zn) bir miktar ilave edilmiş ve bu işlemin sonunda sonuçlar kaydedilmiştir (URL-8, 2015).

2.2.2.14. Tuzluluğa Adaptasyon Testi

Bu test, bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarına karşı hassasiyetini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla saf bakteri kültürleri, %0 ve % 7 tuz ihtiva eden peptonlu sıvı besi yerine (peptonlu broth'a) ekilerek 20°C'de inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar 24 saat sonunda değerlendirilmiştir.

2.2.2.15. Dekarboksilaz (Arjinin-Ornithin-Lizin) Testi

Bu test, mikroorganizmaların, aminoasitlerdeki karboksil grubunu enzimatik olarak ayrıştırarak (dekarboksilasyon) amin ve korbondioksit meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılmıştır. Reaksiyon, dekarboksilaz enzimi yardımıyla katalize edilmektedir ve amin meydana gelmesi ortamın pH'ını yükseltmektedir. Testte kullanılan aminoasit dekarboksilazlar, arjinin, lizin ve ornithindir (URL-8, 2015).

Saf kültürler, her birine ayrı ayrı %1 oranında L-arjinin, L-lizin, L-ornithin ilave edilen Dekarboksilaz Broth Base'e ekilmiş, yaklaşık 1 cm kalınlığında sıvı steril parafin

ilave edildikten sonra, 2-7 gün boyunca 20°C’de inkübe edilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.3. Antimikrobiyal Hassasiyet Testi

İzole edilen tüm bakterilerin antimikrobiyal hassasiyet testleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) kitapçığında belirtilen standart disk difüzyon metoduyla yapılmıştır. Müeller Hinton Agar’da zenginleştirilmiş saf kültürlerle antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve 25°C’de 18 saat inkübasyondan sonra dijital kumpas yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçülerek, bakterilerin bu antibiyotiklere karşı direnç ve hassasiyetleri CLSI (2014) kitapçığındaki kriterlere göre belirlenmiştir. Hassasiyeti ve direnci ölçülen antibiyotik diskleri: sulfametaksazol (SMZ-100µg), enrofloksasin (ENR-5µg), florfenikol(FFC-30µg), oksitetrasiklin (T-30µg), oksalinik asit (OA-2µg), streptomisin (S-10µg), ampisilin (AM-10µg) ve sulfametaksazol-trimetoprim (STX-25µg)’dır. Duyarlılık aralıkları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotik disk konsantrasyonu ve ölçülen inhibisyon zon çaplarına göre duyarlılık aralıkları

Antimikrobiyel ajan	Disk Konsantrasyonu	Ölçülen inhibisyon zon çapı (mm)			
		D	OH	H	Referans
Oksitetrasiklin (T)	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2014
Oksolinik asit (OA)	2 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	CLSI, 2014
Sulfamethoksazol (SMZ)	100 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	CLSI, 2014
Ampisilin (AM)	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	CLSI, 2014
Florfenikol (FFC)	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2014
Streptomisin (S)	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	CLSI, 2014
Enrofloksasin (ENR)	5 µg	≤ 16	17-20	≥ 21	CLSI, 2014
Trimetoprim+Sulfamethaksazol (SXT)	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	CLSI, 2014

D: Dirençli, OH: Orta hassas, H: Hassas

2.2.4. DNA İzolasyonu

Triptic Soy Broth (TSB)’da 20°C’de, 18 saat soğutmali inkübatörde üretilen bakteriler 14800 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısmı atılmıştır. Elde edilen

pellet, gram negatif bakterilerde DNA izolasyonu için Promega Wizard Genomik DNA İzolasyonu Prosedürü'ne göre işleme tabi tutulmuştur. Bu prosedürde takip edilen basamaklar maddeler halinde verilmiştir:

1. Eppendorf tüplerdeki örnekler, 600 μ l Nuclei Lysis Solution ilave edilerek, pipetle karıştırılmıştır.
2. Örnekler 80°C'de 5 dakika bekletilmiş ve daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.
3. Örnekler 3 μ l RNAaz ilave edilerek karıştırılmış ve 37°C'de 15-60 dakika arasında inkübe edilmiştir.
4. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 200 μ l Protein Precipitation Solution eklenerek, yaklaşık 20 saniye kadar vortekslenmiştir.
5. Örnekler 5 dakika buzda inkübe edilmiştir.
6. İnkübe edilen örnekler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Steril eppendorf tüplere alınan süpernatantlara, oda sıcaklığındaki isopropanolden 600 μ l ilave edilerek karıştırılmıştır (Bu aşamada DNA gözlemlenmiştir).
8. Örnekler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA'nın dibe çökmesi sağlanmıştır.
9. Süpernatant kısmı atılıp, dibe çöken DNA %70'lik 500 μ l etil alkolle 2 defa karıştırılarak, yıkanmıştır.
10. Tekrar 13.000 rpm'de iki dakika santrifüj edilerek DNA dibe çöktürülmüştür.
11. Süpernatant atılarak, dibe çöken DNA 50-55°C'de 10-15 dakika kurumaya bırakılmıştır.
12. Kuruyan DNA pelletlerine 100 μ l Rehydration Solution ilave edilerek, ister 65°C'de bir saat ya da 4°C'de bir gece boyunca çözülmeye bırakılmıştır.

İzole edilen DNA, bir sonraki işleme kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.2.5. Kullanılan Primerler ve PZR Uygulamaları

Örneklerin izolasyonundan elde edilen total DNA'lardan 16S rRNA, *rpoD* ve *rpoB* genlerinin arttırılması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda gerekli olan kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 4'te verilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu gerçekleştirmek için Techne® TC-3000G (Bibby Scientific, Cambridge, İngiltere) model gradient özellikli PZR cihazı kullanılmıştır.

Tablo 4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Konsantrasyon	16S rRNA	rpoD	rpoB
5X PZR tamponu		10 µl	10 µl	10 µl
dNTP karışımı	10 mM	4 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl	4,5 µl	5 µl
Primerler*	10 pmol	1 µl+1 µl	1 µl+1 µl	1 µl+1 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0,2 µl	2 µl	2 µl
Total DNA	50 (ng/ml)	2 µl	5 µl	5 µl
ddH ₂ O		28,8 µl	21,5 µl	21 µl
Toplam		50 µl	50 µl	50 µl

* İleri ve geri primerler

Primerlerin erime sıcaklığını (T_m) ve PZR için gerekli olan bileşenlerin miktarlarının optimizasyonu için, gradient reaksiyonlar oluşturulmuştur. 16S rRNA geninin arttırılması için Tablo 5'teki 27F ve 1492R primerlerinin erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak 51°C ve 8 gradient (47 – 55°C) bir reaksiyon oluşturulmuş ve en uygun erime sıcaklığının 50°C olduğu belirlenmiştir. *rpoB* geni için, Tablo 5'teki LAPS5 ve LAPS27 primerlerinin bağlanma sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak her iki çift primer için 62°C ve 8 gradient (58°C – 66°C) bir reaksiyon oluşturulmuş ve en uygun erime sıcaklığının 64°C olduğu bulunmuştur. *rpoD* geni için ise, Tablo 5'teki PsEG30F ve PsEG790R primerlerinin bağlanma sıcaklıklarına (T_m) dikkate edilerek her iki çift primer için, 46°C ve 8 gradient (42°C–50°C) bir reaksiyon oluşturulmuş ve en uygun erime sıcaklığının 47°C olduğu tespit edilmiştir. Primerler için uygun erime sıcaklığı belirlendikten sonra Tablo 4'te verilen konsantrasyonlardaki kimyasallar ile

Tablo 6’teki döngü koşulları kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PZR uygulamalarında oluşabilecek bir kirlenmenin olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır.

Tablo 5. 16S rRNA, *rpoB* ve *rpoD* genlerinin artırılması ve dizin analizi için kullanılan primerler

Bölge	Primerin Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')	T _m Değeri (°C)	Kaynak
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	54,3	Lane DJ, 1991
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	49,4	Lane DJ, 1991
	LAPS5	TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT	67,7	Tayeb vd., 2005
<i>rpoB</i>	LAPS27	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG	65,9	Tayeb vd., 2005
	PsEG30F	ATYGAAATCGCCAARCGCGTTGATKTCCTTGA	47,6	Mulet vd., 2009
<i>rpoD</i>	PsEG790R	ATYGAAATCGCCAARCGCGTTGATKTCCTTGA	45,6	Mulet vd., 2009

Tablo 6. Kullanılan primerler için PZR döngü koşulları

PZR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3	1
Ayrılma	94	0,25 ^{a/b} /0,30 ^c	
Yapışma	50 ^a /64 ^b / 47 ^c	0,25 ^{a/b} /0,30 ^c	35 ^{a/b} /36 ^c
Uzama	72	1 ^{a/b} /0,45 ^c	
Son Uzama	72	7	1
Bekleme	4	∞	

Not: a. 16S rRNA primerleri için bağlanma sıcaklığı, döngü süresi ve zamanı (T_m/dk)

b. *rpoB* primerleri için bağlanma sıcaklığı, döngü süresi ve zamanı (T_m/dk)

c. *rpoD* rRNA primerleri için bağlanma sıcaklığı, döngü süresi ve zamanı (T_m/dk)

d. Kontrol bölgesi primerleri için bağlanma sıcaklığı, döngü süresi ve zamanı (T_m/dk)

PZR ürünlerinin kontrolünü gerçekleştirmek için genomik DNA’nın kalitesinin belirlenmesinde yapılan işlemler %1’lik agaroz jel hazırlanarak tekrarlanmıştır. PZR ürünleri 100 bç’lik DNA Leader (Promega) ile yürütülerek büyüklükleri belirlenmiştir.

Bütün işlemler tamamlandıktan sonra istenilen konsantrasyon ve büyüklükte olduğu tespit edilen PZR ürünleri, DNA dizin analizi işlemine kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

2.2.6. DNA İzolasyon ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kalitesinin Tayini

DNA izolasyon yöntemiyle elde edilen genomik DNA ve PZR tekniği ile arttırılan gen ürünlerinin kalitesini etidyum bromür (0,5 mg/ml) içeren, genomik DNA için %0.8'lik, PZR ürünleri için ise %1'lik TAE-Agaroz jeli hazırlanarak elektroforezde yürütülmüştür ve jel görüntülenerek incelenmiştir. Örneklerin yürütüldüğü agaroz jelin görüntülenmesi işlemi Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)'deki ultraviyole transillüminatörde gerçekleştirilmiştir. Arttırılan gen ürünleri büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla bir marker ile beraber yürütülmüştür.

2.2.7. DNA Dizin Analizi

Çalışma için kullanılan primerler ile genomik DNA'dan PZR yardımıyla arttırılan 16S rRNA, *rpoB*, *rpoD* genlerinin doğrudan DNA dizin analizi (27F/1492R; PsEG30F/PsEG790R; LAPS5/LAPS27) primerleri kullanılarak ticari bir firma olan Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'den hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. Çift zincirli PZR ürünlerinin temizlenmesini takiben DNA dizin analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) ile Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. Genbank Taraması, Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz

Çalışma için kullanılan 16S rRNA, *rpoB* ve *rpoD* gen dizileri, filogenetik analizlerde ve GenBank taramasında kullanılmak üzere uygun hale getirilmek için BioEdit versiyon 7.1.3. (Hall, 1999) yardımıyla düzenlenmiştir. Gen dizilerini karşılaştırmak için BioEdit içerisinde yer alan Clustal W seçeneği kullanılmıştır. Gerek duyulduğundan, kromotogramlar incelenerek gen dizilerinin kontrolü yapılmıştır.

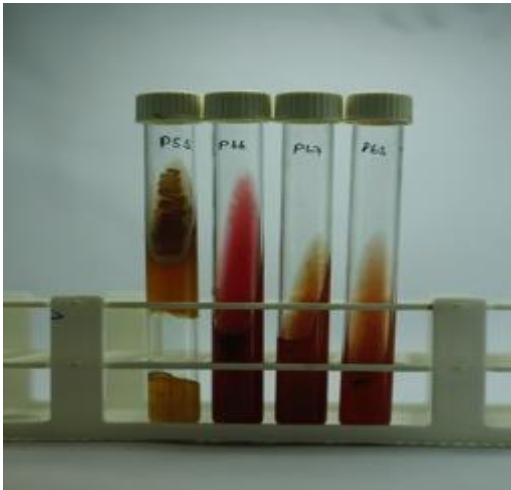
GenBank taraması için NCBI sitesinin “BLAST” seçeneği kullanılmış ve gen dizileri GenBank’ın veri tabanında karşılaştırılmıştır.

Suşlar arasındaki filogenetik ilişkiler, MEGA versiyon 6.05 (Tamira vd., 2013) programındaki komşu katılım (NJ: Neighbour-Joining), maksimum tutumluluk (MP: Maximum Parsimony) ve maksimum olasılık (ML: Maximum Likelihood) analizleri yardımıyla tahmin edilmiştir. *Acinetobacter sp.* (GenBank erişim numarası: HM_584296), filogenetik analizler için dış grup olarak seçilmiştir.

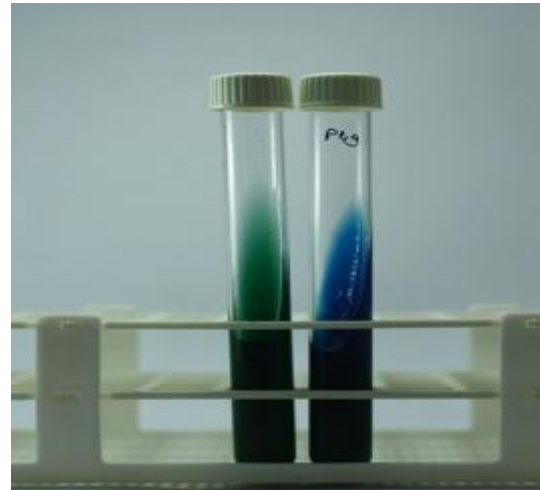
3. BULGULAR

3.1. Bakterilere Ait Bulgular

İzole edilen 28 *Pseudomonas* suşunun hepsi gram negatif bakteri olup, hareket ve katalaz testleri sonuçlarında pozitif (+) olarak kaydedilmişlerdir. Bütün suşlar GSP agarda mor renk oluşturmuştur. Oksidaz testi ise dört suşta (P47-P53-P56-P84) negatif bulunmuş, diğer suşlarda pozitif sonuç göstermişlerdir. Bütün suşlar sitrat, arjinin dihidrolaz testlerinde pozitif sonuç vermiş ve oksidatifdir. Voges-Proskauer, metil kırmızısı (MR), indol testleri, bir suş istisna ile (P60) lizin ile ornithin ve H₂S oluşumu negatif kaydedilmiştir. Triple Sugar Iron agarda gaz oluşmamış ve laktoz, sukroz oluşumu ile negatif sonuçlar gözlenmiştir. Üre testi sonuçları sadece iki suşta (P49–P82) pozitif çıkmış, eskülin ise sadece P47 suşunda pozitif çıkmıştır. *Pseudomonas fluorescens* grubunu temsil eden suşlarda jelatin bir istisna hariç pozitif (P49), aynı şekilde *Pseudomonas putida* grubunu temsil eden suşlar da istisnai bir suş (P56) hariç negatif sonuç vermiştir. Değişkenlik gösteren nitrat, TSI ve %7 tuzluluk testlerinin sonuçları Tablo 7’da verilmiştir. Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9’da ise bazı biyokimyasal testlere ait pozitif ve negatif reaksiyonları gösterilmektedir.



Şekil 4. Triple Sugar Iron Agar Testleri



Şekil 5. Sitrat Testleri

Tablo 7. Nitrat, Üçlü şeker (TSI) ve % 7'lik tuzda üreme testlerin sonuçları

Suş No	Nitrat	TSI	%7
P1	+	Laktoz	+
P2	+	Laktoz	+
P5	-	Laktoz	+
P7	-	Laktoz	+
P8	-	Laktoz	+
P9	-	Laktoz	+
P13	+	-	+
P24	-	Laktoz	+
P28	+	Laktoz	+
P38	-	-	+
P47	-	-	+
P48	-	-	+
P49	-	-	+
P50	-	-	+
P52	-	-	+
P53	-	-	z
P54	+	Laktoz	z
P56	+	-	z
P58	-	-	z
P60	+	Laktoz	+
P64	-	Sukroz	+
P65	-	Sukroz	-
P66	-	-	+
P67	-	Sukroz	+
P73	-	-	+
P84	+	-	+
P85	-	-	+
P91	+	-	+

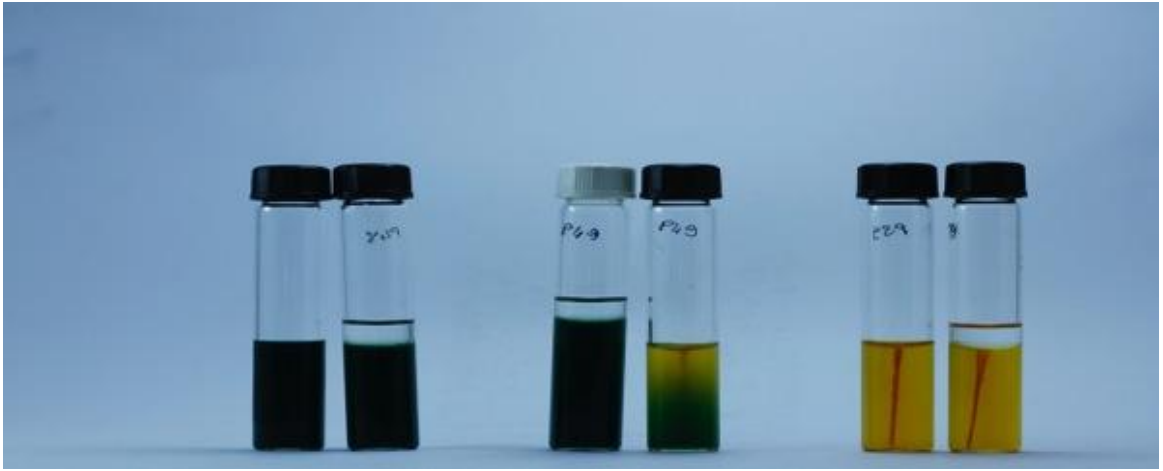
(+ : pozitif sonuç; - : negatif; z: zayıf)



Şekil 6. Jelatin Hidroliz Testi



Şekil 7. Üre Testi



Şekil 8. Oksidasyon ve/veya Fermentasyon Testi



Şekil 9. Arjinin Dihidrolaz Testi

3.2. Antibiyotik Dirençliliği

İzole edilen *Pseudomonas* cinsi bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direnç ve hassasiyetler her bir bakteri suşu için ayrı ayrı belirlenmiş ve Tablo 8’de direnç profilleri gösterilmiştir.

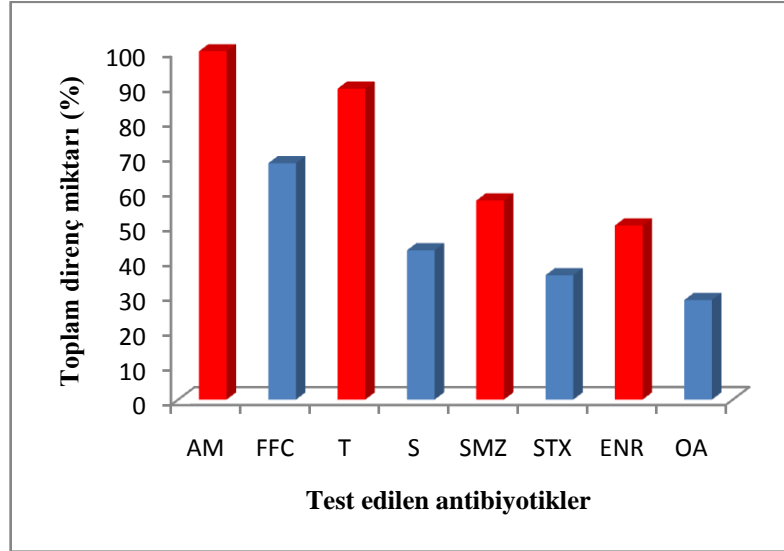
Tablo 8. Antibiyogram test sonucuna göre *Pseudomonas* suşlarına ait direnç profilleri
Antibiyotik disk konsantrasyonlarına göre ölçülen zon çaplarının hassasiyeti

Bakteri suşları	SMZ	SXT	FFC	ENR	AM	S	T	OA
	100 µg	25 µg	30 µg	5 µg	10 µg	10 µg	30 µg	2 µg
P1	D	D	D	D	D	R	D	D
P2	D	D	D	D	D	R	D	D
P5	D	OH	D	H	D	H	D	H
P7	D	D	D	H	D	OH	D	H
P8	H	H	OH	D	D	H	OH	D
P13	D	D	D	D	D	R	D	D
P24	D	D	D	D	D	D	D	D
P28	H	OH	D	D	D	H	D	OH
P38	D	D	D	D	D	H	D	H
P47	H	H	OH	H	D	H	D	H
P48	D	D	D	D	D	D	D	H
P49	OH	OH	OH	H	D	OH	D	H
P50	D	OH	D	OH	D	D	D	H
P52	OH	OH	H	D	D	D	D	H
P53	D	D	D	D	D	D	D	D
P54	D	OH	D	D	D	D	D	OH
P56	D	D	D	D	D	D	D	OH
P58	H	OH	D	H	D	OH	D	H
P60	D	D	D	H	D	R	D	H
P64	H	H	H	H	D	H	OH	H
P65	OH	OH	H	H	D	H	D	H
P66	H	H	H	H	D	H	D	H
P67	H	H	D	H	D	H	D	H
P73	D	H	D	D	D	OH	D	D
P84	OH	OH	D	H	D	H	D	H
P85	D	H	D	D	D	H	OH	R
P91	H	OH	H	OH	D	H	D	H

SMZ: Sulfamethoksazol; SXT: Trimethoprim+Sulfamethaksazol; FFC: Florfenikol; ENR: Enrofloksasin; AM:Ampisilin; S: Streptomisin; T: Oksitetrasiklin; OA: Oksolinik asit; D: Dirençli; OH: Orta hassas; H: Hassas

Antibiyogram testinin neticesinde her bir antibiyotiğe karşı dirençli bakterilerin sayısı ve direnç seviyesinin yüzdesi Şekil10'da gösterilmiştir. Bakterilerin en fazla

dirençli olduğu antibiyotik ampicilin olarak belirlenirken bunu oksitetrasiklin ve florfenikol takip etmiştir. Bunun yanında oksalinik asit ise en etkili antibiyotik olarak tespit edilmiştir.

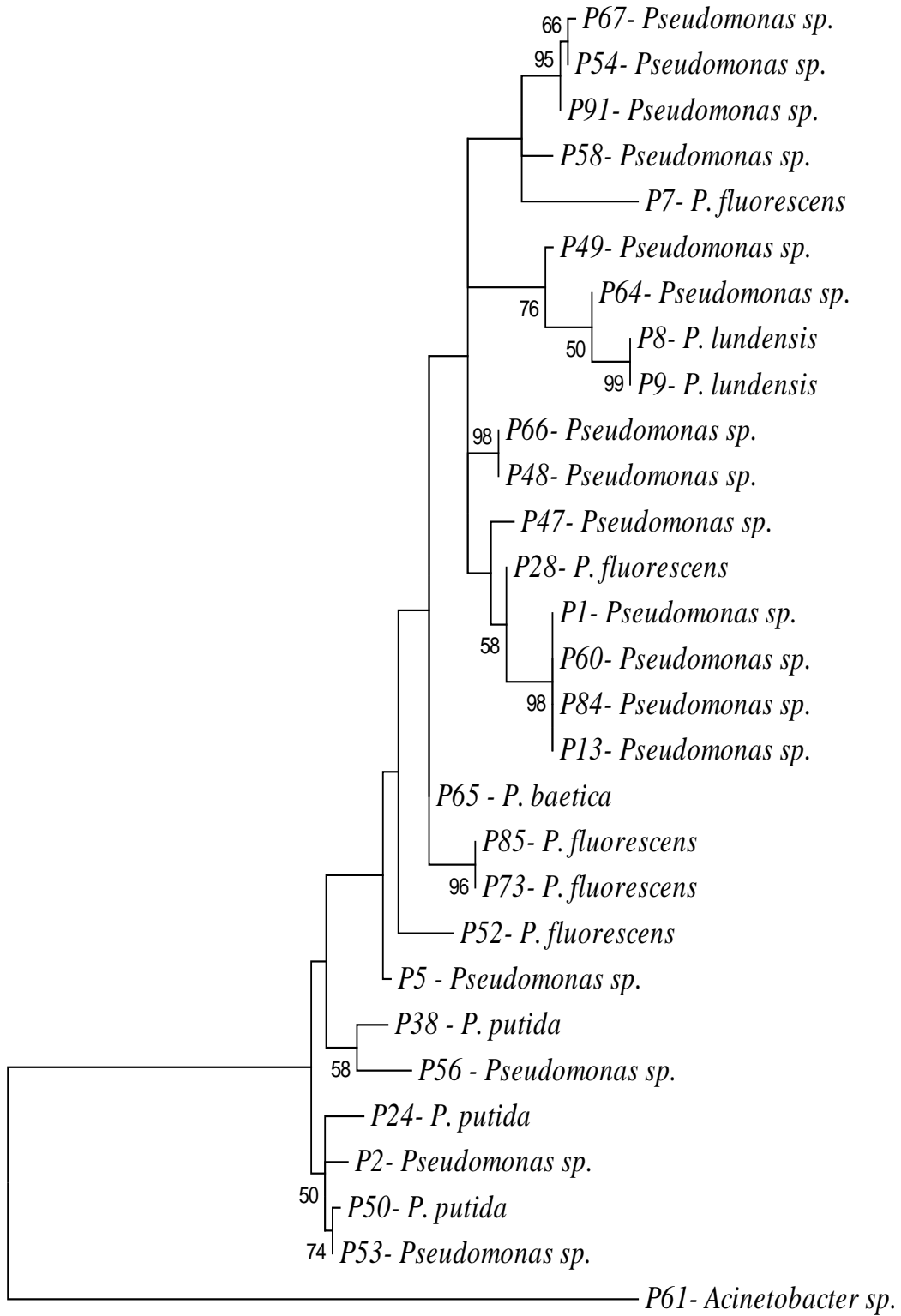


Şekil 10. Antibiyogramda test edilen antibiyotiklere karşı *Pseudomonas* suşlarına ait toplam direnç miktarı (%)

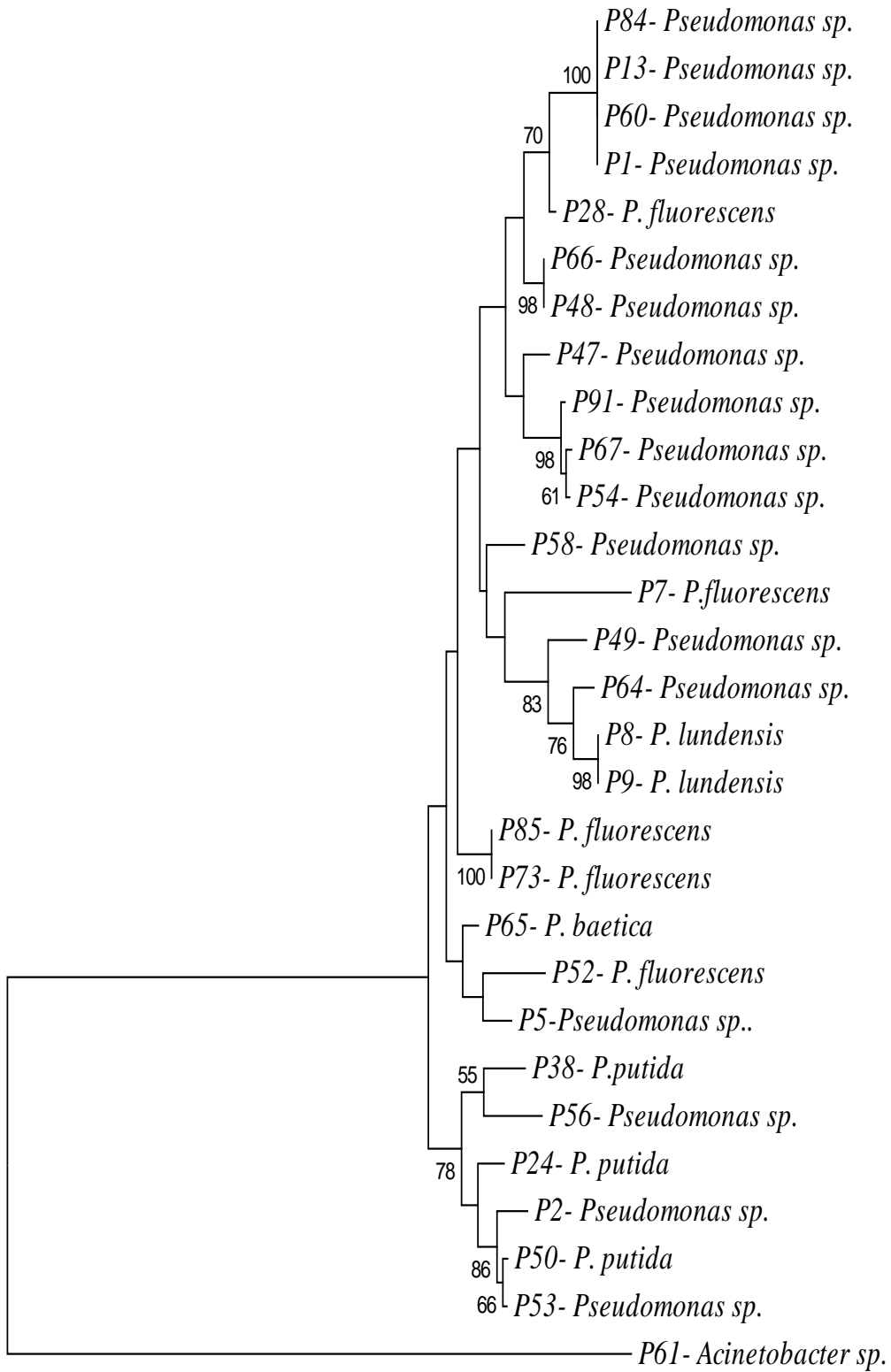
Rize, Trabzon ve Gümüşhane illerindeki çiftliklerdeki hastalık vakalarından alınan balıklardan izole edilen bakterilerin fizyolojik, biyokimyasal özellikleri incelenmiş ve tayin yapılması amacıyla üç gene ait nükleotit dizileri kullanılarak filogenetik ağacı oluşturulmuştur.

3.3. Moleküler İdentifikasyonda 16S rRNA Primeri Kullanılarak Yapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması

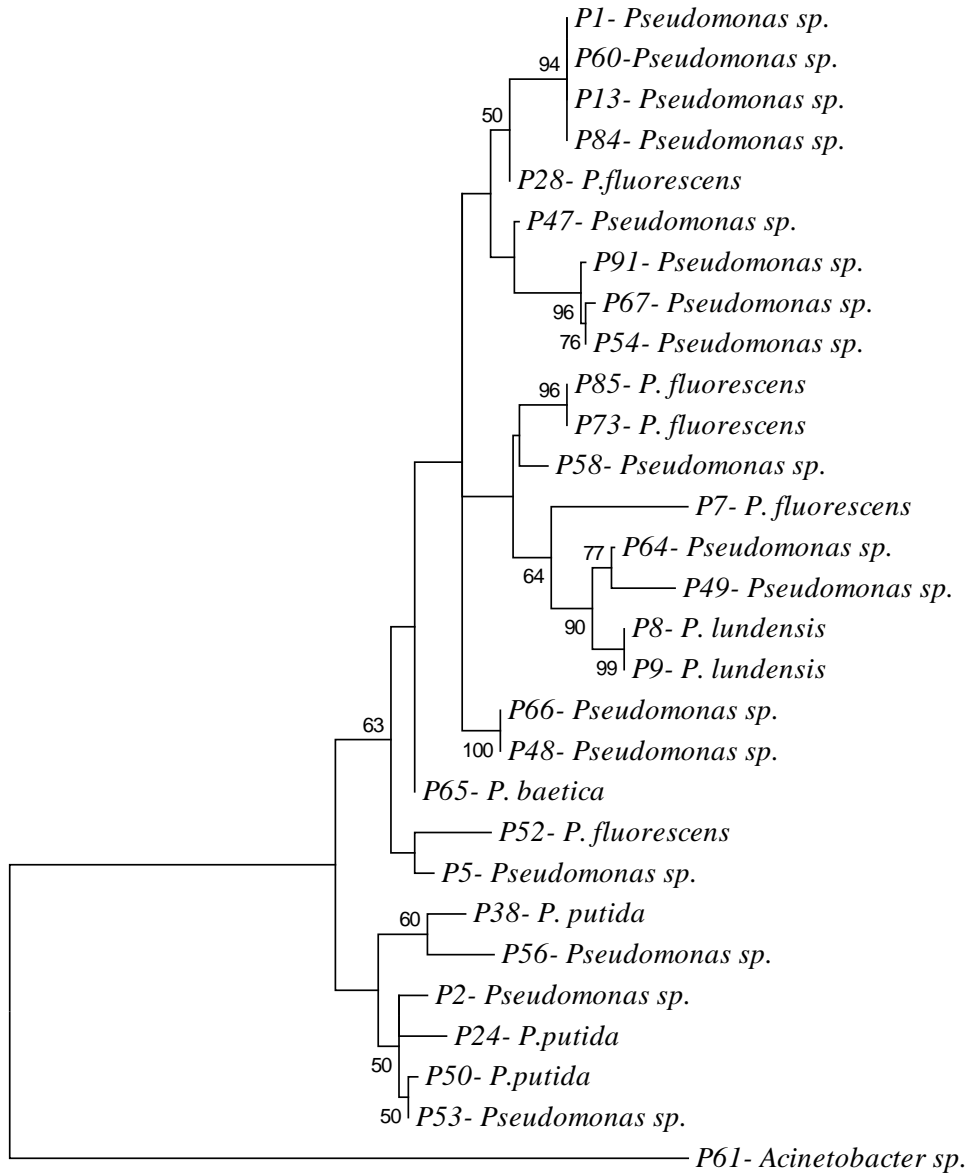
Bu çalışmada, 16S rRNA genine ait nükleotit dizilerinin Neighbour-Joining, Maksimum likelihood, Maksimum parsimony analizlerinden elde edilen filogenetik ağaçları arasında dikkate değer bir farklılık bulunmamıştır. Analizleri yapılan ağaçlar Şekil 11, 12 ve 13’de verilmiş olup, daha önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere 16S rRNA geninin karşılaştırılması sonucu, analiz edilen *Pseudomonas*’lar ve GenBank’tan alınan örnekler arasında karşılaştırma yapılarak, türler tanımlanmıştır.



Şekil 11. Maksimum Likelihood (ML) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı



Şekil 12. Neighbour-Joining (NJ) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı



Şekil 13. Maksimum Parsimony (MP) analizine göre 16S rRNA filogenetik ağacı

*Pseudomonas spp'*ler 16S rRNA gen analizinin sonuçlarına dayanan filogenetik ağaç ile *P. fluorescens* ve *P. putida* olmak üzere iki *Pseudomonas* grubuna ayrılmıştır. Bu gruplar jelatin testleriyle de birbirinden ayrılmış ve *P. fluorescens* grubu jelatin testlerinde pozitif reaksiyon gösterirken, *P. putida* grubu negatif reaksiyon göstermiştir. *P. fluorescens* grubunda P49 suşu ve *P. putida* grubunda ise P56 suşu istisnai türler olarak belirlenmiştir.

Belirlenen suşların GenBank'taki benzer türler ile 16S rRNA geni nükleotit dizileri yoluyla yapılan analizine göre filogenetik ağaçtaki dağılım şu şekilde olduğu tespit edilmiştir: *P. fluorescens* grubu içerisinde P1, P13, P84 ve P60'ın aynı hat üzerinde olduğu gözlemlenmiş ve sırasıyla *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. gessardii*'ye benzedikleri gözlemlenmiştir. Ağacın bu dört türden ayrılarak aynı dal üzerinde fakat başka bir hattında temsil edilen P28'in ise, sırasıyla *Pseudomonas sp.*, *P. brenneri* ve *P. fluorescens*'e benzediği gözlemlenmiştir. Benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. P1, P13, P84, P60 ve P28'in 16S rRNA gen analizi sonucu benzediği türler.

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No	Benzerlik Oranı
P1/P13	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM453980	%99
P84/P60	<i>P. fluorescens</i>	KJ919971	%99
	<i>P. gessardii</i>	KJ726608	%99
P28	<i>Pseudomonas sp.</i>	KC991319	%99
	<i>P. brenneri</i>	KC293836	%99
	<i>P. fluorescens</i>	KC009692	%99

P48 ve P66 aynı hat üzerinde yerleşmiş olmasına rağmen, P48'e yakın türlerin hiçbiri aynı dalda yerleşmemişlerdir. P48, sırasıyla daha farklı hatlar üzerinde yerleşmiş *P. meridiana*, *Pseudomonas sp.* ve *P. mandelii* ile benzerlik göstermiştir. P48 ile aynı hat üzerinde bulunan P66'nın ise sırasıyla *P. brenneri*, *Pseudomonas sp.*, *P. banacis* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. P48 ve P66'nın 16S rRNA gen analizi sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P48	<i>P. meridiana</i>	KJ726563	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF870417	%99
	<i>P. mandelii</i>	KC618443	%99
P66	<i>P. brenneri</i>	KJ529059	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF720926	%99
	<i>P. banacis</i>	KF501476	%99

Pseudomonas izolatlarına ait P47 suşu, sırasıyla *Pseudomonas sp.* ve *P. brenneri* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları ile birlikte Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. P47'nin 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P47	<i>Pseudomonas sp.</i>	KC306463	%99
	<i>P. brenneri</i>	KJ589451	%99

Pseudomonas izolatlarına ait stok numaraları P54, P67 ve P91 olan suşlar aynı dalda fakat farklı hatlar üzerinde yerleşmişlerdir. P91 herhangi bir GenBank örneğiyle aynı hatta yerleşmemesine rağmen, GenBank sonuçları sırasıyla *Pseudomonas sp.*, *P. meridiana* ve *P. mandelii* ile benzerlik göstermektedir. P67 sırasıyla, *Pseudomonas sp.*'ye, *P. simiae*'ye ve *P. fluorescens*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. P54 ise, *Pseudomonas sp.*, *P. mandelii*, *P. trivialis* ve *P. salomonii* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. P91, P67 ve P54'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P91	<i>P. meridiana</i>	KJ726563	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF870417	%99
	<i>P. mandelii</i>	KC618443	%99
P67	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM461113	%99
	<i>P. simiae</i>	CP007637	%99
	<i>P. fluorescens</i>	KJ420526	%99
P54	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF870417	%99
	<i>P. mandelii</i>	KC618443	%99
	<i>P. trivialis</i>	KF704111	%99
	<i>P. salomonii</i>	JX840381	%99

Pseudomonas izolatlarına ait stok numarası P58 olan suşun sırasıyla, *P. mandelii*, *P. graminis* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. Benzerlik oranı ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. P58'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P58	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM253127	%99
	<i>P. graminis</i>	KM434253	%99
	<i>P. mandelii</i>	JN637323	%99

Bakteri izolatlarına ait stok numarası P7, P8, P9, P49 ve P64 olan suşların aynı dal üzerinde bulunmakta olup, P8 ile P9'un aynı hat üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. P7 sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. protegens* ile; P49, "kültüre edilemeyen bakteri (uncultured bacterium)", *P. psychrophila* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik gösterirken, P64'ün ise, *P. fragi*, *P. taiwanensis*, *P. psychrophila* ile benzer olduğu belirlenmiştir. Aynı hat üzerinde bulunan P8 ve P9 ise, "kültüre edilemeyen bakteri (uncultured bacterium)", *P. fragi* ve *P. lundensis* ile benzer bulunmuştur. Benzerlik oranlarına ve referans numaralarına ait bilgiler Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. P7, P49, P64, P8 ve P9'un 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P7	<i>Pseudomonas sp.</i>	JF327650	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HQ606463	%99
	<i>P. protegens</i>	KF475826	%99
P49	kültür edilemeyen bakteri (uncultured bacterium)	KF065218	%99
	<i>P. psychophila</i>	KC315769	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU176052	%99
P64	<i>P. fragi</i>	LK391512	%99
	<i>P. taiwanensis</i>	KM070814	%99
	<i>P. psychophila</i>	KJ589497	%99
P8-P9	kültür edilemeyen bakteri (uncultured bacterium)	KF065306	%99
	<i>P. fragi</i>	AB685653	%99
	<i>P. lundensis</i>	JX867752	%99

Aynı hat üzerinde bulunan, P85 ve P73'ün benzer türleri ise *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas sp.* ve *P. fluorescens* olup, benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. P85 ve P73'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P85	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ769212	%99
	<i>P. fluorescens</i>	KC991324	%99
	<i>P. baetica</i>	JX840394	%99
P73	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ769212	%99
	<i>P. fluorescens</i>	KC991324	%99
	<i>P. baetica</i>	JX840394	%99

P65'in benzediği türler ise sırasıyla *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas sp.* ve *P. mandelii* olup, benzerlik oranı ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. P65'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P65	<i>P. baetica</i>	KJ589517	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	HF678958	%99
	<i>P. mandelii</i>	EU647701	%99

Bakteri izolatlarına ait P5 ve P52 suşları, aynı dal üzerinde bulunmakta olup, P52'in benzediği türler sırasıyla *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* ve *Pseudomonas sp.*'dir. Bakterilere ait 16S rRNA geninin sekans analizine göre, *P. fluorescens* grubunun son türü P5'in ise sırasıyla *P. baetica*, *Pseudomonas sp.*, *P. jessenii* ve *P. umsongensis* ile benzerlik gösterdiği görülmüş ve benzerlik oranı ile Genbank'taki referans numaraları Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. P52 ve P5'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P52	<i>P. putida</i>	KF030909	%99
	<i>P. fluorescens</i>	KM241843	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ601751	%99
P5	<i>P. putida</i>	LK391527	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF733330	%99
	<i>P. jessenii</i>	GU188917	%99
	<i>P. umsongensis</i>	JN167958	%99

Pseudomonas putida grubu içerisinde ise P56 ve P38 aynı dal üzerinde konumlanmış olup, P56 sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. vranovensis* ve *P. putida*'ya benzerlik göstermiştir. P38 ise sırasıyla *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo.18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. P56 ve P38'in 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P56	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM457624	%99
	<i>P. vranovensis</i>	KC244342	%99
	<i>P. putida</i>	JQ086574	%99
P38	<i>P. putida</i>	KM251260	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ851576	%99

Pseudomonas izolatlarına ait P2 suşu sırasıyla, *P. oryzihabitans*, *Pseudomonas sp.*, ve *P. putida* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19. P2'nin 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P2	<i>P. oryzihabitans</i>	KJ401059	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ093367	%99
	<i>P. putida</i>	JF327491	%99

Bakteri izolatlarından P24 suşuna ait 16S rRNA gen analiz sonucu ise sırasıyla, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. P24'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P24	<i>P. putida</i>	KM012010	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ642599	%99

Bakteri izolatlarından P53 ve P50 suşuna ait 16S rRNA gen analizinde, aynı dal üzerinde yerleşmiş olup, *Pseudomonas putida* grubunun son üyelerini temsil etmektedirler. İzolatlardan P53, *P. putida* ile benzerlik gösterirken, P50 ise sırasıyla, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermektedir. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaralarına ait bilgiler Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. P50 ve P53'ün 16S rRNA gen analiz sonucu benzediği türler

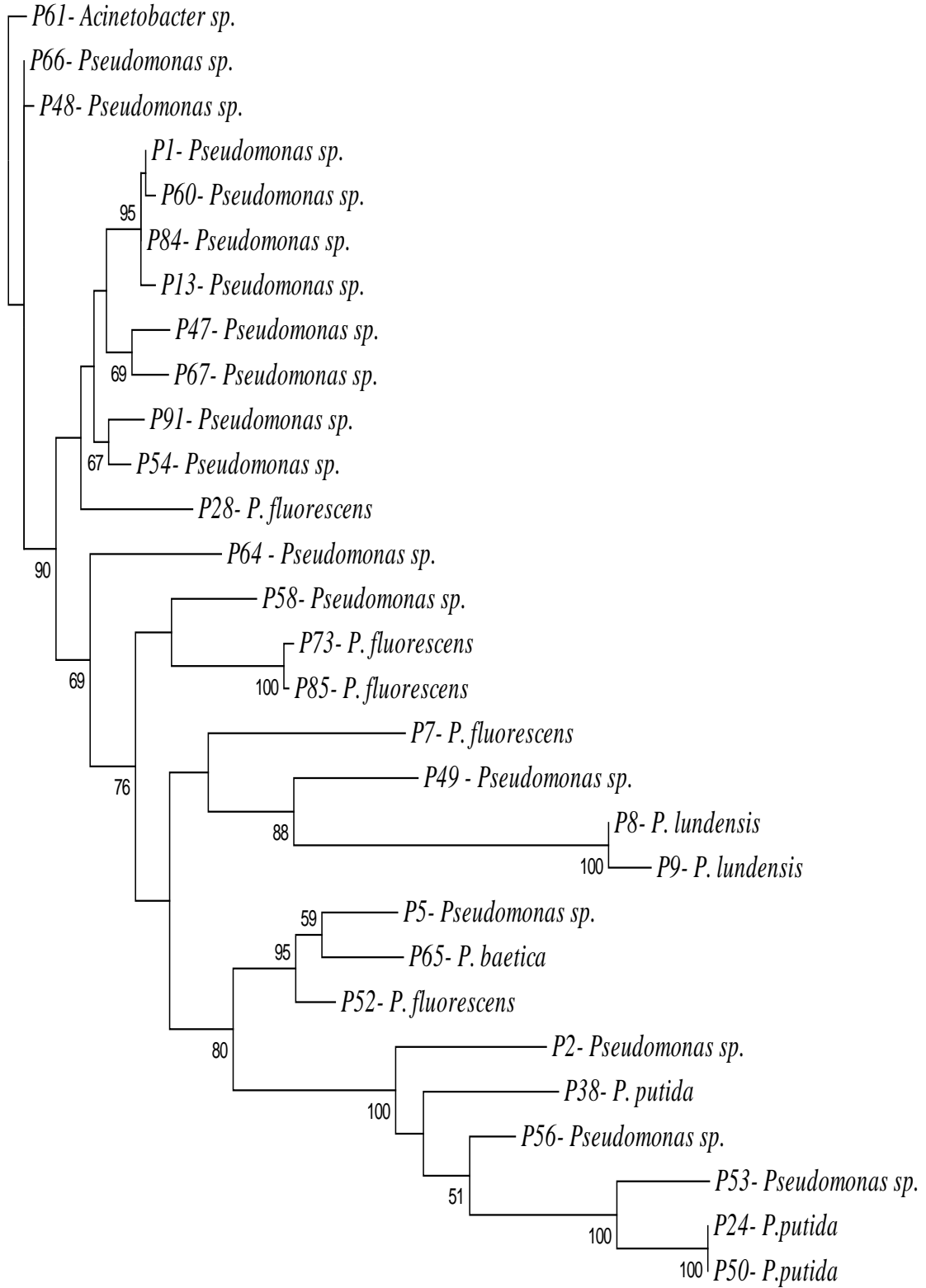
Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P50	<i>P. putida</i>	KJ452464	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM235738	%99
P53	<i>P. putida</i>	KM378615	%99

Bakteri izolatlarından P61 ise dış grubu temsil etmekte olup, yapılan analizler sonucu *Acinetobacter sp.* (HM584296/%99) ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

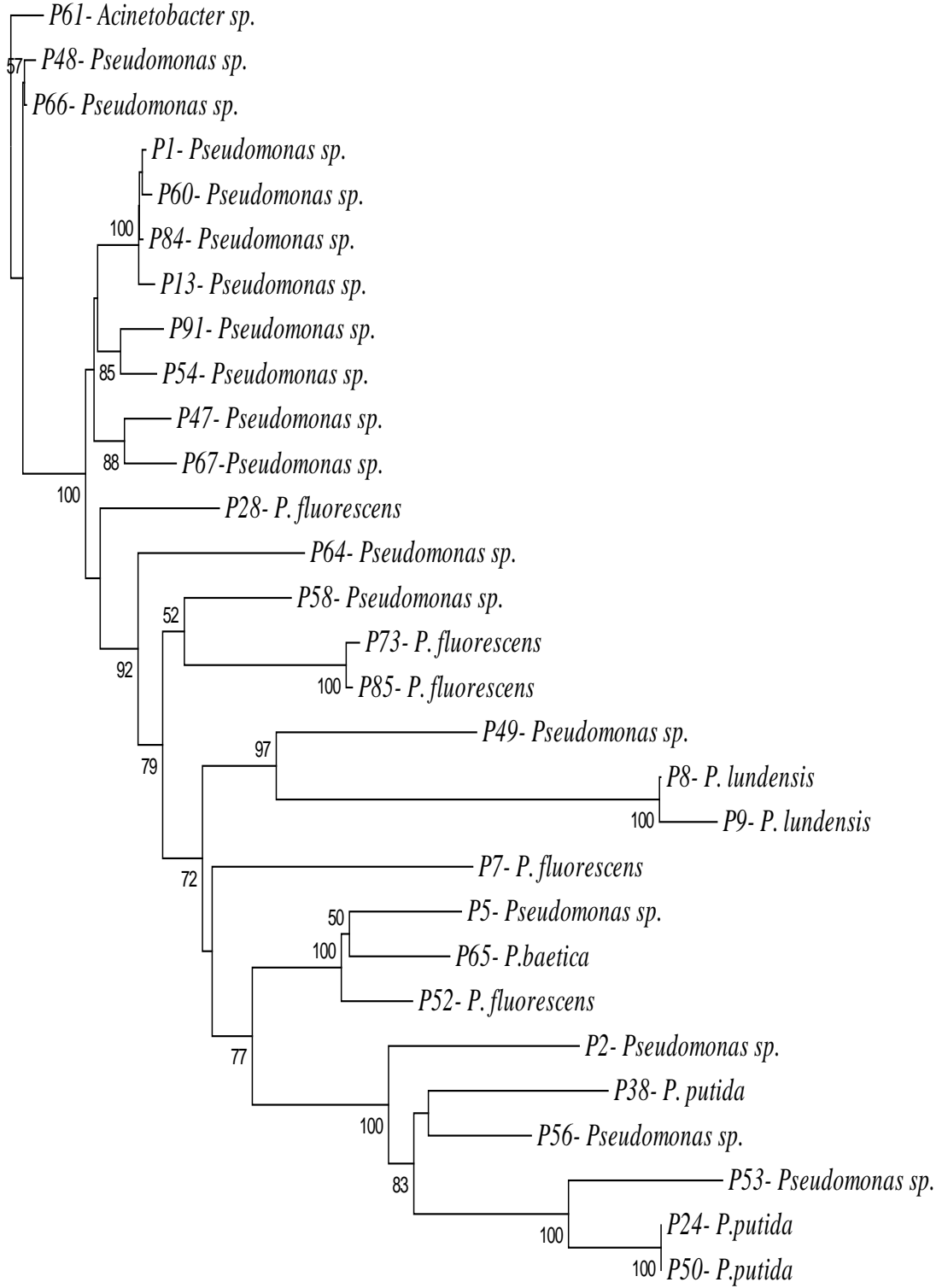
3.4. Moleküler İdentifikasyonda *rpoB* Primeri Kullanılarak Yapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması

Bakteri identifikasyonunda moleküler marker olarak kullanılan *rpoB* geninin Neighbour-Joining, Maksimum likelihood ve Maksimum parsimony analizleriyle yapılan ağaçların arasında dikkate değer bir farklılık bulunmamıştır. Analizleri yapılan ağaçlar Şekil 14, 15 ve 16'da verilmiştir.

Pseudomonas bakterisine ait moleküler tanıda *rpoB* gen analizine dayanan filogenetik ağaç, 16S rRNA ve *rpoD* geninden farklı olarak iki ana *Pseudomonas* grubuna ayrılmamış ve bu bakımdan diğer iki genin filogenetik ağaç topolojisinden farklı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 14. Maksimum Likelihood (ML) analizine göre *rpoB* filogenetik ağacı



Şekil 15. Neighbour- Joining (NJ) analizine göre *rpoB* filogenetik ağacı



Şekil 16. Maksimum Parsimony (MP) analizine göre *rpoB* filogenetik ağacı

Moleküler identifikasyonda *rpoB* geniyle PZR'ı yapılan örneklerle, GenBank'ta karşılaştırılan türlerin analizine göre filogenetik ağaçtaki dağılım şu şekilde gerçekleştirilmiştir: P53'ün sırasıyla *Pseudomonas putida*'ya, ve *Pseudomonas* sp.'e benzediği görülmüştür. P50'nin ise sadece *P. putida*'ya benzediği gözlemlenmiştir. Benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. P53 ve P50'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P53	<i>P. putida</i>	CP003588	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AJ748155	%99
P50	<i>P. putida</i>	JX491483	%96

Bakteri izolatlarına ait stok numarası P24 olan suş sırasıyla, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* ve *P. chlororaphis* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranı ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 23'de verilmiştir.

Tablo 23. P24'ün *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P24	<i>P. putida</i>	CP005976	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AJ748156	%99
	<i>P. chlororaphis</i>	AJ748180	%99

Yapılan analiz sonuçlarına göre P56 izolatu sırasıyla, hiçbirisi kendisiyle aynı dalda bulunmayan, *Pseudomonas alkylphenolia*'ya, *Pseudomonas sp.*'ye, *P. putida*'ya ve *P. japonica*'ya benzemiş olup, benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. P56'nın *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve benzerlik oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P56	<i>P. alkylphenolia</i>	CP009048	%96
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM944724	%95
	<i>P. putida</i>	CP002290	%94
	<i>P. japonica</i>	HE577800	%96

Balıklardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarından P38 stok numaralı suşun sırasıyla, *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* ile kendisiyle aynı dalda bulunmayan *P. alkylphenolia* ve *P. japonica*'yla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Suşlara ait benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 25'de verilmiştir.

Tablo 25. P38'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P38	<i>P. fluorescens</i>	HM234515	%98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	JN603371	%97
	<i>P. alkylphenolia</i>	CP009048	%94
	<i>P. japonica</i>	HE577800	%94

Moleküler tanıda, P2 stok numaralı suşun sırasıyla, *Pseudomonas fluorescens*'e, kendisiyle aynı dalda bulunmayan *P. alkylphenolia*'ya, *Pseudomonas sp.*'ye ve *P. japonica*'ya benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir., Analiz sonuçları göre yapılan karşılaştırmada GenBank'taki referans numaraları ve suşların benzerlik oranları Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 26. P2'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P2	<i>P. fluorescens</i>	HM234532	%99
	<i>P. alkylphenolia</i>	CP009048	%94
	<i>Pseudomonas sp.</i>	JN695046	%93
	<i>P. japonica</i>	HE577800	%94

Bakteri izolatlarından P52 stok numaralı suş sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens*, *P. koreensis* ve *P. putida* ile benzerlik göstermektedir. Benzer olan türlerden sadece *P. fluorescens* ile aynı dalda bulunmakta olup, benzerlik gösterdiği diğer türler, başka dallara yerleşmişlerdir. Benzerlik oranları ve GenBank referans numaraları Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. P52'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P52	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM944725	%97
	<i>P. fluorescens</i>	HE586413	%99
	<i>P. koreensis</i>	FN554737	%97
	<i>P. putida</i>	JN673406	%100

Bakteri izolatlarından P5 ve P65 stok numaralı suşlardan, P5 sırasıyla, kendisiyle aynı dalda bulunmayan, *Pseudomonas sp.*, *P. koreensis* ve *P. baetica*'yla benzerlik göstermiş olup, P65 ise sırasıyla, *P. baetica* ile, kendisiyle aynı dalda bulunmayan, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. koreensis*'le benzerlik göstermektedir. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 28. P5 ve P65'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P5	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM944725	%98
	<i>P. koreensis</i>	FN554737	%97
	<i>P. baetica</i>	HE800504	%96
P65	<i>P. baetica</i>	HE800504	%98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM944725	%97
	<i>P. fluorescens</i>	CP000094	%96
	<i>P. koreensis</i>	FN554737	%97

Bakteri izolatlarından P7 stok numaralı suş ise *Pseudomonas fluorescens* ve kendisiyle aynı dalda bulunmayan *Pseudomonas sp.* ile *P. protegens*'e benzer bulunmuş olup, benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 29. P7'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P7	<i>P. fluorescens</i>	HE586409	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM944719	%99
	<i>P. protegens</i>	CP000076	%95

Bakteri izolatlarından P49 stok numaralı suş ise sırasıyla, *Pseudomonas sp.* ve *P. taetrolens* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. P49'un *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P49	<i>Pseudomonas sp.</i>	FN650767	%99
	<i>P. taetrolens</i>	AJ786291	%99

Pseudomonas izolatlarından P8 ile P9 stok numaralı suşlar aynı hat üzerinde bulunmakta olup, sırasıyla *Pseudomonas sp.* ve *P. lundensis* ile benzerlik göstermişlerdir. GenBank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. P8 ve P9'un *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P8/P9	<i>Pseudomonas sp.</i>	FN650765	%95
	<i>P. lundensis</i>	AJ717428	%95

Bakteri izolatlarından P58 ise kendisiyle aynı dalda bulunan fakat aynı hatta bulunmayan *Pseudomonas sp.*'ye, kendisiyle aynı hat üzerinde bulunan *P. frederikbergensis*'e ve *P. reptilovora* ile *P. fluorescens*'e benzer bulunmuştur. Benzerlik oranları ve GenBank'taki numaraları Tablo 32'de gösterilmiştir.

Tablo 32. P58'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P58	<i>Pseudomonas sp.</i>	GQ254720	%98
	<i>P. frederikbergensis</i>	AJ717465	%98
	<i>P. reptilovora</i>	AJ748197	%97
	<i>P. fluorescens</i>	AJ748135	%97

Bakteri izolatlarından P73 ve P85, aynı hat üzerinde bulunup, sırasıyla *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. GenBank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 33'de verilmiştir.

Tablo 33. P73 ve P85'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P73/P85	<i>P. fluorescens</i>	HE586423	%99
	<i>P. putida</i>	JN673406	%95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	GQ254720	%95

Bakteri izolatlarından P64, sırasıyla, *Pseudomonas sp.* ve *Pseudomonas fragi* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 34'de verilmiştir.

Tablo 34. P64'ün *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P64	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886124	%97
	<i>P. fragi</i>	AJ717444	%97

Bakteri izolatlarından P82 suşunun ise, sadece *Pseudomonas sp.* ile aynı hat üzerinde yerleşmiş olup, daha sonra sırasıyla başka dallarda bulunan *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. simiae* ve *P. marginalis* ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. GenBank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 35'de verilmiştir.

Tablo 35. P82'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P82	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886125	%99
	<i>P. fluorescens</i>	AM181176	%97
	<i>P. gessardii</i>	AJ717418	%97
	<i>P. simiae</i>	CP007637	%98
	<i>P. marginalis</i>	HE586424	%98

Bakteri izolatlarından P28 stok numaralı suşun benzediği GenBank örnekleri sırasıyla, *Pseudomonas fluorescens*, *P. brenneri* ve kendisiyle aynı dalda bulunmayan *P. gessardii* olup, benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 36'da verilmiştir.

Tablo 36. P28'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P28	<i>P. fluorescens</i>	AJ748170	%99
	<i>P. brenneri</i>	AJ717482	%99
	<i>P. gessardii</i>	AJ717438	%97

Bakteri izolatlarından P67 ve P47 stok numaralı suşlar aynı dal üzerinde yerleşmiş olup, P67 suşu sırasıyla *Pseudomonas simiae*, *P. fluorescens* ve *P. tolaasi*'ye benzerlik göstermiştir. P47 suşu ise *P. simiae*, *Pseudomonas sp.*, *P. reactans*, *P. fluorescens* ve *P. tolaasi*'ye benzerlik göstermektedir. Tablo 37'de benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları verilmiştir.

Tablo 37. P67 ve P47'nin *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P67	<i>P. simiae</i>	CP007637	%98
	<i>P. fluorescens</i>	AJ748138	%98
	<i>P. tolaasi</i>	HE586431	%98
P47	<i>P. simiae</i>	CP007637	%98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886127	%99
	<i>P. reactans</i>	JX491482	%98
	<i>P. fluorescens</i>	AJ748138	%98
	<i>P. tolaasi</i>	HE586431	%98

Bakteri izolatlarından P91 ve P54 suşları aynı hat üzerinde bulunmasına rağmen, GenBank'ta benzer türlerinin hiçbiri aynı hat üzerine yerleşmemiştir. İzolatlardan P91, sırasıyla, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas sp.*, *P. reactans*, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. simiae* ile benzerlik göstermiş olup, P54 suşu ise sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. gessardii* ve *P. simiae* ile benzerlik göstermiştir. Genbank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 38'de verilmiştir.

Tablo 38. P91 ve P54'ün *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P91	<i>P. gessardii</i>	AJ717438	%98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	FN650769	%97
	<i>P. reactans</i>	JX491485	%97
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886121	%98
	<i>P. fluorescens</i>	HE586408	%98
	<i>P. simiae</i>	CP007637	%97
P54	<i>Pseudomonas sp.</i>	FN650769	%97
	<i>P. gessardii</i>	AJ717438	%98
	<i>P. simiae</i>	CP007637	%98

Bakteri izolatlarından P13 stok numaralı suşun sırasıyla, *Pseudomonas fluorescens*'e ve kendisiyle aynı dalda bulunmayan *Pseudomonas sp.* ve *P. meridiana*'ya benzer olduğu görülmüştür. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 39'da verilmiştir.

Tablo 39. P13'ün *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P13	<i>P. fluorescens</i>	HE586408	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886121	%99
	<i>P. meridiana</i>	FN554740	%99

Bakteri izolatlarından P1 ve P60 suşları aynı hat üzerinde bulunmakta olup, GenBank'ta kendilerine benzer türlerle aynı hatta bulunmamaktadırlar. İzolatlardan P1 suşu sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. meridiana* ile benzerlik göstermiş olup, P60 suşu ise sırasıyla, *P. sp.*, *P. fluorescens* ve *P. gessardii* ile benzerlik göstermiştir. GenBank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 40'da verilmiştir.

Tablo 40. P1 ve P60'ın *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P1	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886121	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586419	%99
	<i>P. meridiana</i>	FN554740	%99
P60	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886121	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586408	%99
	<i>P. gessardii</i>	AJ717438	%98

Bakteri izolatlarından P84 suşu sırasıyla, *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens* ve *P. meridiana* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 41'de verilmiştir.

Tablo 41. P84'ün *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P84	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM886121	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586419	%99
	<i>P. meridiana</i>	FN554740	%99

Bakteri izolatlarından P48 ve P66 stok nolu suşların ise dış grup olarak belirlenen P61'le aynı dal üzerinde yerleşmiş olduğu ve bu suşların sırasıyla, kendisiyle aynı dalda bulunmayan, *Pseudomonas sp.* ve *P. fluorescens* ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. P61 suşu ise *Acinetobacter sp.* ile benzerlik göstermektedir. GenBank'taki referans numaraları ve benzerlik oranları Tablo 42'de verilmiştir.

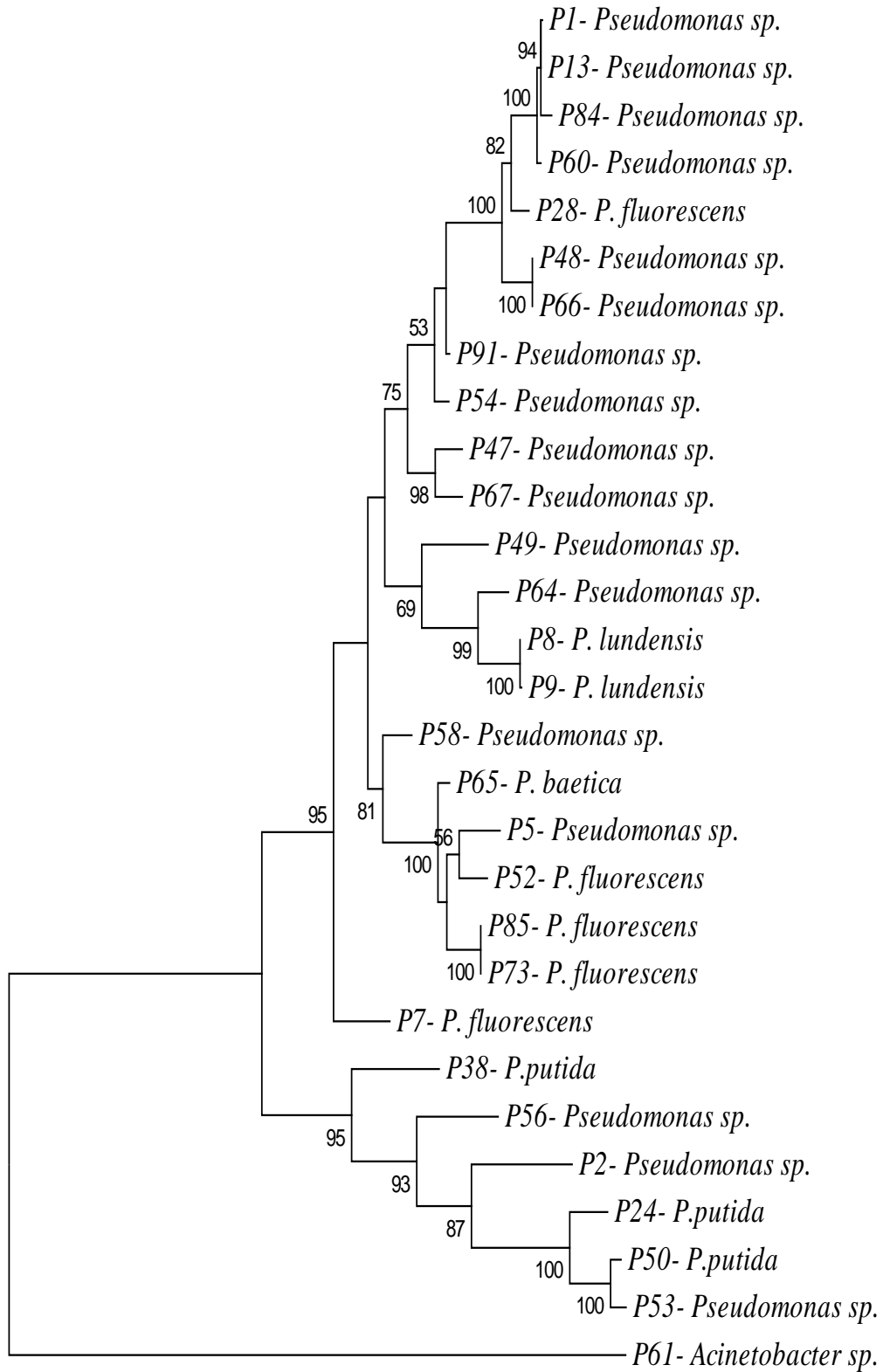
Tablo 42. P48, P66 ve P61'in *rpoB* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P48/P66	<i>Pseudomonas sp.</i>	HQ844522	%99
	<i>P. fluorescens</i>	AM181176	%97
P61	<i>Acinetobacter sp.</i>		

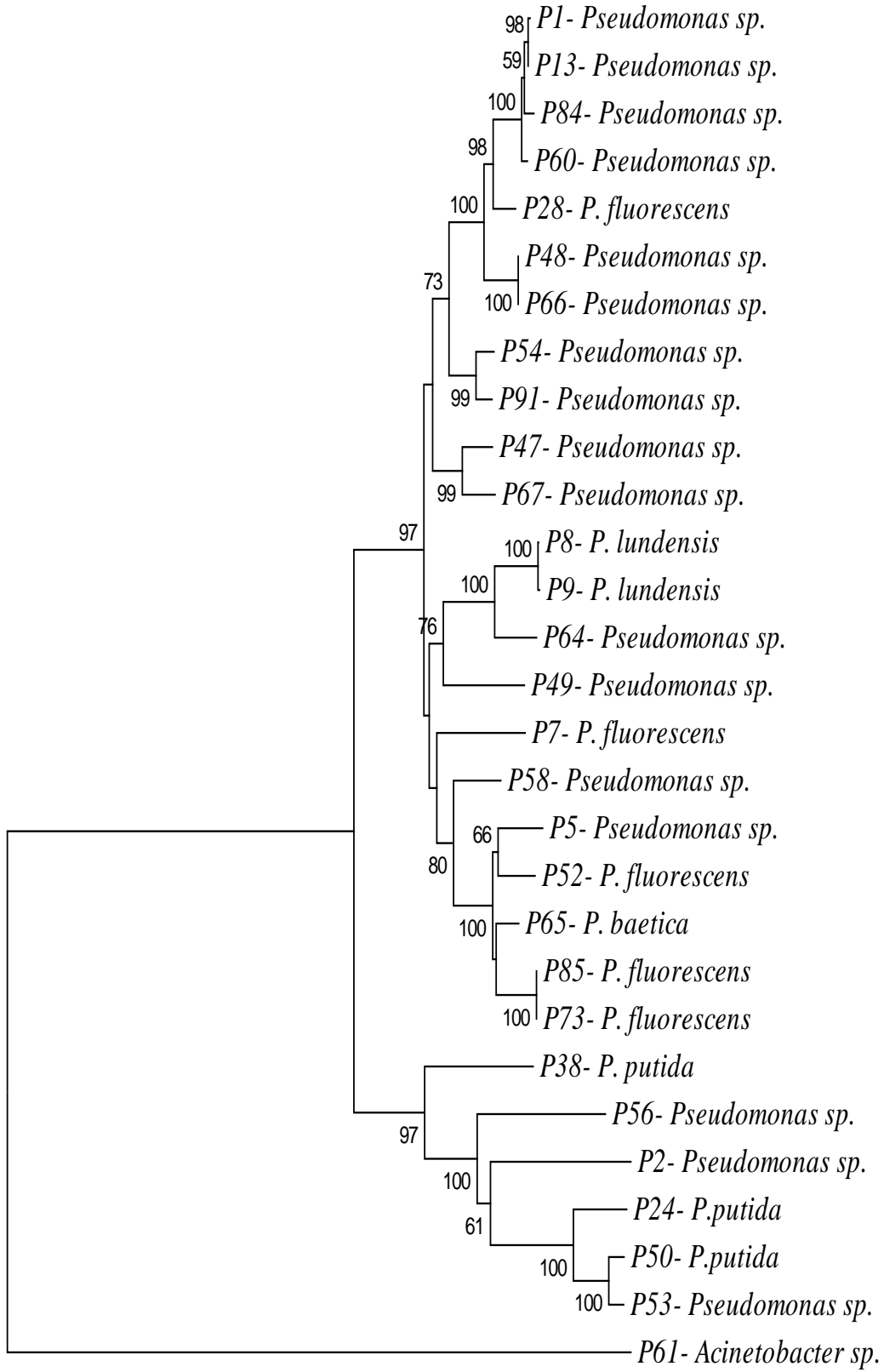
3.5. Moleküler İdentifikasyonda *rpoD* Primeri Kullanılarak Yapılan Gen Analizi ve Sonuçların Karşılaştırılması

Bakteri identifikasyonunda moleküler marker olarak kullanılan *rpoD* geninin Neighbour-Joining, Maksimum likelihood, Maksimum parsimony analizleriyle oluşturulan ağaçların arasında dikkate değer bir farklılık bulunmamıştır. Analizleri yapılan ağaçlar Şekil 17, 18 ve 19’da verilmiştir.

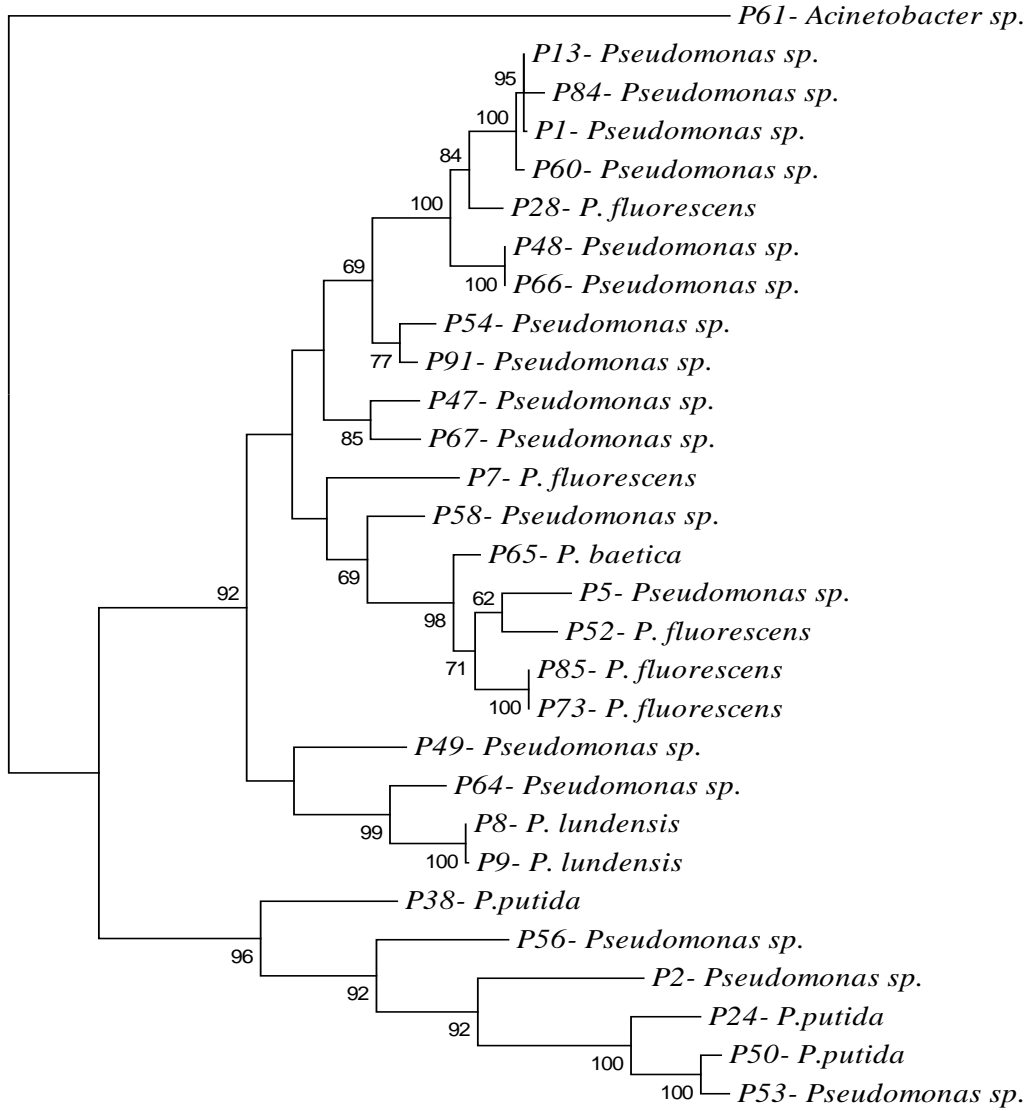
İzole edilen bakterilerinin moleküler tanısında kullanılan *rpoD* gen analizinin sonuçlarına dayanan filogenetik ağaç *Pseudomonas* suşlarını, *P. fluorescens* ve *P. putida* grubu olmak üzere iki gruba ayırmıştır. Bu gruplar jelatin testleriyle de birbirinden ayrılmış ve *P. fluorescens* grubu jelatin testlerinde pozitif reaksiyon gösterirken, *P. putida* grubu negatif reaksiyon göstermiştir. *P. fluorescens* grubunda P49 suşunun, *P. putida* grubunda ise P56 suşunun istisnai türler olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 17. Maksimum likelihood (ML) analizine göre *rpoD* filogenetik ağacı



Şekil 18. Neighbour-Joining (NJ) analizine göre *rpoD* filogenetik ağacı



Şekil 19. Maksimum Parsimony (MP) analizine göre *rpoD* filogenetik ağacı

Bakteri izolatları ile GenBank'taki benzer türlerin *rpoD* gen analizinden elde edilen filogenetik ağaç topolojisinde, *Pseudomonas fluorescens* grubu içerisinde P1, P13, P84 ve P60 suşlarının aynı dal üzerinde yerleştiği gözlemlenmiştir. İzolatlardan P84'ün sırasıyla iki adet *Pseudomonas sp.*'ye ve iki adet *P. fluorescens*'e benzediği görülmüştür. P1 ve P13 suşları aynı hat üzerinde olduğu gözlemlenmiş olup, sırasıyla *Pseudomonas sp.*'ye, *P. meridiana* ve *P. fluorescens*'e benzedikleri belirlenmiştir. Bakteri izolatlarından P60 suşunun ise *Pseudomonas sp.*'ye, *P. meridiana*'ya, *P. fluorescens*'e ve *P. putida*'ya benzediği tespit edilmiştir. Benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 43'de verilmiştir.

Tablo 43. P84, P1, P13 ve P60'ın *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P84	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE586473/HE586483	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586460/HE586450	%99
P1/P13	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE586483	%99
	<i>P. meridiana</i>	FN554485	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586450	%99
P60	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE586483	%99
	<i>P. meridiana</i>	FN554485	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586450	%99
	<i>P. putida</i>	AB039552	%99

Ağacın bu dört türden ayrılarak aynı dal üzerinde fakat başka bir hattında temsil edilen P28 suşu ise, sırasıyla *Pseudomonas brenneri* ve *P. fluorescens*'e benzediği gözlemlenmiştir. Benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 44'te verilmiştir.

Tablo 44. P28'in *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P28	<i>P. brenneri</i>	FN554457	%99
	<i>P. fluorescens</i>	AB039531	%99

Bakteri izolatlarından P48 ve P66 suşları aynı hat üzerinde yerleşmiş olup, sırasıyla iki adet *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 45'de verilmiştir.

Tablo 45. P48 ve P66'nın *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P48	<i>Pseudomonas sp.</i>	HG933966/HG933959	%99
P66	<i>Pseudomonas sp.</i>	HG933966/HG933965	%99

Bakteri izolatlarından P82, sırasıyla iki adet *Pseudomonas sp.* ve *P. fluorescens* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 46'da verilmiştir.

Tablo 46. P82'nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P82	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE586482/HG933950	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586442	%99

Bakteri izolatlarından P54 ve P91 suşları aynı dalda fakat farklı hatlar üzerinde yerleşmişlerdir. İzolatlardan P91 suşunun, herhangi bir GenBank örneğiyle aynı hatta yerleşmemesine rağmen, GenBank sonuçlarında kültüre edilemeyen (Uncultured bacterium) *Pseudomonas sp.* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İzolatlardan P54 suşunun ise, aynı şekilde kültür edilemeyen (Uncultured bacterium) *Pseudomonas sp.* ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 47'de verilmiştir.

Tablo 47. P54 ve P91'in *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P91	<i>Kültürü yapılamayan</i>	HF932337	%97
	<i>Pseudomonas sp.</i>		
P54	<i>Kültürü yapılamayan</i>	HF931577	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>		

Bakteri izolatlarından P58 suşu sırasıyla, iki tür *Pseudomonas mandelii* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. Benzerlik oranı ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 48'de verilmiştir.

Tablo 48. P58'in *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P58	<i>P. mandelii</i>	CP005960/FN554482	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ212451	%99

Bakteri izolatlarından P7 suşunun sırasıyla, *Pseudomonas sp.* ve *P. fluorescens* ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 49'da gösterilmiştir.

Tablo 49. P7'nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P7	<i>Pseudomonas sp.</i>	HG933907	%99
	<i>P. fluorescens</i>	HE586448	%99

Bakteri izolatlarından P85, P73, P65, P5 ve P52 suşları aynı dal üzerinde bulunmakta olup, izolatlardan P85 ile P73 suşları aynı hat üzerinde bulunmaktadır. P85 ve P73 sırasıyla, *Pseudomonas fluorescens* ve *P. baetica* ile benzerlik gösterirken, P65 *P. baetica* ile aynı hatta bulunmayan *P. moraviensis* ve *P. fluorescens* ile benzerlik göstermektedir. İzolatlardan P5 suşu ise, *Pseudomonas sp.* ve *P. marginalis* ile benzerlik gösterirken, P52 suşunun ise *P. fluorescens* ile başka bir hattaki *P. koreensis* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bakteri izolatlarına ait benzerlik oranları ve referans numaraları Tablo 50'de verilmiştir.

Tablo 50. P85, P73, P65, P5 ve P52'nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P85/P73	<i>P. fluorescens</i>	AB039533	%99
	<i>P. baetica</i>	FN678359	%95
P65	<i>P. baetica</i>	FN678359	%96
	<i>P. moraviensis</i>	FN554490	%95
	<i>P. fluorescens</i>	AB039533	%95
P5	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE603590	%97
	<i>P. marginalis</i>	AB039544	%96
P52	<i>P. fluorescens</i>	HE586443	%98
	<i>P. koreensis</i>	FN554476	%95

Bakteri izolatlarından P47 suşu sadece *Pseudomonas salomonii* ile benzerlik göstermiştir. Başka bir dalda bulunan P67 ise *P. simiae*, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiş olup, benzerlik oranı ve referans numaraları Tablo 51’de gösterilmiştir.

Tablo 51. P47 ve P67’nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P47	<i>P. salomonii</i>	KJ769212	%98
P67	<i>P. simiae</i>	FN554513	%99
	<i>P. putida</i>	HF545857	%99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	HG933912	%99

Bakteri izolatlarından P49 suşunun benzediği türler ise sırasıyla *Pseudomonas sp.* ve kendisinden çok uzak bir dalda bulunan *P. lini* olup, benzerlik oranı ve Genbank’taki referans numaraları Tablo 52’de verilmiştir.

Tablo 52. P49’un *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

StokNo	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P49	<i>Pseudomonas sp.</i>	LN624763	%90
	<i>P. lini</i>	FN554478	%88

Bakteri izolatlarından P8, P9 ve P64 stok numaralı suşlar aynı dal üzerinde bulunmakta olup, izolatlardan P8 ve P9 suşlarının aynı hat üzerinde olduğu gözlemlenmiş ve *Pseudomonas lundensis*’le benzedikleri gözlenmiştir. *rpoD* geninin sekans analizine göre, *P. fluorescens* grubunun son üyesi P64 suşunun benzediği türler sırasıyla, hiçbiri aynı dalda bulunmayan, *Pseudomonas sp.*, *P. deceptionensis*, *P. fragi* ve *P. psychophila* olarak belirlenmiştir. Benzerlik oranları ile Genbank’taki referans numaraları Tablo 53’te verilmiştir.

Tablo 53. P8, P9 ve P64'ün *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No.	Benzerlik Oranı
P8	<i>P. lundensis</i>	FN554479	%98
P9	<i>P. lundensis</i>	FN554479	%97
P64	<i>Pseudomonas sp.</i>	HE586467	%94
	<i>P. deceptionensis</i>	GU936596	%94
	<i>P. fragi</i>	FN554466	%94
	<i>P. psychrophila</i>	FN554506	%94

Pseudomonas putida grubu içerisinde ise P38 sırasıyla, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. Benzerlik oranları ve Genbank'taki referans numaraları Tablo 54'te gösterilmiştir.

Tablo 54. P38'in *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No	Benzerlik Oranı
P38	<i>P. putida</i>	KM365003	%98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	HG933969	%98

Bakteri izolatlarından P2 suşu sırasıyla, *Pseudomonas sp.* ve kendisiyle aynı dalda bulunmayan *P. plecoglossicida*'ya benzer bulunmuş, benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 55'te gösterilmiştir.

Tablo 55. P2'nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No	Benzerlik Oranı
P2	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM251447	%97
	<i>P. plecoglossicida</i>	FN554503	%84

Bakteri izolatlarından P24 suşu sadece *Pseudomonas putida* ile benzerlik göstermiştir. İzolatlardan P50 ve P53 ise aynı dal üzerinde yerleşmiş olup, *P. putida* grubunun son üyelerini temsil etmektedirler ve *P. putida* ile *P. monteilii*'ye benzerlik göstermektedirler. Benzerlik oranları ve GenBank'taki referans numaraları Tablo 56'da gösterilmiştir.

Tablo 56.P24, P53 ve P50'nin *rpoD* gen analizi sonucu benzediği türler ve oranları

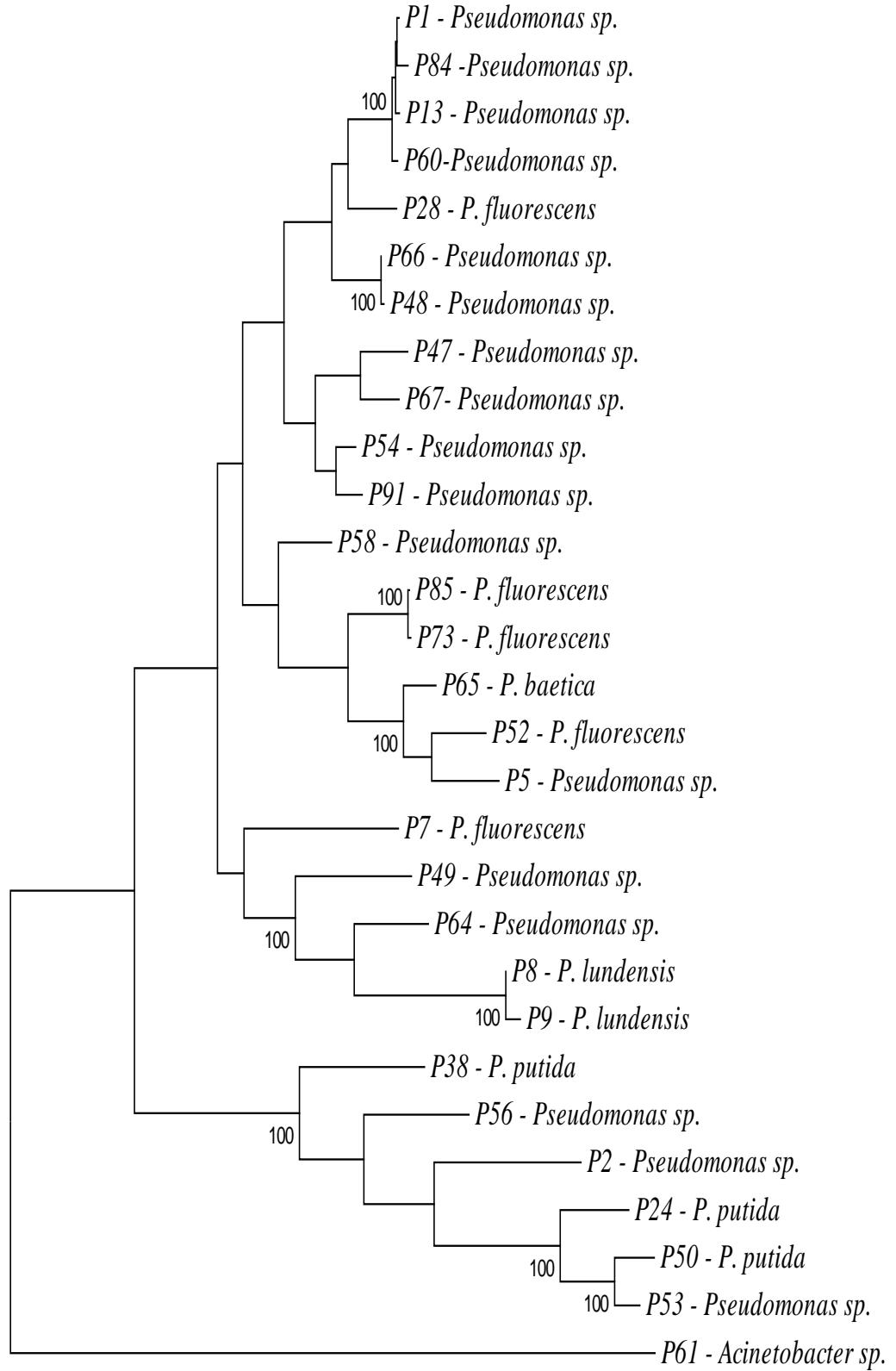
Stok No	GenBank Benzer Türler	GenBank No	Benzerlik Oranı
P24	<i>P. putida</i>	AB039592	%99
P50	<i>P. putida</i>	AB039595	%99
	<i>P. monteilii</i>	KJ676711	%97
P53	<i>P. putida</i>	CP003734	%99
	<i>P. monteilii</i>	KJ676711	%99

P61 ise dış grubu temsil etmekte olup, yapılan analizler sonucu *Acinetobacter sp.* ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

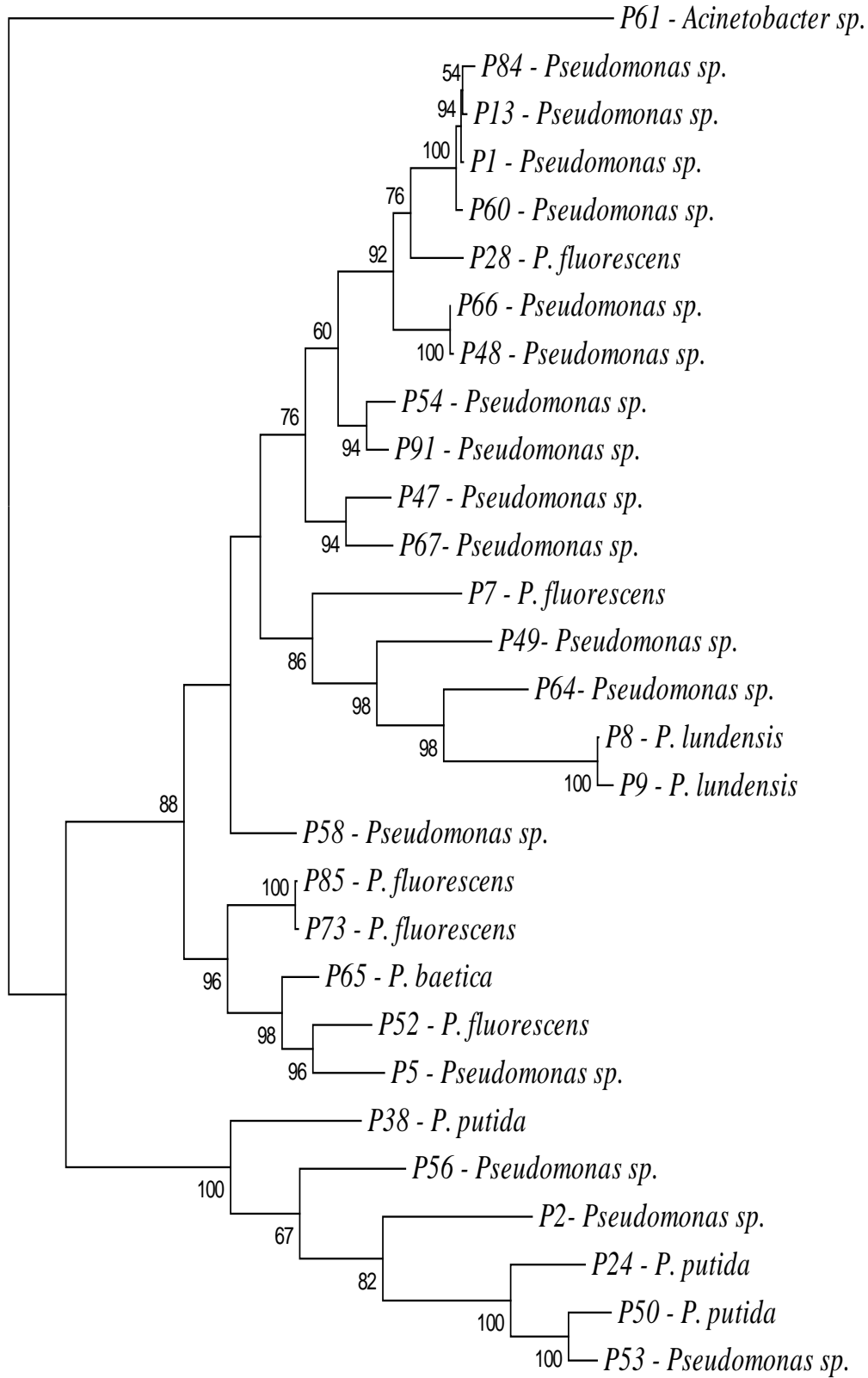
3.6. Birleştirilmiş Filogenetik Ağaçlar

Bu çalışmada kullanılan kısmi 16S rRNA, *rpoB* ve *rpoD* gen dizileri birleştirilerek gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucu elde edilen, Maksimum likelihood, Maksimum parsimony ve Neighbour-Joining birleşik ağaçları Şekil 20, 21 ve 22'de verilmiştir. Biyokimyasal testlerle en uyumlu filogenetik ağaç analizi Neighbour-Joining olduğu için türlerin tanımlanması bu ağaç üzerinden yapılmıştır.

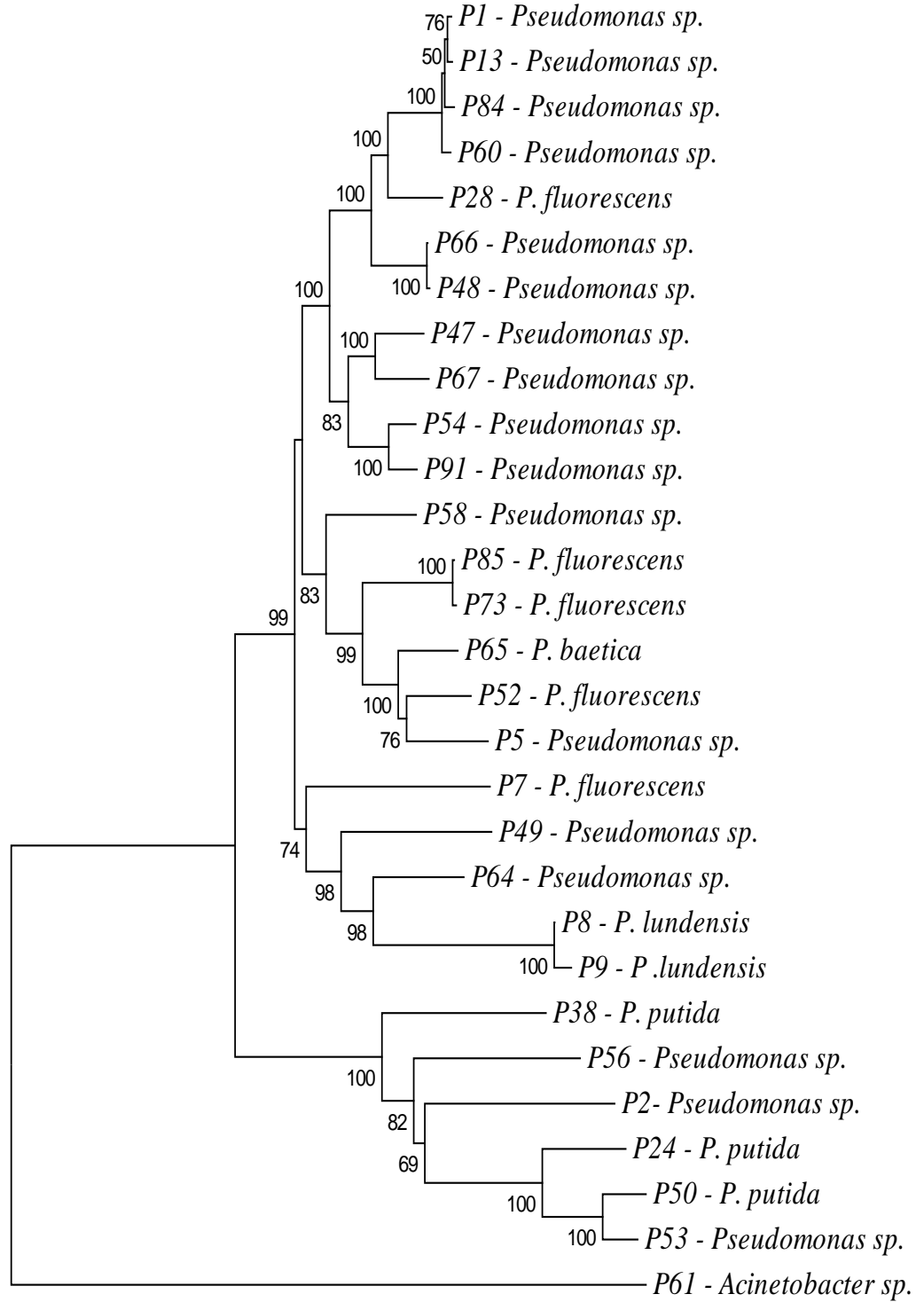
Yapılan analizler ve oluşturulan filogenetik ağaçlara bakıldığında, 16S rRNA, *rpoB* ve *rpoD* genlerinin Neighbour-Joining analiz metoduna göre, her bir suş için benzer bulunan *Pseudomonas* türleri ve suşların değişkenlik gösteren biyokimyasal testleri ise Tablo 57'de verilmiştir.



Şekil 20. Maksimum Likelihood (ML) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, *rpoB*, *rpoD*) filogenetik ağacı



Şekil 21. Maksimum Parsimony (MP) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, *rpoB*, *rpoD*) filogenetik ağacı



Şekil 22. Neighbour-Joining (NJ) analizine göre birleşik gen dizilerinin (16S rRNA, *rpoB*, *rpoD*) filogenetik ağacı

Tablo 57. Çoklu gen analizi sonucu benzer bulunan *Pseudomonas* türleri ve suşların biyokimyasal özellikleri

Stok No	16S rRNA/ <i>rpoB/rpoD</i>	Oksidaz	Jelatin	Nitrat	TSI	%7 tuz
P1	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	Laktoz	+
P2	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	-	+	Laktoz	+
P5	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	-	Laktoz	+
P7	<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	Laktoz	+
P8	<i>P. lundensis</i>	+	+	-	Laktoz	+
P9	<i>P. lundensis</i>	+	+	-	Laktoz	+
P13	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	-	+
P24	<i>P. putida</i>	+	-	-	Laktoz	+
P28	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	Laktoz	+
P38	<i>P. putida</i>	+	-	-	-	+
P47	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	-	-	+
P48	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	-	-	+
P49	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	-	-	-	+
P50	<i>P. putida</i>	+	-	-	-	+
P52	<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	-	+
P53	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	Z
P54	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	Laktoz	Z
P56	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	+	-	Z
P58	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	-	-	Z
P60	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	Laktoz	+
P64	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	-	Sukroz	+
P65	<i>P. baetica</i>	+	+	-	Sukroz	-
P66	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	-	-	+
P67	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	Sukroz	+
P73	<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	-	+
P84	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	+	-	+
P85	<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	-	+
P91	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	-	+

(+: pozitif; -: negatif; z: zayıf)

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Rize, Trabzon ve Gümüşhane illerindeki çiftliklerde, hastalık vakalarından izole edilen toplam 28 adet bakteri izolatından, *Pseudomonas* spp.'lerin genetik tanımlanması ve tanımlanan türler arasındaki genetik akrabalıkların çoklu gen analiz yöntemiyle (MLSA) ortaya koyulması amaçlanmaktadır. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde daha önceden patojen olarak rapor edilen bazı *Pseudomonas* türlerinin yanı sıra, bölgede gökkuşaağı alabalığında (*Onchorhynchus mykiss*) patojen olarak rapor edilmemiş *Pseudomonas* türlerine de rastlanmaktadır.

Örnekleme aşamasında, türlerin tespiti ve ayrımında fiziksel ve biyokimyasal testlerin sonuçlarından yararlanılmıştır. Bunun için çeşitli çiftliklerden alınan hasta balıklardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin, tür ayrımında öneme sahip olduğu ve özellikle jelatinaz enzimi kullanımının cins içi gruplara ayrımında kullanışlı olduğu tespit edilmiştir. Oksidaz testinin sonuçları ise, türlerin ayrımında önem arz etmektedir, Bergey's Manual Determinative bilinen *Pseudomonas* türlerinin çoğu oksidaz testi için pozitif reaksiyonlar vermektedir (Gundlapalli vd., 2004; Altinok vd., 2006; Carrion vd., 2011)

Pseudomonas'larla ilişkili daha önce yapılan cins-içi filogenetik çalışmalarda sadece 16S rRNA geni kullanılmıştır (Moore vd., 1996; Anzai vd., 2000). Bu genin cins ayrımında çok güçlü bir araç olduğunu belirten Mulet ve arkadaşları (2010), tür seviyesindeki ayırmda yetersiz kaldığını ve birbiriyle yakın olan türlerin ayrımında kısıtlı bir çeşitliliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Diğer referans genlerin filogenetik sınıflandırmada yüksek bir ayırım gücüne sahip olduğuna dair bir çok argüman geliştirilmiştir. Bunlardan biri ise 2000 yılında, Yamamoto vd. tarafından yapılan, *gyrB* ve *rpoD* genleriyle *Pseudomonas*'ların cins düzeyindeki ayrımının tartışması olmuştur. Yamamoto ve Harayama (1998), yaptıkları çalışmada da *gyrB* ve *rpoD*'nin, 16S rRNA'ya göre daha iyi yol göstericiler olduğunu bildirmişlerdir. Yamamoto ve arkadaşları 2000 yılında da yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas*ların sınıflandırılması, tanımlanması ve algılama sistemleri için *gyrB* ve/veya *rpoD* sekanslarının mikrobiyal

ekoloji ya da bakteriyolojinin diğerk alanlarında daha kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda Mulet ve arkadaşları, 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *rpoD*'nin ayırım gücünün *rpoB* geninden sekiz kat daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise bu verilerden yola çıkarak sınıflandırmada *rpoD* filogenetik ağacının verileri dikkate alınmış, daha güvenilir olduğu kabul edilmiş ve suşların tanımlanması bu ağaç üzerinden yapılmıştır. Aynı zamanda Ghyselink ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada, 16S rRNA gen filogenisinin ve *rpoD* gen filogenetiğinin birbirine çok benzer olduğu tespit edilmiş ve bu benzerlik bu çalışmada da teyit edilmiştir

Pseudomonas'ın filogenetik tanımlanmasında başarılı olmak oldukça önemli ve gereklidir, çünkü her yıl yeni *Pseudomonas* türleri tanımlanmaktadır. Özellikle Mulet ve arkadaşlarının 2009, 2010 ve 2013 yıllarında yaptıkları çalışmalara dayanılarak *rpoD*'nin *Pseudomonas* ayırımında daha güvenilir bir gen olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebepten dolayı, bu çalışmada, suşları tanımlamak için referans olarak *rpoD* filogenetik ağacı kullanılmıştır. Ağaçtaki benzerlik oranlarına göre, birkaç suşun, Doğu Karadeniz'de daha önce hastalık vakalarında rapor edilmeyen *Pseudomonas* türleri olduğu tespit edilmiştir, fakat ağaçtaki benzerliklerin bazıları biyokimyasal testlerden, bazıları ise Magdalena Mulet'in daha önceki çalışmalarında belirttiği *rpoD* geninin ayırım gücünden dolayı yetersiz bulunmaktadır.

Bulgular kısmında P1 ve P13 suşları *rpoD* genine göre üç tane türe (*Pseudomonas* sp., *P. meridiana*, *P. fluorescens*) benzer bulunmaktadır, fakat benzer bulunan *P. meridiana*'nın, Gundlapalli ve arkadaşlarının 2004 yılında Antarktika'da topraktan ve sudan izole ettikleri çeşitli *Pseudomonas* türleri arasında bulunduğu rapor edilmiştir. Çalışmaya göre, *P. meridiana*, bir buzul akıntısından izole edilmiş ve jelatini hidrolize etme yeteneği bulunmadığından dolayı, bu çalışmadaki P1 ve P13 suşlarına benzerliği bulunamamaktadır. Aynı sebepten dolayı P60 suşu da, *P. meridiana*'yla ayrılmış ve benzer bulunduğu *P. putida* ile daha önceki çalışmalarda (Mulet, 2013) ve Bergey's Manual Determinative Bacteriology'de geçen biyokimyasal özelliklerde jelatin hidroliz yeteneğinden yoksun olması sebebiyle ayrılmaktadır.

Bu çalışmada *rpoD* filogenetik ağacına göre, P28 suşu ise, *Pseudomonas fluorescens* ve *P. brenneri* ile benzer bulunmaktadır. *P. brenneri*, Baida ve arkadaşları tarafından 2001 yılında, doğal sulardan izole edilen bir bakteri olup, Baida'nın yaptığı çalışma referans alındığında, bu çalışmadaki P28 suşundan yüksek tuzlulukta (%5 ve %7) ürememesiyle ayrılmakta ve P28, *P. fluorescens* olarak tanımlanmaktadır.

Bir diğer tartışmalı suş P58 olup, filogenetik ağaçta *Pseudomonas mandelii* ve *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır. Verhille ve arkadaşlarının, 1999 yılında, doğal mineral sulardan izole ederek tanımladığı *P. mandelii*, bu çalışmadaki P58 suşu ile jelatin hidrolizasyon testinin negatif olmasıyla ayrılmakta ve *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır.

P65 suşu sırasıyla *Pseudomonas baetica*, *P. moraviensis* ve *P. fluorescens*'le benzerlik göstermektedir, fakat *rpoD*'nin ayırım yeteneğinden dolayı, Lopez ve arkadaşları tarafından 2012 yılında, dil balıklarından izole edilen *P. baetica* (%96) ile daha çok benzediği görülmektedir. Bunun dışında kendisine benzer olduğu görülen *P. moraviensis*'in, Kwon ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada, yüksek tuzluluk oranlarında ürememesi ve benzer bulunan *P. fluorescens* ile P65 suşundan uzak ağaçlarda bulunması, bu suşun *P. baetica* ile benzer olduğunu teyit etmektedir. P52 suşu için de, benzer buldukları *P. fluorescens* ve *P. koreensis* arasında aynı şekilde biyokimyasal testler referans alınarak seçim yapılmış ve P52 suşu *P. fluorescens* olarak tanımlanmaktadır.

Sadece, Gardan ve arkadaşları tarafından 2002 yılında, sarımsaklarda (*Allium sativum*) patojen olarak izole edilen *Pseudomonas salomonii* ile benzer bulunan P47 ise biyokimyasal testlerde bu bakteri ile ayrılmaktadır. Bu sebepten çalışmada, *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır. *P. simiae*, *P. putida* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik gösteren P67 ise, *P. putida*'nın jelatini hidrolizi edememesi (Mulet vd., 2013) ile bu türden ayrılmaktadır. Vela ve arkadaşlarının, 2006 yılında maymunlardaki klinik örneklerden izole ettiği *P. simiae* ise, sukrozu kullanmadığı için, P67 ile farklılık göstermektedir. Dolayısıyla P67 suşu da, bu çalışmada *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır.

Bakteri izolatlarından P8 ve P9 suşları, 1986 yılında Molin ve arkadaşları tarafından çürümüş ette bulunan, daha sonra çiğ süttten Marchand ve arkadaşları tarafından izole edilen ve 2002 yılında Tryfinopoulou ve arkadaşları tarafından deniz çipuralarından izole edilen *Pseudomonas lundensis* ile benzer bulunmaktadır.

Tartışmalı olabilecek bir diğer bakteri izolatu ise P64 suşudur. Bu suş kendisiyle aynı hatta bulunan hiçbir *Pseudomonas* türü ile benzerlik göstermemesine rağmen, Genbank sonuçlarına göre *P. fragi*, *Pseudomonas sp.*, *P. deceptionensis* ve *P. psychrophila* ile aynı oranlarda benzer bulunmaktadır. *P. deceptionensis*, Carrion ve arkadaşları tarafından 2011 yılında Antartik'te psikrofilik bakterilerle yapılan çalışmada izole edilmiş ve bu çalışma referans alındığında *P. deceptionensis* ve *P. psychrophila*'nın jelatin hidrolizasyonundan yoksun olduğu görülmektedir. *P. fragi* ise, Pereira ve Morgan tarafından 1957'de süt ürünlerinde görüldüğü ve 1986 yılında Molin ve arkadaşları tarafından etten izole edildiği dönemde, jelatin hidrolizasyonundan yoksun olduğu bildirilen, fakat 2007 yılında Franzetti ve Scarpelli'nin yaptığı çalışmada, iki farklı grup olarak incelenen ve jelatin hidrolizasyonu bir grupta negatifken diğerinde pozitif bulunan bir bakteri olmuştur. Aynı zamanda *P. fragi*, Carrion ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada, jelatin hidrolizasyonu pozitif olarak verilmiştir. Yapılan çalışmalar referans alınarak, P64 suşunun *P. fragi* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik gösterebileceği düşünülmekte ve *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır.

Pseudomonas putida grubunda bulunan P56, *Pseudomonas alkylphenolia* ve *Pseudomonas sp.* ile benzerlik göstermiştir. *P. alkylphenolia*, Jun Jeong tarafından 2003 yılında, yüksek alkilfenollerini karakterize edebilme yeteneğinden dolayı KL28 suşunun tanımlanması ile ortaya çıkmış, *P. veronii* ile yakın olduğu bilinen bir tür olarak bildirilmiştir. Mulet, 2012 yılında yaptığı çalışmada, *P. alkylphenolia*'yı nomenklatürde yerini almamasına rağmen çalışması için kullandığını bildirmiştir. Fakat bu çalışmada, alkilfenolü indirgeme özelliği denenmediğinden ve Jun Jeong çalışmasında *P. alkylphenolia*'nın biyokimyasal özelliklerini vermediğinden dolayı, P56 suşuyla karşılaştırma imkanı bulunamamıştır. Bu sebepten dolayı P56, çalışmada *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır.

Bakteri izolatlarından P2 ise *Pseudomonas sp.* ve *P. plecoglossicida* ile benzer bulunmuş ve *rpoD* geninin ayırım özelliğinden dolayı *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, *P. plecoglossicida*, Nishimori ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada, ayu balıklarından hastalık etkeni olarak izole edilmiş ve bu çalışmaya göre denitrifikasyon özelliğine sahip olmamasıyla P2 suşundan ayrılmaktadır.

Bakteri izolatlarından P50 ve P53, *Pseudomonas putida* ve *P. monteilii*'ye benzer olup, *rpoD*'nin ayırım gücünden dolayı *P. putida*'ya yakın bulunmaktadırlar. Ayrıca, *P. monteilii*, 1997 yılında Elomori ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alındığında, bu suşlar ile üreaz testinin sonuçlarında ayrılmaktadır. Bunun dışında bakteri izolatlarından P53 ise, oksidaz testinin negatif olması ile Bergey's Manual Determinative Bacteriology'de tanımlanan biyokimyasal testler referans alınarak, *P. putida*'dan ayrılmaktadır. Bütün bu kısıtlamalar dikkate alındığında, P50, *P. putida*; P53 ise *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmaktadır.

Çalışmadaki oksidaz negatif özelliği gösteren suşların ise, Altınok ve arkadaşlarının 2007 yılında gökkuşağı alabalığından (*Onchrohynchus mykiss*) izole ettiği, sitokrom oksidaz testlerinde negatif reaksiyon oluşturan, *Pseudomonas luteola* olabileceği düşünülmüştür. Fakat filogenetik ağaç topolojisinde oksidaz negatif özellik taşıyan suşların *P. luteola* türü ile benzerlik göstermemesi ve koloni yapılarındaki farklılıklar sebebiyle bu türe yakın bir suş bulunamamıştır. Bu sebeplerin dışında üreaz, denitrifikasyon ve eskülin testlerinin sonuçları da, bu suşlar ile *P. luteola* arasında ayırım olduğunu göstermektedir.

Bakteri izolatlarından *rpoD* geni referans alınarak çizilen filogenetik ağaca göre, bu çalışmada ağırlıklı olarak Doğu Karadeniz Bölgesi'nde daha önceden de rapor edilmiş *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*'ya ve birden fazla *Pseudomonas sp.* türüne rastlanmaktadır (Kayis, 2009 ; Altınok vd., 2006). Multi Lokus Sekans Analizi (MLSA) sonucunda tanımlanan *P. baetica* ilk defa 2012 yılında dil balıklarından izole edilmiş ve alabalıklar üzerinde yapılan bu çalışmada, alabalıklarda patojen olabileceği düşünülmektedir. *P. lundensis* ise Molin ve arkadaşlarının etten izole ettiği çalışma

sonrasında, Tryfinopoulou ve arkadaşlarının çürümüş deniz çipuralarının etinden izole edilmesiyle, bu bakterinin laboratuvara getirilen balıkların etlerindeki çürümeden kaynaklı izole edilebileceği ihtimalini akla getirmektedir. Fakat *P. lundensis*'i Genbank'ta temsil eden iki adet suşun bulunması ve bu suşların ikisinin de farklı çiftliklerden izole edilmesi, bu bakterinin de bir balık patojeni olabilme ihtimalini düşündürmektedir.

5. ÖNERİLER

Pseudomonas cinsine doğada yaygın olarak rastlanmaktadır. Bulunuşundan beri sayısız taksonomik araştırma yapılan bu cins, bu çalışmada gen dizin analizleri ve biyokimyasal testler yardımıyla incelenmiştir. Taksonomisinde daha başarılı olunabilmesi ve patojen olarak rapor edilebilmesi için katkı sağlayacak öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının tanımlanmasında daha kesin sonuçlar elde etmek için, önceki çalışmalarda da *Pseudomonas* için uygun görülen *gyrB* geni ile çalışılabilir.

2. Tanımlanması yapılamayan *Pseudomonas* türlerinin daha detaylı olarak biyokimyasal testlerinin çalışılması ve özellikle türlere özel biyokimyasal analizler yapılarak, tip suşları ile karşılaştırılması uygun olabilir.

3. Daha önceden Doğu Karadeniz Bölgesi'nde hastalık etkeni olarak izole edilmemiş *Pseudomonas baetica* ve *Pseudomonas lundensis*'in balıklarda patojenitesini anlamak amacıyla KOCH postulatı yapmak uygun olabilir.

KAYNAKLAR

- Altinok, I., Kayis, S. and Capkin, E., 2006.** *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261, 850-855.
- Altinok, I., Balta, F., Çapkin, E. and Kayis, S., 2007.** Disease of Rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 273, 393-397.
- Anzai, Y., Kudo, Y. and Oyaizu, H., 1997.** The Phylogeny of the Genera *Chryseomonas*, *Flavimonas* and *Pseudomonas* Supports Synonymy of These Three Genera. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (2), 249-251.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., 2000.** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1563-1589.
- Austin, B. and Austin, D., 2007.** *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. Praxis Publishing Ltd, 4th Edition, ISBN: 978-1-4020-6068-7, 552 s., 39-40, 132-136, 170-171, 277-279, 326-328.
- Baida, N., Yazourh, A., Singer, E. and Izard, D., 2001.** *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Research in Microbiology*, 152, 493-502.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20 (1), 51-63. DOI: 10.1051/agro:2000112.
- Carrion, O., Minana-Galbis, D., Montes, M.J. and Mercade, E., 2011.** *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 61, 2401-2405. DOI: 10.1099/ijs.0.024919-0.
- Cornelis, P., 2008.** *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Nortfolk, UK. ISBN: 978-1-904455-19-6, 244 s.
- CLSI, 2014.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230 s.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J.M. and Gardan, L., 2002.** *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 513-523. DOI: 10.1099/ijs.0.01966-0.

- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., 2006.** The Prokaryotes. Springer Science + Business Media, 3.Baskı, 6.Cilt, ISBN-10: 0-387-25496-X, 1165 s., B.Y.: Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Dos Santos, V.A.P.M., Pieper, D.H., Ramos, J.L. and Palleroni, N.J., 646-703.
- Elomari, M., Coroler, L., Verhille, S., Izard, D. and Leclerc, H., 1997.** *Pseudomonas monteilii* sp. nov., Isolated from Clinical Specimens. International Journal of Systematic Bacteriology, 47 (3), 846-852.
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Villani, F., 2007.** Similtaneous Detection Of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. Applied and Environmental Microbiology, 73 (7), 2354-2359.
- Ertimurtaş, D., 2012.** Sert Çekirdeklilerde Bakteriyel Kansere Neden Olan *Pseudomonas syringae* Pathovarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı.Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, Türkiye, 66 s.
- Franzetti, L. and Scarpellini, M., 2007.** Characterisation of *Pseudomonas* spp. Isolated from foods. Annals of Microbiology, 57 (1), 39-47.
- Felsenstein, J., 1987.** Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. Molecular Evolution, 26, 123-154. DOI: 10.1007/BF02111286.
- Gardan, L., Bella, P., Meyer, J.M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W. and Samson, R., 2002.** *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 2065-2074. DOI: 10.1099/ijms.0.02225-0.
- Ghyselinc, J., Coorevits, A., Van Landschoot, A., Samyn, E., Heylen, K. and De Vos, P., 2013.** An *rpoD* gene sequence based evaluation of cultured *Pseudomonas* diversity on different media. Microbiology, 159, 2097-2108. DOI: 10.1099/mic.0.068031-0.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium, 41, 95-98.
- Jeong, J.J., Kim, J.H., Kim, C-H., Hwang, I. and Lee, K., 2003.** 3- and 4-alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain KL28: genetic organization of the *lap* gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase. Microbiology, 149, 3265-3277. DOI: 10.1099/mic.0.26628-0.
- Kayış, Ş., 2009.** Trabzon ve Rize İllerinde Bulunan Bazı Alabalık İşletmelerinde Görülen Bakteriyel Hastalıkların Tespiti ve Bazı Etkenlerinin Çoklu PCR ile Teşhisi. DoktoraTezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 63 s.

- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M. and Schleifer K.L., 1996.** Recent Changes in the Classification of the Pseudomonads: an Overview. *Systematic Applied Microbiology*, 19, 465-477.
- Klug, S.W., Cummings, M.R., Spencer, C.A. and Palladino, M.A., 2000.** Concept of Genetics. Pearson Education Inc., 10th Edition, ISBN-13:978-0-321-72412-0, 725 s., 238-269.
- Kumar, S. and Gadagkar, S.R., 2000.** Efficiency of the Neighbor-Joining Method in Reconstructing Deep and Shallow Evolutionary Relationships in Large Phylogenies. *J. Mol. Evol.*, 51, 544-553. DOI: 10.1007/s002390010118.
- Kwon, S.W., Kim, J.S., Park, I.C., Yoon, S.H., Park, D.H., Lim, C.K. and Go, S.J., 2003.** *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 21-27. DOI: 10.1099/ijs.0.02326-0.
- Larget, B. and Simon, D., 1999.** Markovchain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 750-759. DOI:10.1214/105051600000000538.
- Lee, K., Lim, E.J., Kim, K.S., Huang, S-L., Veeranagouda, Y., Rehm, B.H.A., 2014.** An alginate-like exopolysaccharide biosynthesis gene cluster involved in biofilm aerial structure formation by *Pseudomonas alkylphenolia*.
- Li, Y., 2004.** How to Build a Phylogenetic Tree. Phycs498BIO Assignment2. Mary AnnLiebert, Inc., 195-212. DOI: 10.3133/of2007-1047.srp003
- Lopez, J.R., Dieguez, A.L., Doce, A., De la Rocca, E., De la Herran, R., Navas, J. I., Toranzo, A. E. and Romalde, J.L., 2012.** *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 874-882. DOI: 10.1099/ijs.0.030601-0.
- Lopez, J.R., Navas, J.I., Thanantong, N., De le Herran, R. and Sparagono, O.A.E., 2012.** Simultaneous identification of five marine fish pathogens belonging to the genera *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Photobacterium* and *Pseudomonas* by reverse line blot hybridization. *Aquaculture*, 324-325, 33-38.
- Mandel, M., 1966.** Deoxyribonucleic Acid Base Composition in the Genus *Pseudomonas*. *Journal of general microbiology*, 43, 273-292.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J. and Heyndrickx, M., 2009.** Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples.

Environmental Microbiology, 11 (2), 467–482. DOI: 0.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.

- Marmur, J., Rownd, R., Falkow, S., Baron, L.S., Schildkraut, C. and Doty, P., 1961.** The Nature Of IntergenericEpisomal Infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 47 (7), 972-979.
- Maxam, A. and Gilbert, W., 1977.** A new method of sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74, 560-564.
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N.J., 2002.** Siderophore Typing, a Powerful Tool for the Identification of Fluorescent and Nonfluorescent Pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology, 68 (6), 2745-2753. DOI: 10.1128/AEM.68.6.2745-2753.2002.
- Miller III, A., Scanlan, R.A., Lee, J.S. and Libbey, L.M., 1973.** Identification of the Volatile Compounds Produced in Sterile Fish Muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. Applied Microbiology, 25 (6), 952-955.
- Molin, G. and Terström, A., 1986.** Phenotypically Based Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas* Isolated from Spoiled Meat, Water and Soil. International Journal of Systematic Bacteriology, 36 (2), 257-274.
- Molin, G., Ternström, A. and Ursing, J., 1986.** *Pseudomonas lundensis*, a New Bacterial Species Isolated from Meat. International Journal of Systematic Bacteriology. 36 (2), 339-342.
- Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van De Peer, Y., De Wachter, R. and Timmis, K.N., 1996.** The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. Systematic Applied Microbiology, 19, 478-492.
- Mulet, M., Bennasar, A., Lolucat J. and Garcia-Valdes, E., 2009.** An *rpoD* - based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. Molecular and Cellular Probes, 23, 140-147.
- Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E., 2010.** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology, 12(6), 1513-1530. DOI: 10.1111/j.1462-2920-2010.02181.x.
- Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E., 2012.** Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 35, 145-149.

- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sanchez, D., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E., 2012.** Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 455-464.
- Mulet, M., Garcia-Valdes, E. and Lalucat, J., 2013.** Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas putida* biovar A and B strains. *Research in Microbiology*, 164, 351-359.
- Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. 1972.** Some Properties and Taxonomic Subdivisions of The Genus *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 10, 73-100. DOI: 10.1146/annurev.py.10.090172.000445.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973.** Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23 (4), 333-339.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F., 1993.** *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthornonas maltophilia* (Hugh, 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (3), 606-609.
- Palleroni, N.J., 2010.** The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1377-1383.
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H. and Velazquez, E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 1132-1147.
- Pereira, J.N. and Morgan, M.E., 1957.** Nutrition and Physiology of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology*, 74 (6), 710-713.
- Reddy, G.S.N., Matsumoto, G.I., Schumann, P., Stacebrandt, E. and Shivaji, S., 2004.** Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 713-719. DOI: 10.1099/ijs.0.02827-0.
- Rhodes, M.E., 1959.** The Characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General Microbiology*, 21, 221-265.
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Tebo, B.M., Tanaka, N., Frolova, G.M. and Mikhailov, V.V., 2008.** *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 706-710. DOI: 10.1099/ijs.0.65406-0.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5470.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 (3), 626.
- Scarpellini, M., Franzetti, L. and Galli, A., 2004.** Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 257-260.
- Spiers, A.J., Buckling, A. and Rainey, P.B., 2000.** The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 2345-2350.
- Stainer, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966.** The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology*, 43, 159-271.
- Tamira, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2013.** MEGA 6.05: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.05. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
- Tayeb, L.A., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P.A.D., 2005.** Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*, 156, 763-773.
- Tayeb, L.A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S. and Grimont, P.A.D., 2008.** Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159, 169-177.
- Terzi, E., 2013.** Alabalık işletmelerinden izole edilen bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 115s.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. and Nychas, G.J.E., 2002.** Characterization of *Pseudomonas* spp. Associated with Spoilage of Gilt-Head Sea Bream Stored under Various Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 1, 65-72. DOI: 10.1128/AEM.68.1.65-72.2002.
- Tvrzova, L., Schumann, P., Spröer, C., Sedlacek, I., Pacova, Z., Sedo, O., Zdrahal, Z., Steffen, M. and Lang, E., 2006.** *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2657-2663. DOI: 10.1099/ijs.0.63988-0.
- URL-1, 2015.** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonadaceae> (20 Ocak, 2015)

URL2, 2015.

<http://www.msxlabs.org/forum/biyoloji/245273filogenetik.html#ixzz2G4NeD9m>
Y (1 Şubat, 2015)

URL-3, 2015. <http://www.megasoftware.net/m.con.select.html> (1 Şubat, 2015)

URL-4, 2015. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> (10 Şubat, 2015)

URL-5, 2015. <http://paup.csit.fsu.edu> (10 Şubat, 2015)

URL-6, 2015. <http://www.megasoftware.net/m.con.select.html> (1 Şubat, 2015)

URL-7, 2015. <http://mybayes.csit.fsu.edu> (10 Şubat, 2015)

URL-8, 2015. <http://www.mikrobiyoloji.org> (1 Ocak, 2015)

Vela, A.I., Gutierrez, M.C., Falsen, E., Rollan, E., Simarro, I., Garcia, P., Dominguez, L., Ventosa, A. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 2006. *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2671-2676. DOI: 10.1099/ijs.0.64378-0.

Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D. and Leclerc, H., 1999. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural Mineral Waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. Systematic Application Microbiology, 22, 45-58.

Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. Microbiological Reviews, 51 (2), 221-271.

Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Planz, P., Gupta, R., Nealson, K.H. and Fox, G.E., 1984. The Phylogeny of Purple Bacteria: The Alpha Subdivision. Systematic and Applied Microbiology, 5, 315-326.

Yamamoto, S. and Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 813-819.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S., 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiology, 146, 2385-2394.

Yang, Z. and Rannala, B., 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method, Molecular Biology and Evolution, 14, 717-724.

Zumft, W. G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 4, 533-616.

Zyskind, J.W. and Bernstein, S.I., 1992. *Recombinant DNA laboratory manual*. San Diego, Academic Press, 187.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Zehra İPEK , 26/06/1987 tarihinde İstanbul'da doğdu . İlköğretimini ve ortaöğretimini Van/Merkez'de bulunan Zeve İlköğretim Okulu'nda ve Halime Hatun Kız Lisesi'nde, liseyi ise Açıköğretim Lisesi'nde tamamladı. 01/09/2004 tarihinde başladığı lisans eğitimini 01/07/2008 tarihinde 100. Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2010 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde, 2010 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.