

Farklı Metotlar Kullanılarak Elde Edilen Aynı Miktar Bakteriye DNA'lar Arasındaki Konsantrasyon Farklılıklarının Belirlenmesi

Şükrü ÖNALAN^{1*} Sümeyye ADALI² Abuzer TAŞ^{3*}

¹ Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Van, Türkiye

² Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye

³ Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi/Kırgızistan

 <https://orcid.org/0000-0003-0058-5232>,  <https://orcid.org/0000-0003-0452-4533>,  <https://orcid.org/0000-0002-7326-1768>

Received date: 30.09.2019

Accepted date: 04.11.2019

Atf yapmak için: Önalın, Ş., Adalı, S. & Taş, A. (2019). Farklı Metotlar Kullanılarak Elde Edilen Aynı Miktar Bakteriye DNA'lar Arasındaki Konsantrasyon Farklılıklarının Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(3), 422-427.

How to cite: Önalın, Ş., Adalı, S. & Taş, A. (2019). Determination of Concentration Differences Between Bacterial DNAs Obtained by Using Different Methods. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(3), 422-427.

Öz: Bu çalışmada kültüre alınmış olan *L. garvieae* izolatları Tryptic Soy Agar (TSA) ve miktarı (20ml) ile aynı çevresel şartlarda (7,4 pH, 21°C, 24 saat) inkübe edilmiştir. İzolatların identifikasyonları Real-Time PCR ile 16S rRNA gen bölgesine spesifik primer assay ile teyit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından 10ml'lik Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde gelişen izolatlar 600 nm dalga boyunda 1.0 Optik Dansite (OD)'ye eşitlenmiştir. Farklı gruplardan DNA izolasyonları; sıvı besiyerinde kaynatma, katı besiyerinde (Eşit OD) kaynatma, 2 farklı ticari kit kullanılarak manuel izolasyon ve otomatik izolasyon robotu olmak üzere toplam 5 farklı metotla gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların ve gerçekleştirilen Real-Time PZR işleminin ardından izolasyon robotu ile elde edilen sonuçlarda DNA kalitesinin en iyi olduğu, bunu takiben ticari kitler, sıvı besiyeri izolasyonu ve katı besiyeri izolasyonları olduğu görülmüştür. Real-Time PZR grafiğinde, çalışma grupları arasındaki tekerrürler içerisinde en büyük sapma sıvı besiyeri izolasyonu ve ticari kit izolasyonunda gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: DNA izolasyonu, spektrofotometrik ölçüm, Real-Time PZR, balık hastalıkları, *L. garvieae*.

Determination of Concentration Differences Between Bacterial DNAs Obtained by Using Different Methods

Abstract: In this study, cultured *L. garvieae* isolates were incubated with Tryptic soy agar (TSA) and amount (20ml) under the same environmental conditions (7.4 pH, 21°C, 24 hours). Identifications of the isolates were confirmed by Real-Time PCR and 16S rRNA gene region specific primer assay. After a 24 hour incubation period, the isolates produced in 10 ml Tryptic soy broth (TSB) were adjusted to 1.0 optical density (OD) density at 600 nm wavelength. Total DNAs were made by boiling in liquid media, boiling in solid medium (equal OD), manual isolation using 2 different commercial kits and automatic isolation robot. Following the Real-Time PCR with the DNAs obtained, the results obtained with the isolation robot were the best in DNA quality, followed by commercial kits, liquid medium isolation and solid medium isolation. In the Real-Time PCR graph, the largest deviation between the working groups was seen in the isolation of the liquid medium and the isolation of the commercial kit.

Keywords: DNA isolation, spectrophotometric measurement, Real-Time PCR, fish diseases, *L. garvieae*.

GİRİŞ

Su ürünleri ve diğer bakteriyel çalışmaların yürütüldüğü alanlarda DNA temelli moleküler düzeyde mikrobiyolojik çalışmalar sıklıkla gerçekleştirilmektedir (Balta & Dengiz Balta, 2017). Su ürünleri yetiştiriciliğinde en önemli kayıplar patojen ve non-patojen kaynaklı hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Bakteriyel hastalıklar içerisinde ise Türkiye’de en sık karşılaşılan hastalık etkenlerinin başında *Lactococcus garvieae* (Balta & Dengiz Balta, 2019) ve *Yersinia ruckeri* (Balta vd., 2016) gelmektedir. Bu çalışmaların temel basamağını, DNA izolasyonu oluşturmakta ve qPCR çalışmalarında DNA miktarları da önem arz etmektedir (Turner vd., 2004). Moleküler genetik araştırmaların ilk adımı DNA’nın saf olarak elde edilmesidir. DNA’nın elde edilmesi hücre zarının eritilmesi, proteinlerin parçalanarak ortamdan uzaklaştırılması ve DNA’nın çöktürülerek saflaştırılması gibi başlıca adımları içermektedir. Hücre zarı, lipit yapısında olduğundan hücre zarını eritmek için çeşitli anyonik deterjanlar kullanılmaktadır (Bozkaya, 2012). Nükleik asit dizi analizi teknolojilerinin de gelişmesi ile mikroorganizma çeşitliliği ve miktar ölçümleri başlanmıştır. Bu çalışmalarda en önemli basamaklar arasında numunenin uygun şartlarda toplanması, transferi, saklanması ve yine uygun koşullarda dizileme işlemlerine hazır hale getirilmesi gelmektedir (Koroğlu, 2017). DNA, hücrenin yönetici molekülüdür ve beslenme, solunum, üreme gibi canlılık faaliyetlerini yönetmektedir. DNA’nın yapısında bulunan genler ile kalıtsal bilgiler taşınmaktadır. DNA’nın izolasyonunda farklı metotların kullanılması izole edilen DNA’nın konsantrasyon, miktar ve kalitesinde de farklılıklar meydana getirmektedir. Öyle ki; Tüm fiksatifler DNA’ya bir miktar zarar vermektedir. Özellikle pikrik asit içeren fiksatifler ve yüksek konsantrasyonlu asitler DNA’yı parçalamaktadırlar. Formalinle ideal fiksasyon süresi 12-36 saattir (Ün vd., 2000). DNA izolasyonunda temel basamaklar; hücre parçalaması, proteinlerin uzaklaştırılması ve DNA’nın presipite edilmesidir (Güler, 2018). Bu çalışmada günümüzde su ürünleri alanındaki bakteriyel DNA izolasyonu amacıyla kullanılan metotlardan bazılarının aynı bakteri türü, miktarı ve yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonlar ile aynı miktar ve ortam özelliklerindeki besiyerlerinde gelişimleri tamamlandıktan sonra farklı yöntemlerin kıyaslanması amaçlanmıştır. Çalışma sonuçları kalite, konsantrasyon, zaman ve ekonomiklik dereceleri açısından değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 06.03.2018 tarih ve 27552122-604.01.02-E.17309 sayılı kararıyla alınan çalışma izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın laboratuvar

basamakları Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalık Laboratuvarı ile Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkez Laboratuvarı’nda yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan bakteriler kültüre alınmış *L. garvieae* izolatlarından temin edilmiştir. İzolatlar, TSA besiyerinde 21 °C’de 24 saat inkübasyon periyodu sonrası koloni morfolojisi yönünden incelenmişlerdir (Austin & Austin, 1999). İnkübasyon periyodu sonrasında gelişen bakterilerin moleküler identifikasyonları SyberGreen tabanlı Real-Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. *L. garvieae* spesifik primer assay ile gerçekleştirilen PCR protokolünde 95°C de 10 dk ön denatürasyonu takiben ve 94 °C 30 sn 60°C’de 20 sn ve 72°C’de 30 sn uzama işlemi 45 kez tekrarlanmıştır. PCR işlemi 72°C’de 7dk son uzama işlemi ile sonlandırılmıştır (Hoseinifar vd., 2017).

Bakterilerin Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi:

Çalışmada kullanılan izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla API Rapid ID 32 Strep (Biomérieux) kiti kullanılmıştır. McFarland 4 yoğunluğunda (Balta vd., 2010) süspansiyon medium içerisinde bakteri konsantrasyonu hazırlanmasının ardından kit içerisinde yer alan her bir reaktifte ait kuyulara 55 ul olarak dağıtılmıştır. 37 °C’de 18 saat inkübasyon periyodunun ardından API okuma tablosuna (Biomérieux) göre sonuçlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Balta, 2016).

Farklı yöntemler ile DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi: Kaynatma yöntemi (sıvı besiyeri); Sıvı besiyerinde ön-zenginleştirme örneğinden 1 ml alınarak mikrosantrifüj tüpünde 10 dk süreyle 14.000 rpm de santrifüj yapılmıştır. Hücrelerin çökmesiyle üstte kalan sıvı atılmıştır. Pelet üzerine 200 µl steril saf su eklenip karıştırılmıştır. Tüp 5 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilerek üstteki sıvı dikkatlice atılmıştır. Pelet’in üzerine 100 µl steril saf su eklenip karıştırılmıştır. Süspansiyon -20°C’de 10 dk dondurulup çözdürüldükten sonra 10 dk 100°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra hızlıca buz üzerine bekletilmiştir. 5 dk 14.000 rpm de santrifüj edilerek üstteki sıvı dikkatlice alınıp yeni bir tüpe aktarılmıştır (Ewers vd., 2004).

Kaynatma yöntemi (katı besiyeri); TSA besiyerinde gelişen taze kültür kolonilerden 1 öze dolusu alınıp 100 µl steril suda süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon -20°C’de 10 dk dondurulup çözdürüldükten sonra 100°C de 10 dk kaynatılıp 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Wang vd., 2009).

Ticari kitler kullanılarak manuel DNA izolasyonu; Çalışmada iki farklı kit kullanılarak aynı bakteri kolonisinden aynı yoğunluk miktarı ile genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen metot kısaca; 600nm’de 1.0 OD bakteri süspansiyonu ayarlanmıştır. 6500 rpm’de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Dipte kalan pelete 180 µl lysis buffer eklenip, süspansiyon edilmiş ve 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. 200 µl lysis solüsyonu ve 20 µl

Proteinaz K eklenip karıştırılmıştır. Ardından, 56 °C'de termomixer ile belirli aralıklarla karıştırılarak inkübe edilmiştir. 20 µl RNase A sülüsyonu eklenip oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. 400 µl %50'lik etanol eklenmiş ve vortexlenmiştir. DNA saflaştırma kolonu yerleştirilmiş olan toplama tüpünün içerisine lizat transfer edilmiştir. Spin kolon 7800 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. 500 µl yıkama tamponu I eklenip, 1 dk 10400 rpm'de santrifüj edilmiştir. 500 µl yıkama tamponu II eklenip 3 dk maksimum hızda (>15000 rpm) santrifüj edilmiştir. 100 µl elüsyon tamponu eklenip oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 10400 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir (Önalın & Arabacı, 2016).

Otomatik izolasyon robotu ile DNA izolasyonu; Farklı iki ticari kit kullanılarak otomatize DNA-RNA-Protein izolasyon robotu ile aynı miktar bakterilere ait DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Cihaz tam otomatik olarak bakteri pelletinden Elüsyon miktarları 100 µl olacak şekilde izolasyon gerçekleştirilmiştir (Önalın, 2019).

Yöntemler arası farklılıkların belirlenmesi: 5 farklı metot ile aynı miktar ve aynı şartlarda elde edilen, aynı elüsyon oranındaki DNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen sayısal veriler Graphpad yazılımında grafiksel olarak yorumlanmıştır. Sonuçlar ekonomiklik, zaman ve konsantrasyon açısından değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Mikrobiyolojik sonuçlar: Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatları TSA besiyerinde 21 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin ardından 0.1 mm çapında krem renkli düzgün kenarlı koloniler gözlenmiştir. İzolatların Gram pozitif, katalaz-oksidad negatif ve hareketsiz oldukları görülmüştür.

Biyokimyasal test sonuçları: API Rapid ID 32 Strep test sonuçlarında göre çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının %91 oranında *L. garvieae* benzerliği gözlenmiştir. API görüntüsü (Şekil 1) ve test sonuçları (Tablo 1) aşağıda verilmiştir.

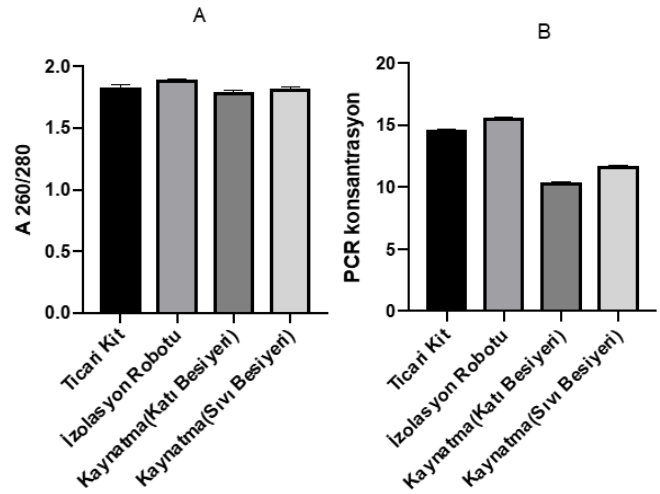


Şekil 1. *L. garvieae*'nin API Rapid 32 Strep inkübasyon sonrası görüntüsü.

Tablo 1. *L. garvieae* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç
ADH	+	SOR	-	BNAG	-	SAC	+
BGLU	+	LAC	+	GTA	-	LARA	-
BGAR	-	TRE	+	HIP	-	DARL	-
BGUR	-	RAF	-	GLY	-	MBDG	+
AGAL	-	VP	+	PUL	-	TAG	+
PAL	-	APPA	+	MAL	+	BMAN	-
RIB	-	BGAL	-	MEL	-	CDEX	+
MAN	+	PYRA	+	MLZ	-	URE	-

Spektrofotometrik ve qCt-PCR sonuçları: TSB besiyerinde gelişen izolatlar gruplandırılmak üzere 600nm'de 0.6 OD yoğunluğa eşitlenmiştir. Spektrofotometrede kör olarak TSB besiyeri kullanılmıştır. Çalışma grupları sırasıyla 1; Katı besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinden (600nm'de OD:06) kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu, 2; Sıvı besiyerinde gelişen bakterilerin (600nm'de OD:06) kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu, 3- 4; iki farklı ticari kit ile manuel DNA izolasyonu, 5; Otomatik izolasyon robotu kullanılarak DNA izolasyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'ların nanospektrofotometrik (Thermo) olarak 260/280nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri tüm örneklerde 1.8 ile 1.9 arasında olduğu görülmüştür. Real-Time PCR cihazı ile qctPCR değerleri kullanılarak elde edilen DNA yoğunlukları ise sırası ile izolasyon robotu, manuel kit, sıvı besiyeri ve katı besiyerinden izolasyon şeklinde gerçekleştirildiği gözlenmiştir (Şekil 2).



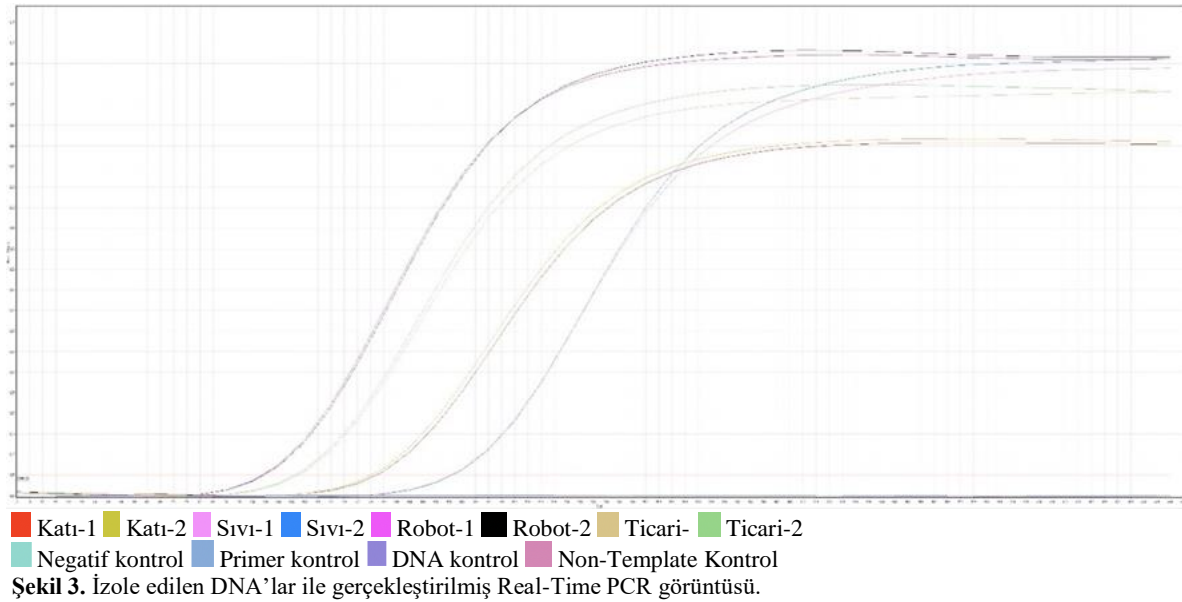
Şekil 2. Farklı metotlar ile izole edilen DNA'ların nanospektrofotometrik (A) ve PCR konsantrasyon (B) değerleri.

Real-Time PCR sonuçları: İzole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen Real-Time PCR grafiğinde izolasyon robotu ile elde edilen DNA'ların konsantrasyon fazlalığından kaynaklanan en erken qCt verdiği ve tekerrürlerin eşleniği olduğu görülmüştür. Bunu takiben, ticari kit izolasyonu ve sıvı katı besiyeri izolasyonları sonrası elde edilen sonuçlar takip ettiği gözlenmiştir. Tekerrürler arasında en büyük sapma değeri ise ticari kit ve sıvı besiyeri ile elde edilen PCR sonucundan elde edilmiştir. İzole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen PCR görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 3).

Real-Time PCR işlemi sonucunda elde edilen grafiğe göre tekerrür grupları ve farklı ticari kitler ile gerçekleştirilen tekerrür gruplarının sigmoidal eğrilerinin açılış farklarının anlamsız değerde olduğu (<0,01) görülmüştür. Real-Time PCR işlemi sonrasında izolasyon robotu ile elde edilen sonuçlarda DNA kalitesinin ve florasan ışımının en yüksek değerde olduğu, bunu takiben ticari kitler ile izolasyon, sıvı besiyeri izolasyonu ve katı besiyeri izolasyonları takip ettiği gözlenmiştir. Farklı ticari kitler ile

gerçekleştirilen izolasyonlar arasında anlamsız değerde konsantrasyon farklılıklarının olduğu (<0,02) görülmüştür. Real-Time PCR grafiğinde çalışma grupları arasındaki tekrürler içerisinde en büyük sapma sıvı besiyeri izolasyonu ve ticari kit izolasyonunda gözlenmiştir. Real-Time PCR amplikonları ile analiz

sonrası başlatılan curve analizi sonrasında standartlar arası medyan değeri (M), en küçük kopya değerine karşılık gelen Ct (B) ve Primer bağlanma kararlılığının (E) optimum düzeyde ve PCR grafiği ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.



Günümüzde DNA izolasyonu amacıyla bu çalışmada kullanılan metotlar dışında slika jel teknolojisi kullanan hazır DNA izolasyon kitlerinden de faydalanılmaktadır. Ancak bu tür yöntemler yüksek maliyetlidir. Ayrıca; DNA izolasyonu amacıyla genellikle fenol-kloroform yöntemi (Akyüz vd., 2008; Akyüz & Ertuğrul, 2008; Korkmaz-Ağaoğlu vd., 2010) ya da hazır DNA izolasyon kitlerinin (Özşensoy vd., 2008; Balcıoğlu vd., 2010; Budak-Yıldıran vd., 2010) kullanımı da bildirilmiştir. Bakteriye çalışmalarda DNA izolasyonu için kaynatma yöntemi de bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Balta & Yılmaz, 2019). DNA izolasyonunda küçük miktarlarda doymuş potasyum asetat çözeltisi de proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılarak proteinler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çözelti içerisindeki DNA, izopropanol ile presipite edilerek saflaştırılabildiği bildirilmiştir (Sambrook vd., 1989). Virüs dışı mikroorganizmalar için DNA izolasyonu hedeflendiğinde santrifüj işleminin de konsantrasyon yönünden önemli olduğu ve düşük hızda santrifüj (<21000) ve filtrasyon işlemlerinin çalışma için daha uygun olduğu bildirilmiştir (Thomas vd., 2015). Manyetik separasyon (beads-beating) yöntemi, sporlu bakteriler ve mikobakterilerde DNA izolasyonu için diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlerden daha verimli olduğu, manyetik separasyon yönteminde önce veya sonra 95°C'de bir ısıtma adımının lizis verimliliğini arttırdığı da bildirilmiştir (Koroğlu, 2017). Araştırmacılar aynı zamanda yarı otomatik sistemler ile gerçekleştirilen izolasyonların manuel gerçekleştirilen izolasyonlardan daha verimli olduğunu da bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, manuel

izolasyon metotlarının bazılarında ise Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ve aromatik asitler benzeri inhibitörlerin bulunması yalnızca izolasyon aşaması ile kalmayıp sekans analizi aşamasında sorun teşkil ettiği bildirilmektedir (Marchesi, 2014). Bu çalışmada ise inhibitörlerin kısmi önlenmesi ve metotların eşit değerlendirilmesi amacıyla kültüre edilmiş bakteriler üzerinde çalışma yürütülmüştür.

SONUÇ

Bu çalışmada *L. garvieae* izolatları aynı besiyerinde ve aynı çevresel şartlarda gelişimleri tamamlanmış ve bakterilerin identifikasyonları 16S rRNA gen bölgesi spesifik primer assayler ile teyit edildikten sonra aynı kolonilerden alınan bakteriler, sıvı besiyerinde tekrar ekilerek geliştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda sıvı besiyerindeki suşlar 600 nm dalga boyunda 1.0 optik dansiteye (OD) ayarlanmıştır. Aynı yoğunluğa sahip bakterilerden total genomik DNA izolasyonları sıvı besiyerinden kaynatma yöntemi, katı besiyerinden kaynatma yöntemi, ticari kit kullanılarak manuel izolasyon ve otomatize izolasyon robotu ile izolasyon olmak üzere 5 farklı metotla gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, DNA konsantrasyonları, Real-Time qPCR sonucunda elde edilen cT değerlerinin normalizasyonu ve nanospektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiş ve yorumlanmıştır. Elde edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen Real-Time PCR işlemi sonrasında izolasyon robotu ile elde edilen sonuçlarda DNA kalitesinin en iyi seviyede olduğu,

bunu takiben ticari kit ile izolasyon, sıvı besiyeri izolasyonu ve katı besiyeri izolasyonları takip ettiği görülmüştür. Real-Time PCR grafiğinde çalışma grupları arasındaki tekerrürler içerisinde en büyük sapma sıvı besiyeri izolasyonu ve ticari kit izolasyonunda görülmüştür. İzolasyon metotları için harcanan zaman açısından en kısa sürede katı ve sıvı besiyeri izolasyonlarını takiben izolasyon robotu ve ticari kit ile izolasyon yer almıştır. Ekonomik yönden en uygun metotların sıvı ve katı besiyeri izolasyonları bunları takiben izolasyon robotu ve ticari kit geldiği görülmüştür. Kullanılan metotlar arasında ekonomiklik, zaman ve kalite açısından kıyaslamalar yapıldığında çalışma kalitesi ve verimliliği yönünden izolasyon robotu ile elde edilen sonuçların daha güvenilir ve verimli olduğu kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2018-6886 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akyüz, B., Bayram, D., Ertuğrul, O. & İşcan, K.M. (2008).** Türkiye’de yetiştirilen holsteyn ve bazı yerli sığır ırklarında citrullinemia allelinin belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **5**(1), 17-20.
- Akyüz, B. & Ertuğrul, O. (2008).** Türkiye’de Holsteyn ve yerli sığırlarda üridin monofosfat sentez eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **55**, 57-60.
- Austin, B. & Austin, D.A. (1999).** *Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 3rd (Revised) Edition.* Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Balcıoğlu, M.S., Sahin, E., Karabağ, K., Karlı, T. & Alkan, S. (2010).** Türkiye yağlı kuyruklu koyun ırklarında DNA parmak izinin RAPD-PCR yöntemi kullanılarak saptanması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, **16**, 55-61.
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. & Ozgumus. O.B. (2010).** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **30**(6), 211-219.
- Balta, F. (2016).** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25**(10), 4393-4400.
- Balta, F., Dengiz Balta, Z. Özgümüş, O.B. & Çağırğan, H. (2016).** Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*’nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*. **1**(3), 72-76.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2017).** Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **64**, 321-328.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2019).** The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*. **4**(1), 27-33.
- Balta, F. & Yılmaz, H. (2019).** Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* Enfeksiyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. **4**(2), 104-110.
- Bozkaya, F. (2012).** DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1**(2), 92-96.
- Budak-Yıldırım, F.A., Yıldız, K., Çakır, Ş. & Gazyağcı, A.N. (2010).** Kırıkkale bölgesinde koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakteri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16**(2), 245-250.
- Ewers, C., Janßen, T., Kiebling, S., Philipp, H.C. & Wieler, L.H. (2004).** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, **104**(1-2), 91-101.
- Güler, G. (2018).** DNA-RNA-izolasyonu. www.fencebilim.com/biyoloji/biyoloji-sunulari/DNA-RNA-izolasyonu.pdf. Erişim tarihi: 05.03.2018. Saat: 12:26.
- Hoseinifar, S.H., Dadar, M., Khalili, M., Cerezuela, R. & Esteban, M.Á. (2017).** Effect of dietary supplementation of palm fruit extracts on the transcriptomes of growth, antioxidant enzyme and immune-related genes in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture Research*, **48**(7), 3684-3692.
- Korkmaz-Ağaoğlu, Ö., Çınar-Kul, B., Akyüz, B., Özkan, E., Ertuğrul, O., Erol, H. (2010).** Keçi türünde mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesinde farklı çoklu-PZR (Multipleks PCR) sistemleri. *Vet Hekim Der Derg*, **81**, 21-27.

- Köroğlu, M. (2017).** Sampling and DNA Isolation in Microbiota Studies. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, **1**, 50-55.
- Marchesi, J.R. (2014).** *The Human Microbiota and Microbiome. Advances in Molecular and Cellular Microbiology.* CAB International, Cardiff University, Cardiff.
- Önalın, Ş. & Arabacı, M. (2016).** Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşuğı alabalığı çifiliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Önalın, Ş. (2019).** Expression differences of stress and immunity genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) with different bacterial fish diseases. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, IJA_71.2019.1597, p:10.
- Özşensoy, Y., Kurar, E., Bulut, Z. & Nizamlioğlu, M. (2008).** Mikrosatellit DNA markörleri kullanılarak atlarda ebeveyn tayini: Bir vaka takdimi. *Vet Bil Derg*, **24**, 87-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Thomas, V., Clark, J. & Doré, J. (2015).** Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology*. **10**(9):1485-1504.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. & Konuk, M. (2004).** *Moleküler biyoloji.* Nobel Yayın evi. ISBN: 975-591-596-6.
- Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F. & Schellander, K. (2000).** Mikrosatellitler ve kullanım alanları. *Hayvansal üretim*, **41**(1).
- Wang, C.Y., Hsieh, Y.R., Ng, C.C., Chan, H., Lin, H.T., Tzeng, W.S. & Shyu, Y.T. (2009).** Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio sp.* strain NTU- 05. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**(6-7), 373-379.

***Corresponding author's:**

Abuzer TAŞ

Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi/Kırgızistan.

✉E-mail : , abuzertas@yyu.edu.tr

ORCID : <https://orcid.org/0000-0002-7326-1768>

Telefon : ++996 700 125 544