KIRMIZI TOPRAK SOLUCANI *Eisenia fetida*'DAN ELDE EDİLEN SÖLOM SIVISININ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime KOCAKURT

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIRMIZI TOPRAK SOLUCANI *Eisenia fetida*'DAN ELDE EDİLEN SÖLOM SIVISININ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime KOCAKURT
501903009

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2022

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi
KIRMIZI TOPRAK SOLUCANI *Eisenia fetida* 'DAN ELDE EDİLEN SÖLOM SIVISININ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime KOCAKURT

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji/Moleküler Biyoloji/ Fen-Edebiyat Fakültesi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Toprak solucanları toprak ekosistemi için kritik öneme sahiptir ve toprak yapısını, üretimini geliştirdiğinden ekosistem mühendisleri olarak adlandırılırlar. Kırmızı Kaliforniya solucanı adıyla da bilinen *Eisenia fetida* kültür solucanları hızlı çoğalmaları, üretimlerinin kolay olmasından dolayı, solucan gübresi üretimi için en uygun solucanlardır. Salgıladıkları sölomik sıvı fizyolojik aktivitelerine yardımcı olmaktadır. Stres sırasında serbest bıraktıkları bu sıvı, toprak sağlığı ve ekotoksisite üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada, *E. fetida'*dan elde edilen sölomik sıvının bazı biyolojik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla sölomik sıvıdan izole edilen bakteriler arasından 3 bakteri seçilmiş, 16S rRNA dizilimine göre tanımlanmış ve bunlardan 2 tanesi *Bacillus cereus* ve 1 tanesi *Bacillus thuringiensis* ile benzerlik göstermiştir. Sölomik sıvıdaki enzimatik aktiviteler kontrol edildiğinde lipaz, selülaz, amilaz, proteaz, fitaz ve arilsülfataz aktivitelerinin varlığı tespit edilmiştir. Sölomik sıvının antibakteriyel etkileri *E. feacalis, E. coli, S. epidermidis, S. aureus, K. pneumonia, S. typhimurium, Y. enterocolitica* ve *P. Aeruginosa*'ya karşı araştırılmıştır. Sonuçlara göre sölom bakterileri üzerinde inhibitör etkiler göstermiştir. Buna ek olarak, İnce Tabaka Kromatografisi sonuçları ise sölomik sıvıda glikoz ve maltoz varlığını göstermiştir. Sıvının protein paterni, 17-46 kDa aralığında beş açık protein bandı göstermiştir. Bu çalışma ile sölomik sıvının bazı biyolojik özellikleri ortaya konulmuş olup, bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, sölomik sıvı, solucan, *E. fetida*, enzim aktivitesi, protein profili.

ABSTRACT

Master Thesis
INVESTIGATION OF THE PROPERTIES OF THE COELOM FLUID OBTAINED FROM THE RED EARTH WORM *Eisenia fetida*

Halime KOCAKURT

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology/Molecular Biology/Faculty of Arts and Sciences

Advisor: Prof. Dr. Elif DEMIRKAN

Earthworms are critical to the soil ecosystem and are called ecosystem engineers because they improve soil structure and production. *Eisenia fetida* culture worms, also known as the red California worm, are the most suitable worms for vermicompost production because of their rapid reproduction and easy production. The coelomic fluid they secrete help their physiological activities. This liquid, which they release during stress, also has a significant effect on soil health and ecotoxicity. In this study, some biological properties of coelomic fluid obtained from *E. fetida* were investigated. For this purpose, 3 bacteria were selected among the bacteria isolated from coelomic fluid, they were identified based on the 16S rRNA sequence and 2 of these were similar to *Bacillus cereus* and 1 to *Bacillus thuringiensis*. When the enzymatic activities in the coelomic fluid were controlled, the presence of lipase, cellulase, amylase, protease, phytase and arylsulfatase activities were detected. The antibacterial effects of the coelomic fluid was investigated against *E. feacalis*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *K. pneumonie*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* and *P. Aeruginosa*. According to the results, it showed inhibitory effects on test bacteria. Additionally, The Thin Layer Chromatography results showed the presence of glucose and maltose in the coelomic fluid. Protein pattern of fluid showed five clear protein bands in the range of 17–46 kDa. With this study, some biological properties of coelomic fluid have been revealed, and will shed light on future studies.

Key words: Antimicrobial activity, coelomic fluid, earthworm, *E. fetida*, enzyme activity, protein profile.

TEŞEKKÜR METNİ

Çalışma sürecinde her türlü yol gösterici olan, güler yüzü ve sabrıyla beni cesaretlendiren, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan beraber çalışmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Elif Demirkan'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca gerek labaratuvar gerekse ders içi çalışmalarımda yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Tuba Sevgi Avcı'ya ve Dr. Aynur Aybey'e teşekkür ederim.

Çalışmakta olduğum Solitera Kompost Ekolojik Ürünler Gıda Tarım Hayv. San. Tic. Ltd. Şti.nde çalışma saatlerime esneklik sağlayıp yüksek lisans çalışmamı destekleyip yanımda oldukları için Sn. Ömer Kavuncuoğlu'na, Sn. Gizem Bayraktar ve Sn. Cem Bayraktar'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararların hep arkasında duran, eğitim hayatımda da desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR METNİ vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Toprak Solucanları Hakkında Genel Bilgiler 4
2.2. Solucanların Sınıflandırılması 9
2.2.1. Ekolojik gruplara göre solucanların sınıflandırılması 11
2.2.2. Beslenme davranışlarına göre solucanların sınıflandırılması 14
2.3. Sölom, Sölom Sıvısı Ve Sölom Sıvısının Ekstraksiyonu 14
2.3.1. Solucanlardan sölomik sıvının ekstraksiyonu 17
2.4. Toprak Solucanlarının Biyoteknolojik Potansiyeli 18
2.5. *E. fetida* 22
3. MATERYAL VE YÖNTEM 25
3.1. Materyal 25
3.2. Yöntem 25
3.2.1. Solucan Üretim Ortamı 25
3.2.2. Solucandan sölom sıvısının elde edilmesi 26
3.2.3. Sölom sıvısından bakterilerin izolasyonu ve 16S rRNA mikrobiyal adlandırılması (filogenetik analiz) 26
3.2.4. Bakterilerin Gram ve Spor boyaması 27
3.2.5. Sölom sıvısında bazı enzimlerin aktivitesinin ölçülmesi 28
3.3. Sölom Sıvısında Protein ve Glukoz Tayini 35
3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Karbohidrat Tayin 36
3.5. SDS-PAGE (Sodyum-Dodesil-Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Profilinin Ortaya Çıkarılması 37
3.5.1. SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması%30 Akrilamid 37
3.5.2.SDS-PAGE yönteminde kullanılan jelin hazırlanması ve elektroforez işlemi 39
3.6.Sölom Sıvısının Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti 40

4. BULGULAR 42
4.1. Sölom sıvısındaki bakterilerin 16S rRNA mikrobiyal adlandırılması (Filogenetik Analiz) 42
4.2. Bakterilerin Gram boyama ve Spor boyaması 47
4.3. Sölom Sıvısında Bazı Enzimlerin Aktivitesinin Ölçülmesi 48
4.4.Sölom Sıvısında Protein ve Glukoz Tayini……...49
4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Karbohidrat çeşidinin tayini……...49
4.6. SDS-PAGE (Sodyum-Dodesil-Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Profilinin Ortaya Çıkarılması)..... 49
4.7. Sölom Sıvısının Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti 52
5. TARTISMA VE SONUÇ 53
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ……69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
%	Yüzde Orantı
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
g	Gram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
OD	Optik Dansite
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
M	Molar
mM	Milimolar
rpm	Revolutions Per Minute
sp.	Tür
CF	Sölomik sıvı
CFU	Colony-forming unit
KI	Potasyum İyodür
I	İyot
NaOH	Soydum Hidroksit
NaCO3	Sodyum Karbonat
HCI	Hidroklorik
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen Fosfat
$CaCl^2$	Kalsiyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Toprak solucanının genel görünüşü…….	6
Şekil 2.2.	Solucanın morfolojik yapısı ve vücut anatomisi……..…	6
Şekil 2.3.	Ekolojik gruplara ve beslenme davranış gruplarına göre solucanların sınıflandırılması……	10
Şekil 2.4.	Solucanların topraktaki yerleşimi……	13
Şekil 2.5.	Sölom'un vucut içindeki konumu…….……	15
Şekil 2.6.	Sölomik sıvı…….	16
Şekil 2.7.	Küresel solucan yetiştiriciliği pazarı…….	21
Şekil 3.1.	Üretim yeri……	25
Şekil 3.2.	Tirozin standart grafiği……..……	29
Şekil 3.3.	Glukoz standart grafiği……	32
Şekil 3.4.	İnorganik fosfat standart grafiği	34
Şekil 3.5.	Protein standart grafiği ……..	36
Şekil 4.1.	CF'de bakteri yükü (A), bakterilerin 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı (B)…….	42
Şekil 4.2.	Gram (+) bakterinin ışık mikroskobunda görünümü (10X100)	47
Şekil 4.3.	Gram (-) bakterinin ışık mikroskobunda görünümü (10X100)	47
Şekil 4.4.	Spor boyama (10X100)……	48
Şekil 4.5.	Ticari ve saf sölom sıvısında bulunan şekerlerin TCL ile gösterilmesi……...	49
Şekil 4.6.	Sölom sıvısında SDS-PAGE sonrası jelde protein bantlarının görünümü …….	50
Şekil 4.7.	Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri…….……..…….	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Ekolojinin temelinde solucanları sınıflandırmak için kullanılan genel özellikleri……... 13

Çizelge 3.1. Örnek Tamponun içerikleri……. 38

Çizelge 3.2. Yürütme Tamponun içerikleri…… 38

Çizelge 3.3. Yıkama Çözeltinin içerikleri…….. 38

Çizelge 3.4. Boyama Çözeltisi içerikleri……. 39

Çizelge 3.5. SDS-PAGE için kullanılan %10 ayırma jelin içerikleri…… 39

Çizelge 3.6. SDS-PAGE için kullanılan %4 yükleme jelin içerikleri…… 39

Çizelge 4.1. Bakteri 5 için 27F_C03 ve 907R_G03 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi…….. 43

Çizelge 4.2. Bakteri 6 için -27F_D03 ve 907R_H0 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi…….. 44

Çizelge 4.3. Bakteri 7 için 27F_E03 ve 907R_A04 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi…….. 45

Çizelge 4.4. Bakteri 8 için 27F_F03 ve 907R_B04 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi……... 46

Çizelge 4.5. *E.fetida*'nın sölom sıvısında tespit edilen enzimlerin aktivite değerleri ve bazı Bacillus sp.'den elde edilen enzim aktiviteler ile karşılaştırılması…… 48

Çizelge 4.6. CF'nin test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi…… 52

1. GİRİŞ

Toprak habitatının korunması, uzun vadeli kalite ve üretkenliği belirleyen biyolojik özelliklerinin sürdürülebilir yönetimine yönelik ilk adımdır. Toprak biyotasının toprak verimliliğine fayda sağladığı genel olarak kabul edilir, ancak toprakta yaşayan organizmalar ve toprak ekosisteminin işleyişi hakkında çok az şey bilinmektedir. Solucanların toprak verimliliğindeki rolü, Darwin'in (1809-1882) son bilimsel kitabını yayınladığı 1881'den beri bilinmektedir. O zamandan beri, tüm ekosistemlerin sürdürülebilir işlevine toprak organizmalarının katkısını vurgulamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Wardle, 2002). Solucanlar gibi toprak makrofaunası, biyojenik yapılarının (dökümler, topaklar, galeriler, vb.) birikmesiyle dolaylı olarak toprak ve toprak altı ortamını değiştirir, böylece toprağın fiziksel özelliklerini, besin döngüsünü ve bitki büyümesini etkilerler (Lal, 1999; Scheu, 2003) Toprak solucanları, nemli tropiklerin doğal ekosistemlerinin çoğunda toprak fauna topluluklarının önemli bir bileşenidir ve makrofauna biyokütlesinin büyük bir bölümünü oluşturur (Lavelle, Chauvel ve Fragoso, 1995).

Solucanlar, Annelida filumunun Oligochaeta sınıfına ait metamerik olarak parçalanmış organizmalardır. Solucanların boyu mm'den üçayak boyundan fazla uzunluğa kadar değişmektedir. Solucanların fiziksel yapısından dolayı bir türle diğer bir tür arasında çok az fark vardır, bir türün tarifi herhangi başka bir türle uyum sağlar. Solucan ilkel organizasyonlu olduğu halde, iyi gelişmiş dolaşım, sinir, boşaltım, sindirim, boşaltım, üreme ve kas sistemlerine sahiptir. En dikkate değer dış özelliği, vücudunu segmentasyonu veya halkalı olmasıdır. Solucandaki segmentasyon, hayvan vücudunun organlara bölünmesi ile ayni genel fonksiyonlara sahiptir, farklı segmentler farklı fonksiyonlar gerçekleştirir (Aydilek, 2005).

Solucanlar stres üzerinde keskin sarı bir sıvı salgılar. Bu sıvı periviseral boşluk olarak da bilinen sölom yani vücut duvarı ile beslenme kanalı arasındaki boşlukta bulunur ve bu sıvıya sölomik sıvı denilmektedir. Sölomik sıvıdaki sarı renk kısmen sıvı içinde bulunan ve kısmen de serbest bırakılan çok sayıda sölomosit ile ilişkili olan riboflavinden gelir; Bununla birlikte, sölomik sıvısı küçük moleküllü metabolitlerin karmaşık bir karışımını

içerir (Patil ve Biradar, 2017). Sölomik sıvı alkaliktir (Kauschke, Mohrig ve Cooper, 2007) ve mezotelyal kirpikler veya vücut duvarındaki kasların kasılmasıyla dolaşır. Hidrostatik bir iskelet görevi görür. Aynı zamanda bir dolaşım ortamı olarak işlev görür. Harekete yardımcı olur. Mezodermal doku sölomik sıvının kaynağıdır (Anonim, 2022a).

Toprak solucanı sölom sıvısı proteolitik, bakteriyostatik, hemaglütinik ve sitolitik aktiviteler içeren farklı biyolojik fonksiyonlar göstermektedir (Valembois, Roch, Lassegues ve Cassand, 1982; Kauschke ve Mohrig, 1987; Koenig ve diğerleri, 2003). Solucanlar, toprakta bulunan milyonlarca zararlı bakterinin oluşturacağı hastalıklardan korunma ve hareket kolaylığı sağlamak için ve yedikleri maddeyi sindirirken sölom sıvısı salgılarlar. Diğer yandan, sölomik sıvı solucanlar tarafından nemi korumak için solunum ve oyuk açma aktiviteleri gibi fizyolojik aktivitelerine yardımcı olmak için de salgılanır (Patil ve Biradar, 2017). Diğer yandan sölom sıvısı topraktaki patojenleri baskılayarak bitkileri korur ve dirençlerini artırır. Toprak solucanları çoğu toprak ekosistemi için kritik öneme sahiptir ve toprak yapısını, üretimini geliştirdiğinden ekosistem mühendisleri olarak adlandırılırlar (Blouin ve diğerleri, 2013). Kırmızı Kaliforniya solucanı adıyla da bilinen *E. fetida* kültür solucanlarının sölomik sıvısında bulunan biyoaktif bileşikler birçok bilim adamı tarafından büyük ilgi görmüştür, özellikle immün savunma, mikrobiyal gübre olarak (Cooper, Kauschke ve Cossarizza, 2002; Shen, 2010). Çünkü sıvının antimikrobiyal özellikleri, sıvıda bulunan bakteriler, enzim içerikleri önem taşımaktadır (Hua ve diğerleri, 2011). Araştırmacılar, sölomik sıvıdan izole edilmiş ve saflaştırılmış proteaz, amilaz, profenoloksidaz gibi birkaç enzimin aktivitelerini araştırmışlardır (Kauschke, Mohrig ve Cooper, 2007; Ramian, Arabi ve Hemmati, 2018). Sölomik sıvı, türe özgü olduğu bilinen aromatik metabolitler dahil olmak üzere küçük moleküllü metabolitlerin karmaşık bir karışımını içerir, ancak gerçek içerikleri tam olarak bilinmemektedir (Rochfort ve diğerleri, 2017).

Bu tez çalışmasında, Solitera Kompost Ekolojik Ürünler Gıda Tarım Hayvancılık Ltd. Şti (Bursa) firmasından temin edilen kırmızı toprak solucanı *E. fetida*'dan elde edilecek sölom sıvısının içerdiği bakterilerin 16S rRNA ile analizi ile tanımlanması, sölom sıvısının bazı enzimatik özellikleri, antimikrobiyal aktivitesi ve birkaç biyolojik analiz

yapılarak sölomun önemli özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla mikrobiyal gübre potansiyelide saptanmış olacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Toprak Solucanları Hakkında Genel Bilgiler

Solucanlar, Annelida filumunun Oligochaeta sınıfına ait metamerik olarak bölünmüş (annuli) tüp şeklinde organizmalardır. Solucan (Earthworm) adını, yerin içine doğru yuva yapması ve yemesi gerçeğinden alır. 20 milyon yıldan fazla bir süredir yeryüzündeler ve çoğu ılıman toprakta ve birçok tropik toprakta bulunur. Permafrost veya kalıcı kar ve buzun olduğu bölgelerde yaşamazlar. Tipik olarak 7 veya 8 santimetre uzunluğunda olduğu gibi, bazı üyelerinin yılan gibi 35 santimetre kadar uzadığı bilinmektedir (Gudeta ve diğerleri, 2020). Ergin bir solucan 115-200 segmentten oluşur, her segmente "metamer", bu segmentli yapı da "metamerizm" olarak adlandırılmıştır. Bu segmenter, solucanın hareket etmek ve yuva yapmak için kullandığı kıllar veya küçük kıllarla kaplıdır. Bu karasal solucanlar tipik olarak toprakta ve nemli yaprak çöpünde yaşar Solucanlar, silindirik bir gövdeye sahip kırmızımsı kahverengi bir renge sahiptir. Gövdesi uzundur ve ön bölge sivri, arka bölge ise yuvarlaktır. Vücudun dorsal yüzeyinde görülen koyu renkli orta dorsal kan damarı vardır. Vücudun karın yüzeyinde genital açıklıklar veya gözenekler bulunur (Anonim 2022a).

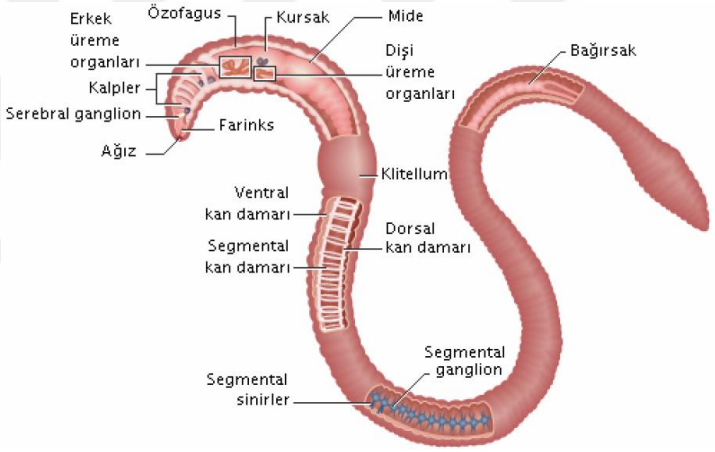
Birçok vücut organı bitişik segmentlerde tekrarlanır. Genellikle iki ila beş bitişik segmentte eşleştirilmiş kalpler ve iki bitişik segmentte eşleştirilmiş testisler vardır. Solucanın ön kısmı en özel organlara sahip segmentlere sahiptir. Farinks, ağzın arkasında ve öğütücü taşlık birlikte yaklaşık 10 segmenti kaplar. İnce bir yemek borusu (boğazı mideye bağlayan tüp) vardır ve ardından basit bağırsak yaklaşık 15 ila 20. segmentte başlar ve terminal anüse doğru ilerler. Sindirim sistemi, her biri belirli bir işlevi olan birçok bölgeye ayrılmıştır. Sindirim sistemi yutak, yemek borusu, bağırsak ve taşlıktan oluşur. Solucan kapalı bir dolaşım sistemine sahiptir. Bir solucan, kanı yalnızca damarlar yoluyla dolaştırır. Solucanların akciğerleri yoktur. Derilerinden nefes alırlar. Oksijen ve karbondioksit difüzyon yoluyla solucanın derisinden geçer (Anonim, 2022b). Solucanların genel görünüşü ve morfolojik yapısı aşağıda Şekil 2.1 ve Şekil 2.2' de verilmiştir.

Solucanlar, çevrelerinde her zaman patojen mikroorganizmaların istilasıyla karşı karşıya olmalarına rağmen, evrimin ilk aşamalarından beri savunma sistemlerinin yardımıyla yaşamaktadırlar (Engelmann, Kiss, Csöngei, Cooper ve Németh, 2004). Uzun yıllar yapılan çalışmalar solucanların hücresel ve hümoral bağışıklık mekanizmalarına sahip olduğunu göstermiştir (Bilej ve diğerleri, 2001; Field, Kurtz, Cooper ve Michiels, 2004). Solucan bağışıklık sistemi, sölomosit olarak isimlendirilen hücreler ve bu hücrelerin salgıladığı maddelerin oluşturduğu karmaşık yapılı bir savunma sistemidir (Roch ve Cooper, 1991). Solucanlarda, sölomik boşlukta bulunan sölomositler (lökositler), fagositoz ve parazitlere ve patojenlere karşı kapsülleme gibi doğuştan gelen hücresel bağışıklık işlevlerinden sorumludur (Hatti ve Ramkrishna, 2013). İnsan akyuvarları ile benzer şekilde çalışan sölomositlerin derideki porlardan dışarı da salındığı rapor edilmiştir (Adamomowicz ve Wojtaszek, 2011).

Solucanlar hermafrodittir, her bireyin hem erkek hem de dişi organları vardır. Ancak kendi kendine doğurgan değildirler ve çiftleşme yapıları vücudun arka kısmında bulunur. Klitellumun (yumurtalar için bir koza oluşturan salgı bezi şişmesi) ve çeşitli gözeneklerin ve papillaların (yumrular) konumları ve gelişim derecesi, türlerin tanımlanmasında çok önemlidir Erkek ve dişi cinsiyet organları, her solucanda sırasıyla sperm ve yumurta üretebilir. Solucanlar hermafrodit olmalarına rağmen, çoğu üremek için bir eşe ihtiyaç duyarlar. Solucanların çiftleşme yaklaşık bir saat sürebilir, solucanlar daha sonra ayrılır. Daha sonra her solucanın klitellum, spermlerin yumurtaları döllemek için girdiği kozayı çıkarır. Haftada solucan başına en fazla 3 koza üretilir. Her kozadan yaklaşık 10-12 küçük solucan çıkar. Genellikle bir solucanın ömrü, türün türüne ve ekolojik duruma bağlı olarak yaklaşık 3 ila 7 yıldır (Veeramani, 2010).



Şekil 2.1. Toprak solucanının genel görünüşü (Anonim, 2018)



Şekil 2.2. Solucanın morfolojik yapısı ve vücut anatomisi (Aydilek 2005)

Dünya genelinde dağılmış 3920 solucan türü vardır. Negatif fototaktik, yumuşak gövdeli, gerçek sölomatlar, agro-ekosistemin saprofitik yaratıkları ve toprak biyotasının ana makro faunasıdır (Patil ve Biradar, 2017). Toprağı etkileyen solucanların faaliyetleri, toprağın yutulmasını ve kil, kireç ve humusun ana toprak bileşenlerinin karıştırılmasını içerir; havalandırmayı, drenajı ve kök penetrasyonunu artıran yuvaların inşasına katkıda bulunmaktadır. Vücudun hem harici hem de dahili olarak bölünmesinin doğası, hayvanın esnekliğe sahip olmasını ve iyi kas gelişiminin başlamasını sağlamıştır. Solucanlar,

oksijen ve karbondioksit taşıyıcısı olarak plazmada hemoglobin bulunan tam sindirim sistemine, kapalı dolaşım sistemine sahip ilk hayvan grubudur (Ismail, 1997).

Solucanlar çok çeşitli topraklarda bulunur ve toplam toprak biyokütlesinin %60-80'ini temsil eder (Bouche, 1992). Ekin alanlarında toprak mikroorganizmalarının popülasyonunda önemli rol oynarlar. Solucanlar genellikle toprakta yaşar, canlı ve ölü organik maddelerle beslenirler, karbonhidratları hidrolize etme ve toprakta yaprak, kök, maya, alg ve mantarları sindirme yetenekleri ile karakterize edilir (Julka, 1993; Rajesh, Rajamanikkam, Vadivu ve Palanichelvam 2019; Prat, Charrier, Deleporte ve Frenot, 2002).

Bir ekosistemde bulunan gıdanın miktarı ve kalitesi, solucan topluluğunun popülasyon büyüklüğünü, bileşimini ve çeşitliliğini belirler. Genel olarak, günlük yem alımı, solucan vücut ağırlığının 100 ila 300 mg/g'ı arasında değişir. Bir tahmine göre, bir solucan yılda 8 ila 20 gr gübre tüketebilir. Dolayısıyla 120.000 yetişkin/ha'lık bir nüfus yoğunluğunda, gübre tüketimi 17.20 ton/ha/yıl olacaktır (Bhatnagar ve Palta, 1996). Dolayısıyla bu tahminler, solucanların toprak biyotasının karıştırılmasında ve organik maddenin toprağa dâhil edilmesinde önemli olduğunu fazlasıyla göstermektedir. Bazı solucanlar, belirli mikroorganizmaları seçici olarak sindirebilir (Dash, Satpathy, Behera ve Dei, 1984).

Solucanlar toprakta havalandırıcı, öğütücü, kırıcı, kimyasal bozundurucu ve biyolojik uyarıcılardır. Evlerden, bahçelerden, mandıralardan ve çiftliklerden kaynaklanan çeşitli organik atıklardaki selülozik ve proteinli maddelerin hızlı biyokimyasal dönüşümünü sağlayan enzimler, proteazlar, lipazlar, amilazlar, selülazlar ve kitinazlar salgılarlar (Veeramani, 2010). Solucanların topraktaki dağılımı, toprak nemi, organik madde mevcudiyeti ve toprağın pH'ı gibi faktörlere bağlıdır. Özellikle karanlık ve nemli olan çeşitli habitatlarda bulunurlar. Humus, sığır gübresi ve mutfak atıkları gibi organik maddeler bazı türler için oldukça çekici yerlerdir (Gunathilagraj, 1996).

Solucan sayıları farklı topraklarda büyük farklılıklar gösterir, ancak iyi havalandırılmış toprakları tercih ederler ve yılda yaklaşık 800 mm yağış alan topraklara hakim olma eğilimindedirler. Ekilebilir topraklarda, 110-1100 kg/ha biyokütle ile metrekare başına

30-300 birey arasında değişebilirler. pH'ı 5-7 olan ve organik madde içeriği düşük, nemlendirilmiş madde içeren toprakları tercih etme eğilimindedirler. Mantar materyali ayrıca solucanın yuva yapmasını engelleyebilir. Bu tür topraklar ayrıca yüksek sayıda bakteriye sahip olma eğilimindedir. Turba gibi pH <4 olan topraklar genellikle çok asidiktir ve solucanları destekleyemeyecek kadar su doludur. Kil içeriği yüksek veya çok kaba dokulu topraklar, kil çok az oksijene sahip olacağından ve kaba topraklar solucanlar için çok aşındırıcı olduğundan ve toprak serbestçe akıyorsa çok kuru olabileceğinden genellikle solucanları desteklemez. Yırtıcı hayvanlar, amonyak gübreleri, bazı insektisitler ve toprak işleme yoluyla toprağın bozulması sonucu solucan sayıları azalabilir. Mahsul artıkları ve nem engelli (malç) toprak işleme solucanları teşvik eder (Anonim, 2022c).

Solucanlar dokunmaya, ışığa ve kuruluğa karşı çok hassastır. Toprakta su birikmesi onların yüzeye çıkmasına neden olabilir. Solucanlar 5ºC ile 29ºC arasındaki sıcaklık aralığını tolere edebilir. 20ºC ila 25ºC sıcaklık ve yüzde 50-60 nem solucan fonksiyonu için optimumdur (Hand, 1988). Yiyecekleri, taze ve çürüyen bitki artıkları, canlı veya ölü larvalar ve küçük hayvanlar ve toprakla karıştırılmış bakteri ve protozoaları ince öğüten kaslı bir taşlığa sahiptirler. Solucan bağırsağında milyonlarca ayrıştırıcı mikroorganizma bulunur (Veeramani, 2010).

Solucanlar, özellikle beslenme ve oyuk açma aktivitelerinin bitki büyümesini, besin dönüşümünü ve fide gelişimini etkilediği toprağın üst 15-35 cm'lik kısmında toprak makro-faunasının son derece önemli bir parçasıdır ve bu nedenle "ekosistem mühendisleri" olarak tanımlanmıştır (Asshoff, Scheu ve Eisenhauer, 2010). Oyuklar havalandırma, drenaj ve kök penetrasyonunu artırmaya hizmet eder ve bu nedenle, bitkilere mineral besin maddelerinin mevcudiyetini artırarak ve ayrışmamış yüzey kalıntılarını toprağa entegre ederek toprak verimliliğini ve üretkenliğini arttırdıkları için toprak gelişimi ve tarımsal üretimde büyük önem taşırlar (Lavelle ve diğerleri, 2016).

Solucan yiyeceklerinin çoğu yüzeye yakın bir yerde bulunur, ancak yuvalar oluşturarak kendilerini çevresel ve mevsimsel değişkenliklere karşı bir miktar koruma sağlarlar. Üç tür yuva oluştururlar: a) yüzeyde birkaç dallı girişe sahip olabilen derin dikey yuvalar, b)

ara sıra toprağa saplanan yatay yuvalar. Bunlarda yuva, solucan tarafından üretilen mukusla kaplıdır ve uzun süre dayanır ve c) dikey yuvalar, yüzeye yakın yaşayan solucanlar tarafından yapılır. Bu yuvalar kuru veya soğuk dönemlerde barınak sağlar, ancak kısa bir süre için bulunur ve solucanın olumsuz koşullara sığındığı odalarda sona erebilir. Şiddetli yağmurlar sırasında yuvalar su ile dolabilir, bu nedenle solucanlar kendilerini boğulmaktan alıkoymak için dışarı çıkabilirler. Çok kuru koşullar altında yuvalarına göç edebilirler (Anonim, 2022c).

Solucanlar beslenmeleri yoluyla toprak mikrobiyotası üzerinde doğrudan ve önemli bir etkiye sahiptir. Bu etki, Curry ve Schmidt (2007) tarafından belirtildiği gibi, yiyecek tercihlerine, seçimlerine, yiyecek yutma hızlarına, sindirimlerine ve asimilasyonlarına bağlı olabilir.

Solucanlarla ilgili araştırmalar genellikle *E. fetida, E. andrei, Lumbricus terrestris* ve *Dendrobaena venata, Eudrilus eugeniae, Lumbricus rubellus* ve *Perionyx excavatus* ile yoğunlaşmıştır (Dales ve Kalac, 1992; Milochau, Lassègues ve Valembois, 1997; Eue, Kauschke, Mohrig ve Cooper, 1998; Furlong, Singleton, Coleman ve Whitman 2002;; Koening ve diğerleri, 2003). Özellikle, *E. fetida, E. andrei, Eudrilus eugeniae, Lumbricus rubellus* ve *Perionyx excavatus* başlıca atık yiyici ve biyolojik olarak parçalayıcı solucan türleridir. Atık bozunması için dünya çapında kullanılırlar ve organik belediye atıklarının ekolojik yönetimi için çok başarılı görevliler olarak bulunurlar (Edwards, 1988).

2.2. Solucanların Sınıflandırılması

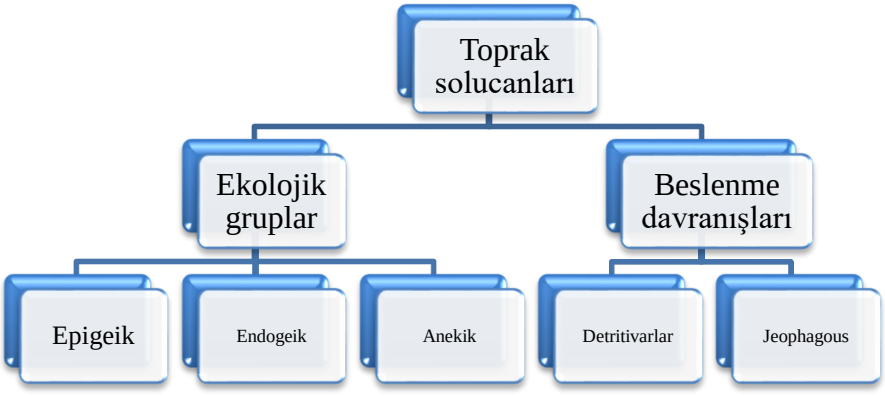
Solucanlar, Oligochaeta ("birkaç kıl" anlamında) olarak bilinen bir sınıfa aittir. Bu sınıf da annelidler olarak bilinen filuma aittir (topluca Annelida, Latince'den 'küçük halka' olarak bilinmektedir). Solucanlar, Alem: Animalia, Filum: Annelida, Sınıf: Oligochaeta, Takım: Opisthopora, Familya (aile): 16 familya içermektedir. Ailoscolidae, Acanthodrilidae, Almidae, Alluroididae, Criodrilidae, Exxidae, Eudrilidae, Glossoscolecidae, Hormogastridae, Lutodrilidae, Lumbricidae, Microchaetidae, Megascolecidae, Octochaetidae, Ocnerodrilidae ve Sparganophilidae.

Literatürde çok sayıda cins tanımlanmıştır. Literatürde her cinsin altında çok sayıda tür tanımlanmıştır (Ansari ve Saywack, 2011).

Familyaların dünyadaki dağılımları şu şekildedir;

- Lumbricidae: Kuzey Yarımküre'nin ılıman bölgeleri, çoğunlukla Avrasya
- Hormogastridae: Avrupa
- Sparganophilidae: Kuzey Amerika
- Almidae: Afrika, Güney Amerika
- Megascolecidae: Güney Doğu Asya, Avustralya ve Okyanusya, batı Kuzey Amerika
- Acanthodrilidae: Afrika, Güneydoğu Kuzey Amerika, Orta ve Güney Amerika, Avustralya ve Okyanusya
- Ocnerodrilidae: Orta ve Güney Amerika, Afrika
- Octochaetidae: Orta Amerika, Hindistan, Yeni Zelanda, Avustralya
- Exxidae: Orta Amerika
- Glossocolecidae: Orta ve Kuzey Güney Amerika
- Eudrilidae: Afrika ve Güney Afrika
- Moniligastridae: Hindistan, Sri Lanka, Malezya ve Afrika'nın doğu kesiminde yaşayanlar (Ansari ve Saywack, 2011).

Solucanlar ekolojik gruplarına (nişlerine) (Bouche, 1977) ve beslenme davranışlarına göre de (Lee, 1985) göre de sınıflandırılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ekolojik gruplara ve beslenme davranış gruplarına göre solucanların sınıflandırılması

2.2.1. Ekolojik gruplara göre solucanların sınıflandırılması

Solucanlar, toprak yüzeyi sakinleri (Epigeik, Yunanca'da yeryüzü üstünde; upon the "earth'), toprak içi sakinleri (Endogeik, Yunanca'da yeryüzü içinde; 'within the earth') ve derin çukurlu toprak altı sakinleri (Anekik, Yunanca'da Yeryüzü dışında: 'out of the earth') olarak 3 grupta incelenmektedir (Anonim, 2007a).

2.2.1.1.Epigeik türler

Bu türler mineral toprak yüzeyinin üzerinde yaşar ve bitki artıkları ile beslenir (Şekil 2.4). Bunlar fitofagdır (Yunanca'da phyton: bitki, phagein: yemek) (Veeramani, 2010). Kalıcı yuvalar oluşturmaz Epigeik türler koyu ten rengine sahip olma eğilimindedir (pigmentasyon) Pigmentasyon, yaprak çöpü boyunca hareket ederken kamuflaj görevi görür. Ayrıca UV ışınlarından korunmalarına da yardımcı olur. Epigeik türler küçük olma eğilimindedir (1-18 cm uzunluğunda). Yerli türler genellikle orman çöplerinde yaşar. Türlerin çoğu önemsiz bir role sahiptir, humus oluşumu ve toprak ıslahı için tarla koşullarında kullanım için iyi değildirler. Yüksek üreme hızına ve yüksek koza üretim hızına sahiptirler. Ancak ömürleri nispeten kısadır. Yüksek metabolik aktivite gösterirler ve bu nedenle vermikompostlama için özellikle yararlıdırlar (McLean ve Parkinson, 1998; Julka, 2008). Vermikompostlama, her türlü hayvansal ve bitkisel organik atıkların faydalı mikroorganizmalar ve solucanlar aracılığı ile işlenerek yapıtaşlarına ayrışması süreci olarak ifade edilmektedir. Bu sürec sonunda tamamen doğal olan yüksek kaliteli solucan gübresi elde edilmektedir (Edwards, Arancon, ve Sherman, 2011). Örnek olarak *E. fetida, Eudrilus eugeniae, Eisenia andrei, Drawida modesta* ve *Perionyx excavates* verilebilir (Domínguez, 2018).

Endogeik (Endojen) türler

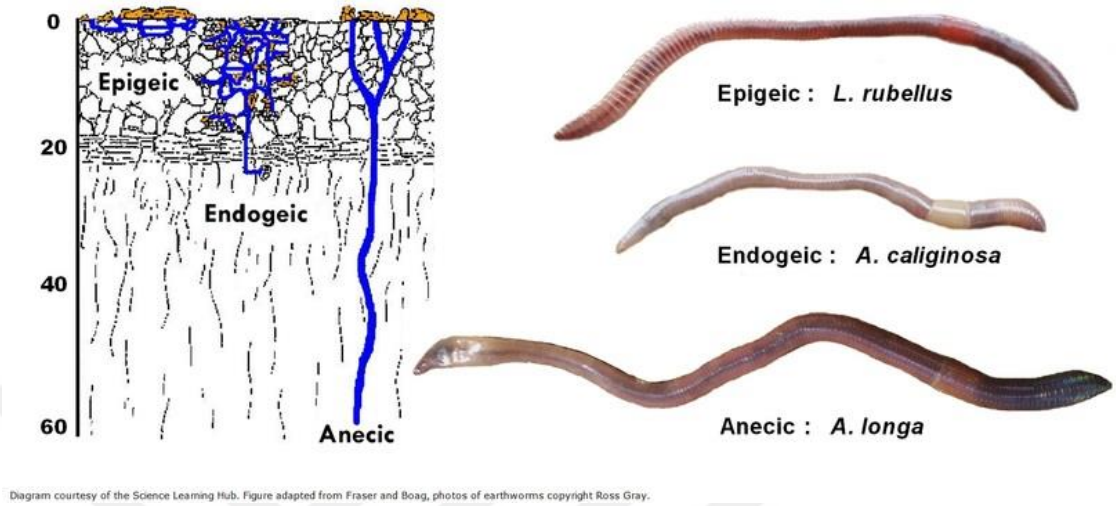
Endojenler türler, toprağın 20 cm derinliğine kadar yaşayabilmektedir. Türler bazen yiyecek aramak için yüzeye çıksa da, endojen solucanlar büyük miktarda toprak ve

içindeki organik maddeyi yerler (Şekil 2.4). Endogeik solucanlar az pigmentasyona sahiptir. Kas katmanları, epigeik solucanlar kadar kalın değildir ve hızlı hareket etmezler. Endogeik türlerin boyutları 2,5-30 cm arasında değişmektedir (Anonim, 2007a). Bu türler, toprağın üst mineral tabakasında, çoğunlukla sindirilmiş mineral toprak maddesi olmak üzere geniş ve kalıcı olmayan yuvalar oluştururlar ve "ekoloji mühendisleri" veya "ekosistem mühendisleri" olarak bilinirler. Diğer organizmalar için bir kaynağın kullanılabilirliğini veya erişilebilirliğini değiştirebilecekleri fiziksel yapılar üretirler (Jones, Lawton ve Shachak, 1994). Genellikle toprak yüzeyine yatay tüneller oluşturur. Organik maddece az ya da çok zenginleştirilmiş toprakta beslenirler. Muhtemelen toprak dokusunun ve yapısının iyileştirilmesinde önemlidirler ve organik madde ayrışmasında ve bitki besin maddelerinin geri dönüşümünde pek faydalı değildirler. Üreme hızları orta düzeydedir ve ömürleri daha kısadır. Örnek olarak *Allolobophora caliginosa, Octochaetona thurstoni, Drawida barwelli* ve *Allolobophora rosea* verilebilir (Singh ve diğerleri, 2020).

Anekik türler

Anekik solucanlar, toprak yüzeyinin 3 m altında kalıcı yuvalarda yaşarlar (Şekil 2.4). Toprak yüzeyinden besin toplarlar ve topraktan organik madde alırlar. Yuvaları 2 cm çapa kadar olabilir. Yerli anekik türler halsiz olma eğilimindedir ve zayıf gelişmiş kaslara sahiptir. Toprakta çok derinlerde yaşadıkları için, yerli anekik türler çok az pigmentasyona sahiptir ve çok solgun olduklarından genellikle süt solucanları olarak adlandırılırlar. Bu derin çukurlu türler aynı zamanda en uzun olanlardır ve 3 cm'den çok büyük 1,4 m'ye kadar değişirler (Anonim, 2007a). Bunlar, mineral toprak katmanlarında dikey yuvalar inşa eden ve bu yuvalarda yaşayan, ancak çoğunlukla bitki çöpü olmak üzere organik maddelerle beslenmek için yüzeye çıkan yüzeyden beslenen solucanlardır. Yüzey çöplerini gömmede önemlidirler. Organik maddenin toprağa katılmasında, bitki besin maddelerinin dağılımında ve döngüsünde ve ayrıca toprak yapısının ve dokusunun iyileştirilmesinde büyük yardımcıdırlar. Bu türlerin koza üretim hızı düşüktür ve üreme kapasitesi sınırlıdır, ancak ömürleri daha uzundur. Döküntüleri yuva girişine bırakırken, mikroorganizmalar tarafından önceden ayrıştırılmak üzere yuvalarına sürüklediklerini çöple beslenirler (Lee, 1985).

Örnek olarak *Lampito mauritti, Lumbricus terrestris, Octochaetona serrata, Aporrectodea trapezoids, Aporrectodea longa* verilebilir (Singh ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.4. Solucanların topraktaki yerleşimi (Singh ve diğerleri, 2020)

Bouche (1997) tarafından solucanları ekolojik grup temelinde ayırt etmek için kullanılan özelliklerin bir özeti Çizelge 2.1'de verilmiştir (Gajalakshmi ve Abbasi, 2004).

Çizelge 2.1. Ekolojinin temelinde solucanları sınıflandırmak için kullanılan genel özellikleri

Özellikleri	Epigeik	Endojen	Anekik
Vücut ölçüsü	Küçük	Büyük	Orta
Oyuk açma alışkanlığı	Azaltılmış	Gelişmiş	Güçlü gelişmiş
Boyuna kasılma	Yok	Küçük	Gelişmiş
Kancalı çita	Yok	Yok	Var
Işığa duyarlılık	Düşük	Güçlü	Orta
Hareketlilik	Hızlı	Yavaş	Orta
Deri nemlendirme	Gelişmiş	Zayıf	Gelişmiş
Pigmentasyon	Homokromik	Yok	Dorsal ve Anterior
Doğurganlık	Yüksek	Düşük	Orta
Olgunlaşma	Hızlı	Yavaş	Orta
Solunum	Yüksek	Zayıf	Orta
Olumsuz koşullar altında hayatta kalma	Koza olarak	Sessizlik (Hareketsiz kalma)	Gerçek Diyapoz (yaşamlar faaliyetlerini minimuma düşürdükleri evre)

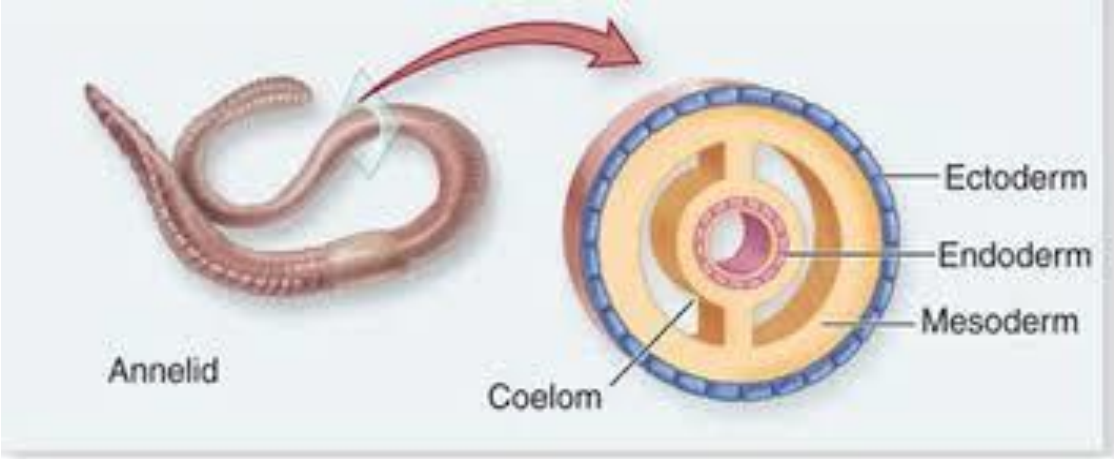
2.2.2. Beslenme davranışlarına göre solucanların sınıflandırılması

Beslenme stratejilerine göre de iki farklı sınıfa ayrılabilen 3.000'den fazla solucan türü vardır - bitki çöpü ve memeli gübresi (yüzey besleyiciler) ile beslenen detritivorlar ve toprağın daha derin katmanlarında bitki materyali ile beslenen jeophagous. Bu iki grup, hangi toprak horizonunda beslendiklerine bağlı olarak alt bölümlere ayrılabilir (Curry ve Schmitt, 2007).

Solucanların tanımlanması genellikle morfolojik karşılaştırma yoluyla elde edilir, ancak gençlerin tanımlanmasında yararlı olduğu kanıtlanan DNA tabanlı yöntemler geliştirilmektedir (Richard ve diğerleri, 2010).

2.3. Sölom, Sölom Sıvısı ve Sölom Sıvısının Ekstraksiyonu

Perivisseral boşluk olarak da bilinen sölom, vücut duvarı ile sindirim kanalı arasındaki boşluktur. Bazı hayvanlarda mezotelyum ile kaplıdır. Yumuşakçalar gibi diğer hayvanlarda ise farklılaşmamıştır. Geçmişte ve pratik amaçlar için, iki taraflı hayvan filumlarını gayri resmi gruplara sınıflandırmak için sölom özellikleri kullanılmıştır. Sölom, bağırsak ve dış vücut duvarı arasındaki mezodermal olarak kaplı boşluktur (Şekil 2.5). Embriyonun gelişimi sırasında, gastrulasyon aşamasında sölom oluşumu başlar. Bir embriyonun gelişmekte olan sindirim tüpü, archenteron adı verilen kör bir kese şeklinde oluşur. Sölom'un evrimsel kökeni belirsizdir. Sölom fonksiyon olarak dışardan gelen şoku algılar veya hidrostatik bir iskelet sağlayabilir. Solucanlar kaba kullanım veya stres durumunda bu sıvıyı dış ortama yayarlar. Aynı zamanda, sölom duvarına bağlanabilen veya içinde serbestçe yüzebilen sölomositler formundaki bir bağışıklık sistemini de destekleyebilir. Toprak solucanlarının sölom boşluğunda bulunan ve savunmadan sorumlu hücreler sölomositlerdir (Arslan, 2005).



Şekil 2.5. Sölom'un vücut içindeki konumu (Anonim, 2022d).

Solucanların sölomları, solucanın hareketinde bir hidro-iskelet görevi görür, beslenmesinde, gazların, besinlerin ve atık ürünlerin vücutta taşınmasına hizmet eder, olgunlaşma sırasında sperm ve yumurtaların depolanmasını sağlar ve atık için bir rezervuar görevi görür, dokuların detoksifikasyonunda, ağır metal birikiminde yardımcı olan ve iç organları dış darbelerden koruyan, bakteri saldırısını yok eden, kurumayı önleyen, süt beyazı alkali ve sarı renkte bir sıvı olan sölomik (sölom) sıvı ile doldurulur Sölom sıvısı, mezotelyal kirpikler veya vücut duvarındaki kasların kasılması ile dolaştırılır (Dorit, Walker ve Barnes, 1991; Kurek, Homa, Kauschke ve Plytycz, 2007; Dash, 2012; Paul, 2014).

Sölom'un sarı rengi (Şekil 2.6) kısmen sıvıda bulunan ve kısmen de salınan çok sayıda sölomositle ilişkili olan riboflavinden gelmektedir (Albani, Demuynck, Grumiaux, ve Lepretre, 2003; Koziol, Markowicz, Kruk, ve Plytycz, 2006). Bununla birlikte, sölom sıvısı ayrıca küçük moleküllü metabolitlerin karmaşık bir karışımını içerir; *Eisenia veneta*'da sitrik asit döngüsü ara maddeleri fumarat, süksinat, malat ve a-ketoglutarat dahil olmak üzere organik asitler hakimdir (Bundy, Osborn, Weeks, Lindon ve Nicholson, 2001). *E. fetida*'da ayrıca putresin, spermidin ve miyo- inositol ve scyllo-inositol gibi bileşenleri de içerir (Yuk, Simpson ve Simpson, 2012).



Şekil 2.6. Sölomik sıvı (Solitera Kompost Ekolojik Ürünler Gıda Tarım Hayv. San. Tic. Ltd. Şti.ndeki üretimden fotoğraflandırılmıştır).

Sölomik sıvı, genellikle solucanın fizyolojik aktivitelerini sağlamak ve vücuttaki nemi korumak amacıyla salgılanır. Genellikle kimyasal ve mekanik tahrişe tepki olarak stres anında solucanın derilerindeki dorsal gözeneklerden dışarı atılır (Patil ve Biradar, 2017). Bu sıvı birçok enzim, yani proteazlar, lizozimler, metalloenzimler, fibrinolitik enzimler ve polisakaritler, antimikrobiyal proteinler, besinler vb. içerir (Fiołka, Czaplewska, Macur, Buchwald ve Kutkowska, 2019). Bu sıvıdaki biyoaktif bileşiklerin sitolitik, proteolitik, antimikrobiyal, antiinflamatuar, antioksidan ve antitümör, hemolitik, hemaglütinasyon, tümörolitik ve mitojenik aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (Pan, Liu, Ge ve Zheng, 2003; Li ve diğerleri, 2017). Aynı zamanda bağışıklıktan sonrumlu sölomositler adı verilen farklı hücre formlarına da sahiptir (Gupta ve Yadav, 2016).

Solucanların sölomik sıvısının 40'tan fazla protein içerdiği ve proteolitik, sitolitik, antimikrobiyal, hemaglütinasyon, mitojenik, hemolitik ve tümörolitik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (Cooper ve Roch, 2003). Sölomik sıvının ayrıca antikanser aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sölomik sıvının yüksek konsantrasyonu, HeLa hücreleri üzerinde toksik etki göstererek hücre parçalanmasına ve parçalara ayrılmasına neden oldu. Sölomik sıvının antibakteriyel aktivitesinin seçici olduğu bildirilmektedir. Solucandan gelen sölomik sıvının immünoaktif hücreler içerdiği bilinmektedir (Esaivani, Vasanthi ve Singh, 2017).

E. fetida'nın sölomik sıvısının hemolitik etkisi ilk olarak Du Pasquier ve Duprat (1968) tarafından tanımlanmıştır. Hemolitik faktörün koyun kırmızı kan hücrelerine ve diğer çeşitli omurgalı eritrositlerine karşı aktif olduğunu göstermişlerdir. Solucanların sölomik sıvısı, sitolitik, antibakteriyel ve/veya aglütinasyon bileşenleri içerdiğinden dolayı bu konuda çalışmalar yapılmıştır (Roch, Canicatti ve Valembois, 1989; Lassègues, Roch ve Valembois, 1989; Mohrig, Eue, Kauschke ve Hennicke, 1996). *E. fetida*'nın sölomik sıvısında birçok peptit molekülü tanımlanmış, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Yamaji-Hasegawa ve diğerleri, 2003; Konig, Wagner, Kauschke ve Eue, 2004).

Solucanlar, toprakta havalandırmaya ve su akışına yardımcı olan kanallar oluşturarak ve bitki büyümesine yardımcı olan ve hastalıklara karşı direnci artıran birçok önemli element, enzim ve diğer bileşenleri içeren sölomik sıvıyı atarak önemli roller üstlenirler (Chaudhuri, 2005; Ansari ve Sukhra, 2010). Solucan sölomik sıvısı, bağışıklık savunması da dahil olmak üzere birçok biyolojik işlevi olan karmaşık bir matris olarak uzun zamandır ilgi görmüştür (Lassègues, Roch ve Valembois,1989).

2.3.1. Solucanlardan sölomik sıvının ekstraksiyonu

Solucan sölomunun içindeki sölomik sıvı, hafif elektrik çarpması, sölomik boşluğun delinmesi ve solucana çeşitli şok yöntemleri gibi farklı yöntemlerle uyarılarak toplanır (Kobayashi, Ohta ve Umeda, 2004; Pan, Liu, Ge ve Zheng, 2003).

Çeşitli biyolojik aktiviteler vb. için solucanlardan sölomik sıvı elde etmek günümüzde uygulanan genellikle dört yöntem vardır (Patil ve Biradar, 2017).

1. Sıcak su yöntemi

Bu yöntemde, bir miktar solucan (±15 gr) alınır, 25 ml ılık su (45°C) altında tutulmakta ve sıvının tamamı daha ileri analizler veya aktiviteler için sölomik sıvı (vermiwash) olarak kullanılmaktadır.

2. Elektrik çarpması yöntemi

Bu yöntemde, aynı miktardaki solucanlar (±15 gr) 30 dakika boyunca yaklaşık 5 voltluk hafif elektrik çarpmasına maruz bırakılmaktadır. Serbest kalan sıvı, sölomik sıvı olarak kabul edilmektedir.

3. Soğuk şok yöntemi

Bu yöntemde, aynı miktardaki solucanlar (±15gms) petri kabı içinde buz küpleri kullanılarak soğuk şoka tabi tutulmakta ve sıvı temiz ve kuru bir test tüpünde toplanmaktadır. Bu yöntemle 30 dakikada 1.5 ml sölomik sıvı elde edilebilmektedir.

4. Isı şoku yöntemi

Soğuk şok yöntemine benzer şekilde, bu yöntemde buz küpleri, farklı bir solucan seti (±15 gr) ile sıcak su torbası (55-60°C) ile değiştirilmektedir. Bu yöntemle sadece yaklaşık 0,5-0,25 ml sölomik sıvı elde edilebilmektedir.

Diğer yandan, farklı yöntemlerle sölom sıvısı (vermiwash) muazzam miktarda su ile birlikte toplanmaktadır (Zambare, Padul, Yadav ve Shete, 2008). Sölomik sıvısının eldesinde elektrik çarpması ve delme yöntemleri de uygulanmaktadır. Bir savunma mekanizması olarak bir tür elektrik çarpması ile sırt gözeneklerinden sızarak solucandan çıkarılmıştır (Plavšin, Velki, Ečimović, Vrandečić ve Ćosić, 2017). Sölomik sıvı ekstraksiyonunun diğer yöntemi, taze ve saf sölomik sıvıyı çıkarmak için uygulanan delme yöntemidir. İnce bir cam kılcal boru ile solucanın sölomik boşluğundan sölomik sıvıyı delmeyi ve emmeyi içermektedir (Gudeta ve diğerleri, 2020).

2.4. Toprak Solucanlarının Biyoteknolojik Potansiyeli

Solucanlar, MS 1340'tan beri tıpta çeşitli çareler için kullanılmıştır. Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, solucandaki biyoaktif bileşikler giderek daha fazla bilim insanının dikkatini çekmeye başladı (Fang, 1999; Cooper, Kauschke ve Cossarizza, 2002; Shen,

2010). Bunun nedeni, solucanın tıbbi değerinin birçok kimyasal bileşenle ilgili olmasıdır. Araştırmacılar, izole edilmiş, saflaştırılmış ve hatta birçok bileşeni eksprese edilmiş bazı enzimlerin bazı özelliklerini ve aktivitelerini araştırmışlardır. Solucanlar evrim sürecinde bu canlı patojenlere karşı savunma stratejileri geliştirmiştir. Solucan yüzey dışkısının güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda kan dolaşımını kolaylaştıran pıhtılaşma önleyici veya fibrinolitik aktiviteye sahiptir (Cooper ve Balamurgan, 2010). *Eisenia foetida* sölomik sıvısının Gram pozitif ve Negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi analiz edilmiştir (Shobha ve Kale, 2008).

Genel olarak solucanlar birçok pestisite karşı oldukça dirençlidir ve pestisitleri ve ağır metalleri dokularında yoğunlaştırdıkları rapor edilmiştir. Ayrıca toprak kaynaklı patojenleri de engellerler ve kirlenmiş toprak için detoksifiye edici bir ajan olarak çalışırlar (Ireland, 1983). Solucanların bu özellikleri, atık su arıtımı ve endüstriyel ve tarımsal atıklardan ağır metal ve pestisitlerin giderilmesi için kullanılabilir. Solucanlar önemli "ikincil ayrıştırıcılardır" ve solucanların doğal popülasyonu rahatsız edilmediyse, doğada solucan gübresi üretimi devam eden bir süreçtir. Solucanlar ayrıca atık maddelerde aerobik koşullar yaratır ve kötü kokulu hidrojen sülfür ve merkaptanlar salan anaerobik mikroorganizmaların hareketini engeller (Veeramani, 2010).

Solucan aktivitesi mikrobiyal aktivite ile yakından ilişkilidir, kompostlama süresini azaltabilir ve kaliteli biyogübre ve biyokütle üretebilir (More ve More, 2017). Solucanlar ayrıca protein açısından zengin hayvan yemi kaynakları olarak kullanılır. Kuru ağırlıkta %70-80 protein içerirler ve ayrıca esansiyel amino asitler, özellikle lizinden zengin içerirler. Hindistan'da kurutulmuş solucan ezmesi, harici olarak uygulandığında yaraları, kronik çıbanları, yığınları, fıtıkları ve iktidarsızlığı tedavi etmek gibi Unani (geleneksel tıbbın Hint sistemi) tıp sisteminde hastalıkları tedavi etmek için hazırlanmıştır (Cooper ve diğerleri, 2012). Solucanlar, geleneksel Çin tıbbında binlerce yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, biyokimyasal teknolojilerin gelişmesiyle ancak son birkaç on yılda solucanların farmasötik etkileri üzerine araştırmalar başlatılmıştır. Fibrinoliz enzimleri ilk olarak 1980'lerde solucanlardan izole edilmiştir (Yanqin ve diğerleri, 2007). Solucanların varlığı toprak verimliliğini, mikrobiyal ve enzimatik aktiviteleri önemli ölçüde etkileyebilir. Solucanlar, proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların sindirimini

iyileştirmek için hayvan yemlerinde ve ayrıca nişastanın, deterjanların, hayvan ve insan terapötiklerinin sakarifikasyonunda, kirlenmiş toprakların biyolojik olarak iyileştirilmesi için yararlı olan bol miktarda enzim içerir. Amilazlar en önemli endüstriyel enzimler arasındadır ve biyoteknoloji için büyük önem taşımaktadır. Solucan vücudundaki amilaz aktivitesi birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır (Ramian, Arabi ve Hemmati, 2018).

Solucanlar, ayrışma, humus oluşumu, besin döngüsü ve toprak yapısal gelişiminin arttırılması gibi tarımsal ekosistemde önemli bir rol oynamaktadır (Kladivko, Mackay ve Bradford, 1986). Bazı türlerin organik madde dekompozisyonu ve mineral döngüsündeki rolü önemli olduğundan ve solucan yetiştiriciliği (vermikültür) ve solucan gübresi (vermikompost) son yıllarda önem kazanmıştır (Sethulakshmi ve Lakshmi, 2018) Toprak solucanlarının kültürünün yapılması işlemine vermikültür denilmektedir. Vermikompost diğer isimler ile vermikompostlama ya da biohumus ise bitki gübresi ve toprak düzenleyici olarak tanımlanmaktadır (Tutar, 2013). Vermikültür (solucan üretimi) ve vermikompotsun (solucan gübresi; vermicast) üretimi oldukça değerlidir (Abacıoğlu, Yatgın, Tokel ve Yücesoy, 2020). Solucan gübresi organik atıkların gübre şeklinde kullanılması sebebiyle çevreye büyük oranda olumlu katkıları bulunmaktadır (Demir, Polat ve Sönmez, 2010). Vermikompost uygulanan topraklarda yetiştirilen bitkilerin zararlılara ve hastalıklara karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Vermikompostun bitkiler üzerindeki antifungal ve antibakteriyel etkisi özellikle solucanların dışarı salgıladıkları sölom sıvısından kaynaklanmaktadır Çünkü. vermikomposta karışan sölom sıvısının bulunan fetidin, aglütinin, kitinaz ve lumbricidin proteinler ve enzimler bazı bakteri ve fungus üzerine etki etmekte, böylece birçok hastalığın ve zararlının olumsuz etkisini ortadan kaldırmaktadır (Wang, Sun ve Zheng, 2006).

Vermikültür biyoteknolojisi, hem çiftçilere hem de tarım arazilerine yarardan çok zarar veren yıkıcı tarımsal kimyasalları tamamen değiştirerek “İkinci yeşil devrim”i başlatmayı vaat etmektedir. Solucanlar toprak verimliliğini eski haline getirir ve iyileştirir ve mahsul verimliliğini önemli ölçüde artırır. Solucan gübresi (vermicast), humus, mikro besinler, faydalı toprak mikropları - "azot sabitleyici ve fosfat çözücü bakteriler" ve "aktinomisetler" ve büyüme hormonları "oksinler", "gibberellinler" ve "sitokininler" açısından zengin besleyici bir "organik gübre"dir (Veeramani, 2010).

Küresel solucan yetiştirme pazarında en fazla üretilen solucan türleri *E. fetida, Perionyx excavates, Lumbricus terrestris, Eisenia hortensis, Aporrectodea calignosa* ve *Eudrilus eugeniae*'dır. Bunların uygulanma alanları ise balık yemi, tarım, hayvan ve balık yemi, kanatlı yemi ve vermikompostlamadır. Bu solucanlar içinde ise *E. fetida* kültür solucanları üretimlerinin kolay olması ve hızlı çoğalmaları gibi özellikleri nedeniyle, solucan gübresi üretiminde en uygun solucanlar olarak bilinmektedir. Küresel solucan yetiştiriciliği pazarının 2021-2028 tahmin döneminde %13.70'lik bir yıllık büyüme oranı (CAGR) öngöreceğini analiz edilmektedir. Bu da 2020 yılında 0,1 milyar ABD doları olan solucan yetiştiriciliği piyasa değerinin 2028 yılında 0,27 milyar ABD dolarına yükseleceği anlamına gelmektedir (Şekil 2.7) (Anonim 2022e).

Solucanlar balık, kümes hayvanları ve domuzlar için mükemmel bir protein kaynağı sağlar, ancak geleneksel olarak insan tüketimi için de kullanılmıştır. Noke, Yeni Zelandalı şef olan Māori tarafından solucanlara atıfta bulunmak için kullanılan bir mutfak terimidir, bazı yerel solucan türleri yerel lezzetlerdir (Anonim, 2007b).



Şekil 2.7. Küresel solucan yetiştiriciliği pazarı (Anonim 2022e).

2.5. *E. fetida*

E. fetida (Orijinal ismi; *Enterion fetidum Savigny*, 1826, eski yazımı ile *Eisenia foetida*), Lumbricidae familyasındandır. Tür tanımlayıcısı ‘fetida' terimi hoş olmayan veya kötü kokulu anlamına gelir, solucan rahatsız edildiğinde tuhaf kokulu sarımsı bir sıvı yayabilir. Avrupa'ya özgüdür, ancak Antarktika hariç diğer tüm kıtalara (hem kasıtlı hem de kasıtsız olarak) tanıtılmıştır (Elvira, Dominguez ve Briones, 1996) . Tipik olarak 3-5 mm genişliğinde ve 8-10 cm uzunluğundadır. Vücudunda 80-110 arasında segment bulunmaktadır. Geniş koyu kırmızı-kahverengi bantlar ve daha dar uçuk pembe veya sarımsı bantlardan oluşan şeritli görünümüyle çok kolay tanımlanır. Dünyada bulunan solucan türlerinin en küçüğüdür. Genellikle kırmızı solucanlar, yalpalayan solucanlar, kırmızı kıpır kıpır solucanlar, kaplan solucanları, gübre solucanları, kokuşmuş solucanlar, balık solucanları, gübre solucanları, dışkı solucanları, çizgili solucanlar, köşeli solucanlar, şeritler vb. gibi yaygın isimlerle bilinirler (Anonim, 2022f). Ancak, genel olarak 1959’da ilk kez Kaliforniya Üniversitesi’nde kültüre edildiğinden dolayı “kırmızı Kaliforniya solucanı” olarak da isimlendirilmiştir (Qobiljonovna ve Ergashaliogli, 2021).

E. fetida, genellikle dıştan yapışkan olan uzun, tüp benzeri bir gövdeye sahiptir. Basit bir kapalı dolaşım sistemine ve iki ana kan damarına sahiptir. Sindirim sistemi tüpün içinde bulunur. Anatomi, vücudun ön kısma doğru özelleşmiş bölümlerden oluştuğunu gösterir. Değişen kırmızı ve devetüyü şeritleriyle diğer solucanlardan ayırt edilebilir. Tüm solucanlar gibi bu tür de hermafrodit yani hem erkek hem dişi üreme organlarına sahip bir türdür (Domingues, Velando, Aira ve Monroy, 2003). Ancak kendi kendine döllenme yapamazlar ve bu nedenle üremek için bir eşe ihtiyaç duyarlar. Cinsel olgunluğa erişmiş iki solucan bir araya geldiğinde çiftleşmeye uğrarlar. Her bir solucan kendi yumurtalarını salgılar ve bu yumurtalar diğer solucanın spermleri tarafından döllenir. Yumurtalar küçük kozalar (kokon) içinde oluşur. Yavru solucanlar yaklaşık 32-72 günlük bir kuluçka döneminden sonra kozadan çıkar. Yavru solucanlar, doğumlarından sonraki 8 ila 10 hafta içinde cinsel olgunluğa ulaşır. İdeal koşullarda, türler 6 ila 12 ay boyunca haftada iki ila üç koza üretebilir. Bu solucanların ortalama 3 ila 4 yıllık bir ömre sahiptir. Bu solucanlar, yaklaşık 20° ila 25° C arasında bir optimum sıcaklık gerektirir. 4° ila 27° C aralığındaki sıcaklıkları tolere edebilirler. Ancak, çevrelerinin sıcaklığı 29° C'ye ulaştığında ciddi

strese maruz kalırlar ve sıcaklık 32° C'ye ulaştığında ölürler (Domingues, Velando, Aira ve Monroy, 2003).

Epigeik bir solucandır, yani toprak yüzeyinde yaşar. Doğada, hayvan gübresi gibi nemli alanlarda, çürüyen bitkisel maddelerle beslenir ve çürüyen yaprakların nemli yığınlarında, organik açıdan zengin ortamlarda, ormandaki kütüklerin altında, bahçelerde bulunur.. Sıcak ve nemli koşullarına bağlı olarak, koşullar uygunsa tüm yıl boyunca sık sık üreyeceklerinden *E. fetida* kozalarını görmek mümkündür. Kozalar, yaklaşık 3 mm çapında, soluk sarı-kahverengi, limon şekilli boncuklara benzemektedir. 8 ila 20 embriyonik solucan içerebilirler, ancak genellikle sadece 1 ila 5 tanesi ortaya çıkar (Elvira, Dominguez ve Briones, 1996)

E. fetida, vermikompostlama için yaygın olarak kullanılan bir solucan türüdür (Maková ve diğerleri, 2019). Bu solucanlar genellikle çiftçiler ve kompostlarını gübre olarak kullanan bahçecilikle uğraşan insanlar tarafından yetiştirilir. Ayrıca balıkçılar tarafından alabalık, tavada balık vb. avlamak için yem olarak kullanılırlar. Ayrıca balık akvaryumu sahipleri bu solucanları balık yemi olarak da kullanırlar. *E.fetida* hayvan yemi için önemli bir ürün olarak kabul edilmiştir, yüksek bir ham protein içeriğine sahiptir (kuru bazda %60 ila 70 arası). Lizin, treonin, arginin ve valin gibi diyetlerde yaygın olarak kullanılan birçok sebze öğününde eksik olan esansiyel amino asitler içermektedir (Ncobela ve Chimonyo, 2015). Ayrıca linoleik asit, oktadekanoik asit ve linolenik asit gibi biyolojik öneme sahip yağ asitleri tespit edilmiştir. Bakır, demir, manganez, çinko ve fosfor gibi diğer besinler önemli miktarlarda bulunmuştur (Tiroesel ve Moreki, 2012; Gunya, Masika, Hugo ve Muchenje, 2016).

E fetida ayrıca sölomik sıvılarında benzersiz bir doğal savunma sistemine sahiptir: sölomosit adı verilen hücreler, istilacı hücreleri geçirgenleştirebilen ve parçalayabilen gözenek oluşturucu bir toksin olan lysenin adlı bir protein salgılar. *E. fetida*, tarımda kullanılmak üzere kompost üretmek için ticari ölçekte kullanılan bir gübre solucanıdır. Bu solucanın dayanıklı doğası, geniş sıcaklık ve nem dalgalanmalarını tolere etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu da bu türün kolayca kültürlenmesini sağlar. Büyüme hızı çok hızlıdır ve süresi 70 gündür (Siddique, Khan, Hussain ve Akhter, 2005). Sıcaklık toleransı

iyi olmasına rağmen doğrudan güneş ışığına ve sıcaklığa dayanamaz (Das, Jena ve Mohanty, 2002). *E. fetida*, hem evsel hem de endüstriyel organik atıkların solucan gübresi üretimi için kullanılmaktadır (Maboeta ve Rensburg, 2003).

Solucanların verimliliği ve kaliteli gübre üretimi için ortamları da oldukça önemlidir. Solucanların yaşam standartlarında bulundukları ortam nemi %65-70 oranlarındadır. Nem oranı günlük olarak uygun nem cihazları veya ilkel bir yöntem olarak avuç içine alarak ıslaklığın hissedilmesi ile sağlanır (Rostami, Nabaey, Eslami ve Najafi Saleh, 2010). Üretimdeki diğer bir parametre de sıcaklıktır. Solucanların yaşam ortam sıcaklıkları da oldukça önemlidir ve sürekli kontrol altında tutulmalıdır. Solucanlar soğukkanlı canlılar olduklarından dolayı vücut sıcaklıkları ortam sıcaklığından etkilenmektedir (Mısıroğlu, 2017). *E. fetida* sıfır derece ve altında yaşam sürdürmeleri mümkün değildir. Yaşam ortamlarının uygun sıcaklıkları 15-25 derece aralığında olmalıdır. Diğer yandan mikrobiyal faaliyetlerin de devamlılığını sağlayıp beslenme ve gübre üretimi için organik maddelerin parçalanması gereklidir. Buna uygun optimum sıcaklık değerleri ise 15-30 derece aralığındadır (Rostami, Nabaey ve Akbar, 2009).

Yaşam ortamının temiz, kapalı, karanlık ve yerden yüksek üç tarafı kapalı kutular içerisinde haşeraların olmadığı bir ortamda bulunmalıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

Çalışmada kullanılan toprak solucanı *E. fetida* kimyasal gübre üretimi ve solucan üretimi yapan Solitera Kompost Ekolojik Ürünler Gıda Tarım Hayvancılık Ltd. Şti firması (Bursa)'ndan temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Üretim yeri

3.2. Yöntem

3.2.1. Solucan Üretim Ortamı

Solucanlar içinde besi ortamı bulunan yerden yüksek, karanlık, nemli ve 18-25 derece sıcaklık bulunan plastik veya tahta kasalarda üretilmiştir. Yetişme ortamının büyüklüğü solucan miktarları ile doğru orantılıdır (1m2 *10.000 solucan).

Solucanlar karbon ağırlıklı besinleri (evsel atıkları, meyve, sebze) tüketmek ile birlikte sepere edilmiş büyükbaş hayvan gübresi gibi atıklar ile de beslenebilmektedir.

Kaliteli bir solucan gübresi eldesi için tükettikleri besinleri en az 6 ay – 1 yıl içinde dönüşüme hazır hale getirebilmektedirler. Besin miktarları solucanların sayısı ve yaşam ortam büyüklüğüne göre değişiklik göstermektedir.

3.2.2. Solucandan sölom sıvısının elde edilmesi

Çeşitli biyolojik aktiviteler için solucanlardan sölomik sıvı (Coelomic Fluid, CF) elde etmek için birçok teknik geliştirilmiştir. Bu çalışmada, solucanlar sırasıyla iki kez damıtılmış su ve %0,85 NaCl (fizyolojik tuzlu su) ile yıkanmış, bir kağıt mendil üzerinde kurutulmuş ve ardından bir cam behere yerleştirimiştir. Solucanlar, 30 saniye boyunca 5 V'luk stimülasyonla uyarılmış, bu da onları epidermal dorsal gözeneklerden CF çıkarmaya teşvik etmiştir. Toplanan CF vortekslenmiş ve 0.22 µm şırınga filtresi (Macherey-Nagel steril filtre) ile filtre edilmiştir (Vasantha ve diğerleri, 2019). Çalışmalarda hücre içermeyen saf CF solüsyonu kullanılmıştır.

3.2.3. Sölom sıvısından bakterilerin izolasyonu ve 16S rRNA mikrobiyal adlandırılması (filogenetik analiz)

Bakterilerin izole edilmesi amacıyla Nütrient agar besiyeri kullanılmıştır. Solucandan elde edilmiş 1 mL sölom sıvısı, 10 mL %0.85 steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde vortekslenerek karıştırılmıştır. Solüsyon örneğinden bir seri dilusyonlar yapılmış ve petrilere 0.1 mL örnek pipetlenerek yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Petriler 24 saat süresince 37°C'de inkübe edilmiştir. Petri üzerinde üreyen bakterilerin hizmet alımı yoluyla 16S rRNA analizi yapılarak bakterilerin türleri belirlenmiştir (RefGen Biyoteknoloji, Ankara). Genomik DNA'ların FastDNA kiti (Qbiogene, Montreal, PQ, Canada) kullanılarak ekstraksiyonu yapılmıştır. 16S rRNA geni genomik DNA'dan evrensel primerler olan 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' ve 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. ABI 3100 Genetic Anaylzer cihazı kullanılarak sekanslar yürütülmüş ve 1,449 bç sekansı otomatik olarak ABI PRISM 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) ile tespit edildikten sonra, sekanslar BLAST kullanılarak GenBank database (NCBI) ile karşılaştırılmıştır (Altschul, Gish, Miller, Myers ve Lipman, 1990). Suşların 16S rRNA gen sekansları CLUSTAL W programı ile alignment yapılmıştır (Thompson, Higgins ve Gibson, 1994). Neighbour joining yöntemi ile bakteriler arasındaki akrabalık ilişkileri MEGA 6.0 software ile belirlenerek filogenetik ağaç çizilmiştir (Tamura, Dudley, Nei ve Kumar, 2007).

3.2.4. Bakterilerin Gram ve Spor boyaması

Gram boyama

Bakterilerin Gram boyama işlemi yapılmıştır (Temiz, 1994). 18 saatlik taze bakteri kültürü steril öze lam üzerine ile alınmış ve 1 damla steril distile damlatılarak yayma preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan lamlar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruma tamamlanınca tespit işlemi (fiksasyon) için lamlar alevden geçirilmiştir. Lamların üzerini kaplayacak şekilde % 1' lik kristal viyole damlatılmış ve 1 dakika beklenilmiştir. Kristal viyole uzaklaştırılmış ve lamların üzerine % 0.5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) solüsyonu dökülerek 1 dakika beklenilmiştir. Lugol boyası distile su ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, lamlar % 95' lik etil alkol ile yıkanmıştır. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra lam üzerine 10 mL % 95' lik alkol'ün içerisine % 0.25 gr safranin eklenerek hazırlanan solüsyon damlatılmış ve 45 saniye beklenilmiştir. Daha sonra, boya uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan preparatların havada kurutulması sağlanmış ve immersiyon yağı ile 10x100' lük oblektifte, Olympus CX31 marka ışık mikroskobunda incelenmiştir. Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pempe renkli görünümleri ile ayırt edilmişlerdir.

Spor boyama

Özkaya-Durlu (2000)' nun belirttiği yönteme göre spor boyama işlemi yapılmıştır. 1 damla sölom sıvısı lam üzerine yayılarak havada kurutulmuştur, daha sonra alevden geçirilerek fiksasyon ilşemi yapılmıştır. Lamlar üzerine lam boyutunda kurutma kağıdı üzerine % 5'lik malaşit yeşili solüsyonu damlatılmış ve lamlar kaynar su üzerinde 5 dakika bırakılmıştır. Kurutma kağıdı kurudukça lam üzerine boya ilave edilmiştir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanmış ve üzerine safranin damlatılarak 30 saniye beklenilmiştir. Distile suyla yıkanıp havada kurutulmuş ve sporlar morfolojileri, Olympus CX31 marka araştırma mikroskobunda incelenmiştir.

3.2.5. Sölom sıvısında bazı enzimlerin aktivitesinin ölçülmesi

Bazı önemli enzimlerin sölom sıvısında olup olmadığını belirlemek üzere proteaz, amilaz, selülaz, fitaz ve lipaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapılmıştır.

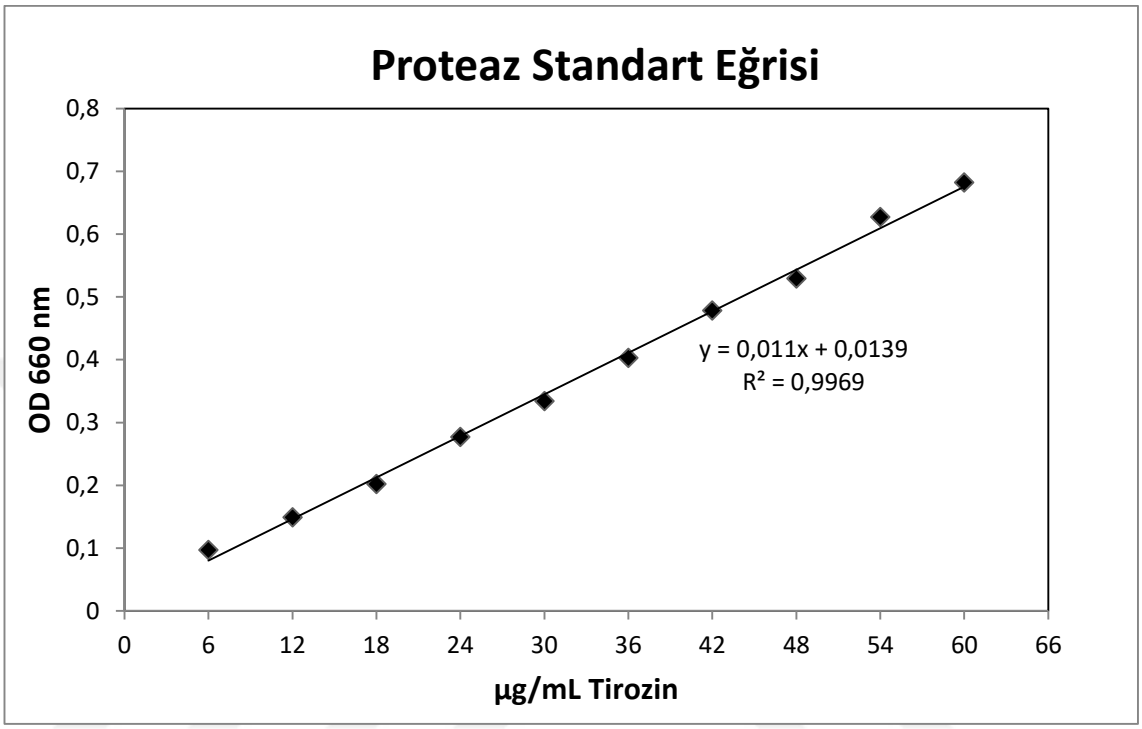
Proteaz tayini

Anson tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu ile proteaz tayini tespit edilmiştir (Keay ve Wild, 1970). Proteaz aktivitesini belirlemek için, %2'lik kazein çözeltisi substrat olarak kullanılmıştır. Bunun için; 2 gram kazein 20 mL 0.1 M NaOH içerisinde tamamen çözülünceye kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile 7.0'ye ayarlanmıştır.

Proteaz tayini için, 1 adet kör tüp ve sölom sıvısı için 1 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Örnek tüpüne 1'er mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 2 mL Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpleri reaksiyon sıcaklığına getirmek üzere 10 dakika 37°C su banyosunda tüpler tutulmuştur. Daha sonra, örnek tüpe 1 mL sölom sıvısı, kör tüpe ise 1 mL sodyum-fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek, 10 dakika 37°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak amacıyla örnek tüp içerisine, 2 mL 0.4 M TCA ve kör tüpüne de 1 mL substrat eklenmiştir. Tüpler, 20 dakika, 37°C'de beklenilmiş ve bu sürede tüplerde gözlenen pütürlü yapıyı gidermekiçin 6000 devir/dakika'da 10 dakika süre ile santrifüj yapılmıştır.Daha sonra elde edilen süpernatanttan alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M $NaCO_3$ ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiştir. Vorteksleme sonrası tüpler karanlıkta 20 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra çözeltinin optik yoğunluğu(OD), 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

0-60 lg/mL tirozin solüsyonları kullanılarak standart bir eğri oluşturuldu. Bu eğri yardımıyla proteaz aktivitesi saptanmıştır (Şekil 3.2).

Yönteme göre 1 µg/ml tirozin, 2 UI/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir. Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1µg/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Keay ve Wildi, 1970).



Şekil 3.2. Tirozin standart grafiği.

Amilaz tayini

Yoo, Hong ve Hatch (1987)'ın kullandıkları dekstrinojenik bir yöntem olan iyodimetrik yöntem kullanılarak amilaz aktivitesi tayin edilmiştir.

Subsrat çözeltisi olarak % 5' lik nişasta kullanılmıştır. Bu çözeltiden 2,5 ml alınmış ve 0,04 M fosfat tampon çözeltisi (pH 5.9) ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

Deneylerde örnek (sölom sıvısı içeren) ve kontrol tüpü (tampon içeren) olmak üzere 2 tüp kullanılmıştır. Her iki tüpe de 5' er mL substrat çözeltisi konulmuş ve tüpler 10 dakika, 37°C' lik su banyosunda reaksiyon sıcaklığına getirilmesi sağlanmıştır. Süre sonunda, örnek tüpe 0.5 mL sölom sıvısı, kontrol tüpüne ise 0,04 M fosfat tampon (pH 5.9)'dan

0.5 mL ilave edilerek 10 dakika 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla tüplere 5' er mL HCI eklenmiştir. Tüpler vorteklenmiş ve karışımdan 0.5 mL alınarak içinde 5 mL iyot çözeltisi bulunan başka bir tüpe aktarılmıştır. Tüplerin 620 nm' deki optik yoğunlukları iyot çözeltisine (kör) karşı okunmuştur. İyot çözeltisi 100 ml distile su içerisinde 5.0 gr KI ve 500 mg I bulunan stok çözeltiden 1 mL alınıp, 100 ml distile suya ilave edilmek suretiyle günlük taze olarak hazırlanmıştır.

Sölom örneğindeki enzim aktivitesi aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır (Yoo, Hong ve Hatch, 1987).

Aktivite (Unit/ml) = D. [(R0-R)/R0] x100
Formülde;
D: Enzim dilüsyon faktörünü (varsa),
R0: Kontrol tüp OD'si
R: Örnek tüp OD'si
100: Stok iyot çözeltisinin 100 kez seyreltilmiş olduğunu ifade etmektedir.

Örnekteki enzim aktivitesi yukarıdaki formüle göre Unit (IU) cinsinden hesaplanmış olup, pH 5.9' da ve 37°C' de 1 mL enzim çözeltisinin 10 dakika içerisinde % 0.1' lik nişasta çözeltisindeki 1 mg nişastayı hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Selülaz tayini

Selülaz enzim aktivitesinin tayininde Miller (1959)'in kullandığı yöntemden faydalanılmıştır. Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak %1 karboksil metil selüloz (CMC) kullanılmıştır (50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponuna CMC eklenmiştir). Substrat çözeltisi günlük taze olarak hazırlanmıştır. DNS çözeltisi için; 20 mL 2N NaOH içerisinde 1 g DNS ve 50 mL distile su içerisinde 30 g Na-K-Tartarat çözüldükten sonra, iki çözeltiyi alev üstünde homojen olana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra distile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Garriga ve diğerleri 2017).

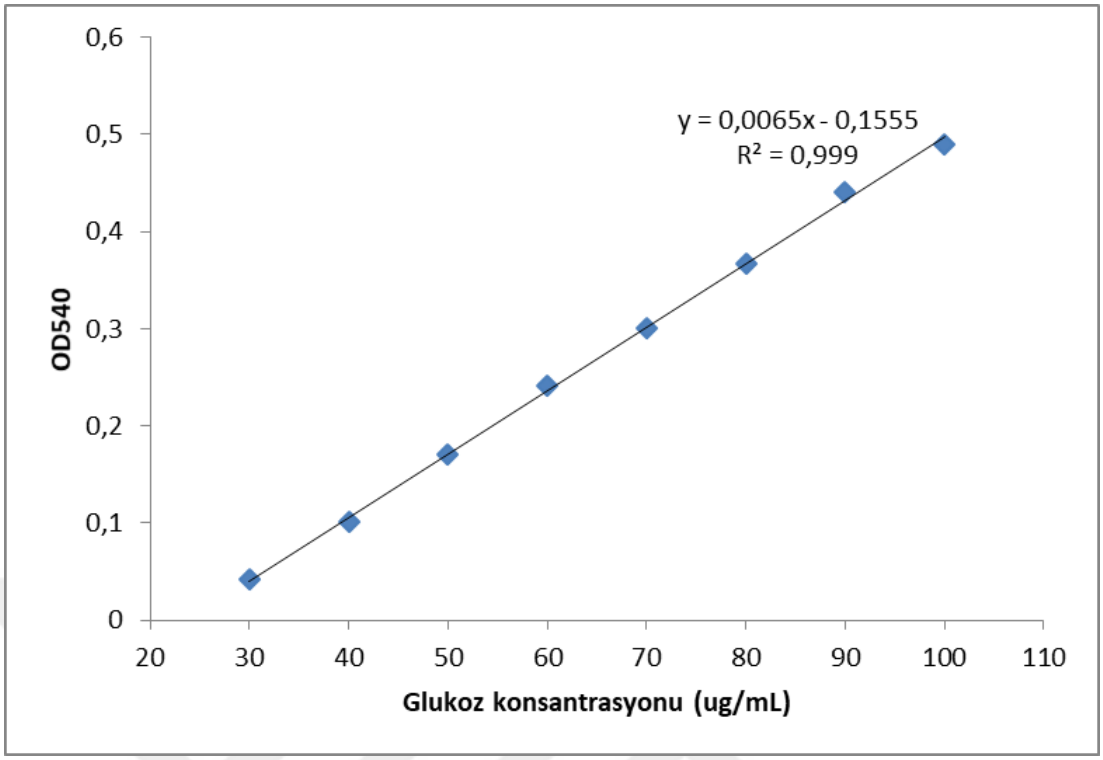
Aktivite tayinimde, 1 adet kör tüp ve sölom sıvısı için 1 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Örnek tüpüne 0,5 mL %1 CMC substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 0,5 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 5 dakika reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Örnek tüpe 0.5 mL sölom sıvısından, kör tüpe ise 0,5 mL sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ilave edilmiştir. Her iki tüp, 30 dakika boyuınca 37°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. Reaksyiyonu durdurmak amacıyla, inkübasyon sonunda örnek tüpe1 mL DNS çözeltisi eklenmiş ve tüpler 5 dakika kaynar suda bekletilmiştir. Daha sonra tüpler soğutulmuştur. Örneklerin absorbansları köre karşı spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

Bir unite (U) enzim aktivitesi, deneysel koşullar altında dakikada 1 µmol glukozu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle göre hesaplanmıştır (Roopa, Charulatha ve Meignanalakshmi, 2017);

$$\mathrm{U/mL} = \frac{\text{Serbestleşen Glukoz}}{\text{Süre}x\text{Kullanılan Enzim Hacmi}} x\text{Dilüsyon Faktörü (varsa)}$$

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-100 µg/mL glukoz çözeltileri hazırlanmıştır. Glukoz miktarı, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Glukoz standart grafiği

Fitaz tayini

Fitaz aktivitesinin tayini için Choi, Suh ve Kim (2001)'in kullandıkları yöntemden faydalanılmıştır.
Substrat çözeltisi olarak 2mM Na-Fitat, 50 mL 0,1M Tris-HCl (pH 7.0) tampona eklenmiş ve günlük taze olarak hazırlanmıştır.

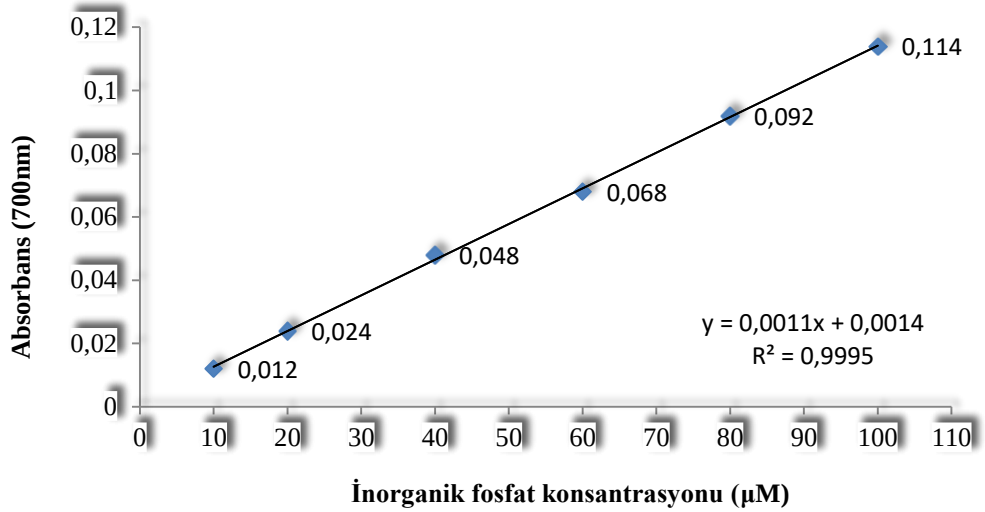
Deneylerde 1 adet kör tüp ve 1 adet sölom sıvısı için örnek tüp olmak üzere 2 adet tüp kullanılmıştır. Örnek tüpüne 0.9 mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 0,75 mL TCA çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler 5 dakika süre ile 37°C'lik su banyosunda reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra örnek tüpe 0.1 mL sölom sıvısından, kör tüpe ise 0,1 mL Tris-HCl (pH 7.0) tamponu ilave edilerek 30 dakika boyunca 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksyiyonu durdurmak için, örnek tüpüne 0,75 mL TCA çözeltisinden eklenmiştir. Kör tüpüne ise 0,9 mL substrat eklenmiş ve tüpler vortex'te karıştırılmıştır. Bu karışıma % 5,5 sülfürik asitle hazırlanan % 2,5 amonyum molibdat çözeltisi ile % 2,5 ferroz sülfat renk reaktifinden 1,5 mL ilave edilmiş ve örneklerin absorbansları köre karşı spektrofotometrede ölçülmüştür.

Enzim akivitesi Unit (IU) cinsinden hesaplanmış olup, standart deney koşullarında dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Anonim, 2014).

Enzim Aktivitesi (U /mL) = Pi (µM) / t (dk) x VE (mL)

Pi: Salınan fosfatın miktarı
t: Zaman
VE: Kullanılan enzimin hacmi

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda (0-100 µM) standart KH_2PO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. Inorganik fosfor miktarı, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İnorganik fosfat standart grafiği.

Lipaz tayini

Lipaz enzim aktivitesinin tayini için Sugihara, Tani ve Tominaga (1991)'nın yöntemine göre titrimetrik analiz metodu kullanılmıştır. Sölom sıvısında lipaz enziminin aktivitesi tespit etmek için inkübasyon ortamına 1 mL zeytinyağı (olive oil), 4.5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0,5 mL 0,1 M $CaCl_2$ ve 1 mL sölom sıvısı konulmuştur. Kör olarak kullanıldığı tüpe diğer tüpteki tüm kimyasallar konulmuş, sadece ham enzim yerine tampon eklenmiştir. Tüpler vorteks ile iyice karıştırılmış ve 30 dakika boyunca 37°C'de 150 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda %99,8 etanolden 20 mL eklenerek inkübasyon durdurulmuştur. Daha sonra 50 mM KOH içeren büret kullanılarak inkübasyon ortamının pH'sı 10.5'e kadar titre edilmiştir.

Enzim aktivitesi Unit (U/mL) cinsinden hesaplanmış olup, standart deney koşullarında 1 µmol yağ asidini açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Akyıl, 2013).

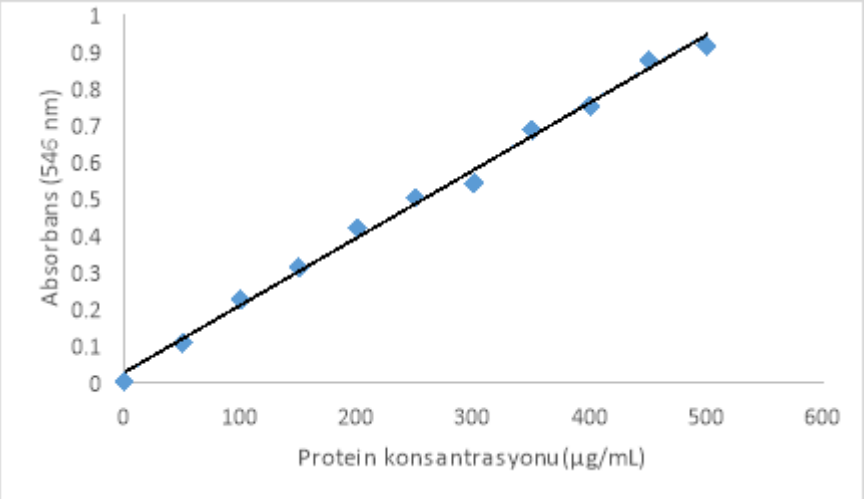
$$\frac{50 \times \text{Harcanan KOH miktarı}}{30\ (\text{Süre (Dk)}) \times \text{Harcanan enzim miktarı (mL)}} = \text{U/mL}$$

3.3. Sölom Sıvısında Protein ve Glukoz Tayini

Protein tayini, standart olarak 'Sığır Serum Albumin'(BSA)'i kullanılarak Lowry, Rosebrough, Farr ve Randall (1951)' nin metoduna göre yapılmıştır. Protein standart grafiğinin oluşturmak amacıyla, 0,005 gr BSA 10 mL distile suda çözünmüştür. Konsantrasyonu 0-500 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbansları 546 nm'de ölçülmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

Ayıraç A: % 3' lük Na_2CO_3 (0.1 N NaOH'da çözünmüş)
Ayıraç B: % 1' lik CuSO4 (% 1'lik K-Na- tartarat'da çözünmüş)
Ayıraç C: % 2'lik K-Na-tartarat
Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (25:1:1 oranında).
Ayıraç E: 1,1 oranında seyreltilmiş Folin ciocalteus fenol ayıracı

1 mL sölom örneğinden alınmış ve üzerine 5 mL D ayıracından eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. Kör için ise 1 mL distile su ve D ayıracından 5 mL konularak aynı işlemler yapılmıştır. Daha sonra 0,5 mL E çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra karanlık bir ortamda 20 dakika boyunca bekletilmiştir. 546 nm'de köre karşı, absorbansları okunarak sonuçlar elde edilmiştir. Okunan bu absorbanslar standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Protein standart grafiği

Sölom sıvısındaki glukoz tayini için DNS (Dinitrosalisilik Asit) yönteminden yararlanılmıştır (bzk 3.2.5 selülaz aktivitesi) (Miller, 1959).

3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Karbohidrat Tayin

Sölom sıvısında glukoz ve maltoz şekerlerini saptamak amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) yönteminden faydalanılmıştır (Stahl, 1965). Standart olarak saf ticari glukoz ve maltoz (Merck) şekerleri kullanılmıştır. Sölom sıvısında karbohidrat çeşidini saptamak amacıyla hazır silika jel plakaları (20×10 cm boyutunda, 0.2 mm incelikte, Merck) kullanılmıştır. Örnekler plakanın altından 2 cm yukarıda ve örnekler arası en az 1.5 cm olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla 5 µl olarak tatbik edilmiş ve plakaların oda sıcaklığında kurutulmuştur. Çözücü olarak butanol; etanol; distile su (5:3:2) karışımı kullanılmıştır (Jensen, Olsen ve Allermann, 1988). Plaka aşağıdan yukarı usulüne göre, içinde çözücü bulunan kromatografi tankına dikey olarak, çözücüye alt kenarından 1.5 cm batacak şekilde konulmuştur. Plaka tank içerisinde çözücü 10-15 cm yukarıya çıkıncaya kadar tutulmuştur. Daha sonra plaka çıkarılmış ve 110^0C'lik pastör fırınında 10 dakika süre ile kuruması sağlanmıştır. Plaka şekerlerin görünmesini sağlamak için plaka üzerinde sülfürik asit: metanol (1:3, v/v) çözeltisi dikkatlice püskürtülmüştür. Püskürtme işleminden sonra plaka tekrar 10 dakika sure ile 110^0C'lik

etüvde kurutulmuştur. Karbohidratlar beyaz plaka üzerinde siyah ya da kahverengi noktalar halinde görünür hale getirilmiştir (Robty ve White, 1987).

3.5. SDS-PAGE (Sodyum-Dodesil-Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Profilinin Ortaya Çıkarılması

Sölom sıvısının protein profilinin belirlenmesi amacıyla Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970).

3.5.1. SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması%30 Akrilamid

Polimer matriksi kurmak için akrilamid ve N, N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bu amacla 28,8 gr akrilamid ve 1,2 gr bis akrilamid tartılıp distile su ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No. 1 filtre kağıdından süzülerek, kahverengi bir şişede 0-5ºC' de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir (Sarıkaya, 1995).

1 M Tris-HCl (pH 6.8) Tamponu

12,11 gr Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$) bir miktar suda çözülmüş ve pH 6.8'e ayarlanarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M Tris-HCl (pH 8.8) Tamponu

12,11 gr Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$) bir miktar suda çözüldükten sonra pH 8.8'e ayarlanarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%10'luk Amonyum Per Sulfat (APS)

10 gr APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Örnek Tamponu

SDS-PAGE için Çizelge 3.1'deki örnek tamponu hazırlanmıştır.

Her bir örnek için 100 µl stok solüsyondan alınmış ve üzerine 5 µl β-mercaptoetanol eklenmiştir. Spatül ucu kadar Bromfenol Mavisi eklenip vortekslenmiştir.

Çizelge 3.1. Örnek Tamponun içerikleri

Tampon İçeriği	
1 M Tris-HCl pH 6.8	6,5 mL
Gliserol	10 mL
SDS	2 gr
Distile H_2O	100 mL

Yürütme Tamponu (Running Buffer)

Yürütme tamponu Çizelge 3.2'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Yürütme Tamponun içerikleri

Yürütme Tampon İçeriği	
Tris Base	0,3 gr
Glisin	1,44 gr
SDS	1 gr
Distile H_2O	100 L

Yıkama Çözelti

Yıkama çözelti Çizelge 3.3'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Yıkama Çözeltinin içerikleri

Yıkama Çözelti İçeriği	
İzopropil alkol	25 mL
Asetik asit	10 mL
Distile H_2O	65 mL

Boyama Çözeltisi

Boyama çözeltisi Çizelge 3.4'deki malzemeler ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Boyama Çözeltisi içerikleri

Boyama Çözelti İçeriği	
Commassie-brilliant R- 250 mavisi	0,15 gr
İzopropil alkol	25 mL
Asetik asit	10 mL
Distile H_2O	65 L

3.5.2.SDS-PAGE yönteminde kullanılan jelin hazırlanması ve elektroforez işlemi

SDS PAGE için %10 ayırma jeli (Çizelge 3.5) ve %4 yükleme jeli (çizelge 3.6) olmak üzere iki tip jel hazırlanmıştır

Çizelge 3.5. SDS-PAGE için kullanılan %10 ayırma jelin içerikleri

Ayırma Jelin İçeriği (20 mL için)	
1M Tris-HCl (pH 8.8)	5 mL
%30 Akrilamid	6,8 mL
Distile H_2O	8 mL
%20 SDS	100 µL
APS (100 mg/mL)	100 µL
TEMED	10 µL

Çizelge 3.6. SDS-PAGE için kullanılan %4 yükleme jelin içerikleri

Yükleme Jelin İçeriği (5 mL için)	
Distile H_2O	3,05 mL
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25 mL
%10 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	650 µL
APS (100 mg/mL)	25 µL
TEMED	5 µL

Jellerin hazırlanmasında TEMED polimerleştirici ajan olduğundan dolayı karışıma eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırılmış ve çözelti hemen cam plakalar arasına dökülmüştür. Örnekler

hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüş ve üzerine isopropil alkol dökülerek, polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra alkol uzaklaştırılmış ve distile su ile üst kısım yıkanmıştır. Kurutma kağıdı ile kalan su uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yükleme jeli de aynı yöntemle plakaların arasına dökülmüş, elektroforez tarağı yerleştirilmiştir. Jelleşme tamamlandıktan sonra tarak çıkarılmış ve kuyucukların düzgün bir şekilde oluşması sağlanmıştır. Elektroforez tankının alt ve üst hazneleri yürütme tamponu ile doldurulmuştur.

On bir farklı protein içeren (Cell Signaling Technology Prestained Protein Marker 13953S) çözelti standart olarak kullanılarak lipaz enziminin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Enzim örneklerinden 75 µl alınmış ve ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µl örnek tamponu eklenmiştir. Daha sonra tüpler kaynar suda 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Tanka konmuş olan jeldeki ilk kuyucuğun içerine mikropipet yardımıyla 5 µl protein marker ve ardından diğer kuyucukların içerlerine 10 µl örnek konmuş ve tanka 150 V sabit akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi durdurulmuştur. Elektroforez işlemi yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice çıkarılarak, boyama çözeltisi içerisinde 50 rpm çalkalayıcıda 1 gece boyunca bekletilmiştir. Boyanan jelden fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla yıkama çözeltisi ile birkaç defa yıkanmış, boyanın uzaklaştırılması ile bantların görünür hakle gelmesi sağlanmıştır.

3.6.Sölom Sıvısının Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti

Antimikrobiyal madde tespiti için Agar Kuyu Difüzyon Metodu (Agar Well Diffusion Method) kullanılmıştır (Haque, Sen ve Pal, 1995). Antimikrobiyal maddelerin taranmasında *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *Y. enterocolitica* (ATCC 9610), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *E. faecalis* (ATCC 29212) , *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. epidermidis* gibi farklı patojen test mikroorganizmaları denemeye alınmıştır. Test mikroorganizmaları Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü'nden önceden temin edilmiştir. Çalışmada karşılaştırma yapmak için standart

antibiyotik olarak 100 µl seyreltilmiş basitrasin (Merck), ampisilin (Calbiochem), penisilin (Merck) çözeltileri kullanılmıştır. Kullanılan standart antibiyotikler ve filtre edilmiş sölom sıvısı 1 mg/mL arasında olacak şekilde hazırlanmıştır.

Her bir test bakterisi Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerinde 24 saat 37 °C' de üretilmiştir. McFarland ile 0.5 bulanıklılığına ($1.5x10^8$ CFU/mL) ayarlanan bakteri kültürlerinden steril eküvyonlar ile alınan örnekler steril petri kabında Nutrient Agar (NA) içeren katı besiyerine inoküle edilmişlerdir. Petri kaplarında steril şartlarda 7 mm çapında kuyucuklar açılmış ve filtre edilmiş sölom örneğinden ve standat antibiyotiklerden 100 µl olacak şekilde kuyucuklara doldurulmuştur. Her NA petri kabındaki kuyucuklardan bir tanesi kontrol olarak damıtılmış su ile doldurulmuştur. Daha sonra petri kapları 24-48 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zonları kontrol edilmiş ve cetvelle (mm) ölçülmüştür. Sonuçlar standart olarak kullanılan ticari antibiyotiklerle karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sölom sıvısındaki bakterilerin 16S rRNA mikrobiyal adlandırılması (Filogenetik Analiz)

Nutrient Agar besiyerinde sölomik sıvının bakteriyel yükü 10^3 CFU/mL olarak belirlenmiştir**.** Petri kabında 100'den fazla bakteri kolonisi olduğundan, morfolojik olarak farklı dört bakteri seçildi. Bakteriler 5,6,7 ve 8 olarak adlandırıldılar. RefGen-Biyoteknoloji (Ankara) tarafından 16S rRNA gen sekansına dayalı bir filogentik ağaç ile 4 bakterinin tür düzeyinde isimlendirilmesi yapılmıştır. Yapılan filogenetik analiz analiz sonucunda bakteri 5,6, ve 8'in *Bacillus cereus* strain MCDA10-2 (2) ile, bakteri 7'nin ise *Bacillus thuringiensis* strain ATCC 10792 ile %100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. CF'de bakteri yükü (A), bakterilerin 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı (B)

16S rRNA analizini yapmak için gen bölgesine özel olarak bakteri 5 için 27F_C03 ve 907R_G03 (Çizelge 4.1), bakteri 6 için -27F_D03 ve 907R_H0 (Çizelge 4.2), bakteri 7 için 27F_E03 ve 907R_A04 (Çizelge 4.3), bakteri 8 için 27F_F03 ve 907R_B04 (Çizelge 4.4), primerleri kullanılmıştır. Çizelgelerde verilen kromotogram bakterilerin 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün göstermektedir.

Çizelge 4.1. Bakteri 5 için 27F_C03 ve 907R_G03 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>Bakterı5-27F_C03

GGGGGGCTGGGGGGTGCCTATACTGCAGTCGAGCGATGGATTAGAGCTTGCTCTTATGAA
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTT
TCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTG
AGTTACGCATTAGCACTCCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAGCTGAACCAAAATAGAAATT
GACCGGA

>Bakterı5-907R_G03

CGTCGCGGACTCCCCGGCGGAGTGCTTATGCGTTACTTCAGCACTAAAGGGCGGAACCCT
CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACTGTTTGCTCCC
CACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCT
CCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGT
CTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAA
CCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTA
TTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACT
CACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTAC
GCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCA
TAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTCGAACCATGCAGTTCAAATGTTATCCGGTAT
TAGCCCCGGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGTTACCCACGTGTTACTCACC
CGTCGCGCTAACTTCATAGAGCAGCTCTTAATCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCAC
GCCGCCAGCGTCATCCTGAGCAGGGATACAAACTCCTAAG

Çizelge 4.2. Bakteri 6 için -27F_D03 ve 907R_H0 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>Bakteri6-27F_D03

AGGAACTTGCGGCGTGCTATACTGCAGTCGAGCGAATGGATTAGAGCTTGCTCTTATGAA
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCACCCG
TGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGTCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG
TAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGACTGCTAACTGTTAAAGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCCATGCTTGAACTCAAATGAAATTGACCT
GTA

>Bakteri6-907R_H03

CCTTCGGCGACTCCCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTACTTCAGCACTAAAGGGCGGAACCC
TCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT
CCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCCTCCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTC
AAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAA
GAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCA
GCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCA
TCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGG
CTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCA
TCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTCGAACCATGCAGTTCAAATATTATCCG
GTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT
CACCCGTCGCGCTAACTTCATAGAGCAGCTCTAATCCATTCGCTCGACTGCATGTATTAGG
CCCGCCGCCAGCGTCATCCTGACAGGAGAAATCAAATCTCTATG

Çizelge 4.3. Bakteri 7 için 27F_E03 ve 907R_A04 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>Bakterı7-27F_E03

GGGGGTACTGGCGGCGTGCTATACTGCAGTCGAGCGATGGATTAGAGCTTGCTCTTATGA
AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTC
CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGC
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAA
CCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGATATGGACGAACACCAGTGTTGAATCGACTTTCTGGT
CTGTAACTGACACTGAGGCGTGAAGCGTGGTTGACAAACATGACTAAGATACCCTTGGTA
GTCCTCGCCGAAACGATGAGTGCTTACTGCTAGAGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTG

>Bakterı7-907R_A04

CCTTTCGCGTCTCCCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTACTTCAGCACTAAAGGGCGGAACCCT
CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CCTCCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCA
AGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
AAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAG
CTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCAT
CACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGC
TACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCAT
CCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTCGAACCATGCAGTTCAAATGTTATCCG
GTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT
CCACCCGTCGCGCTAACTTCCGAGAGCAGCTCTTAATCCATTCCCCTCGACTTGCATGTAT
TAGCCCGCCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCAGGAGATACAAACTCTGAAG

Çizelge 4.4. Bakteri 8 için 27F_F03 ve 907R_B04 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>Bakterı8-27F_F03

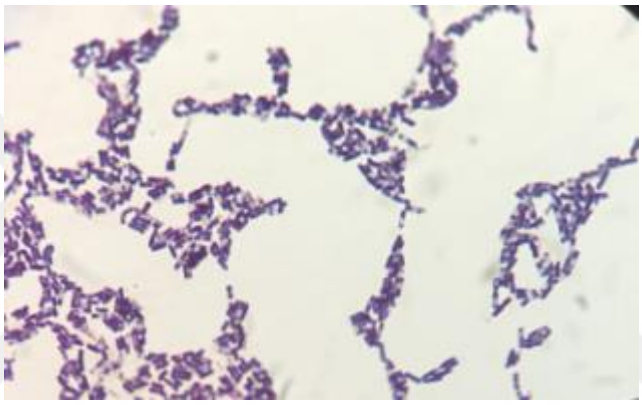
ACGACTGCGCTGCATCTGAGTCAGCGATGATTAAGCTTGCTCTTTGATTGCGGGACGGTG
AACCGGGGTACCTGCCCTAAACTGGGATACTCCGGGAACCGGGGCTATACCGGATAAATT
TTGACCGATGGTTCGAATTGAAGGCGGCTTCGGCTGTCCTTATGGATGGACCCGCGTCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG
GTCGAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACG
GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAGCCCCGGCTCACCGTGAGGGTCATTGAAACTGGAGACTTGAGTGCAAAGAGAAGTGA
ATTCATGTGTAGCGTGAATGCGTAGAGATATGAGGACACAGTGCGAGCGACTTTCTGTCT
GTACTGACACTGAGCGCGAAGCGTGGGAGCAACAGATAGATACTCTGTAGTCCACGCCGT
AACGATGAGTGCTAGTGTAGAGGTTCCGCCTTAGTGCTGAGTAACGCATAGCACTCCCTG
GGAGTACGGCGCAGCTGATCAAAGAGATTACGGA

>Bakterı8-907R_B04

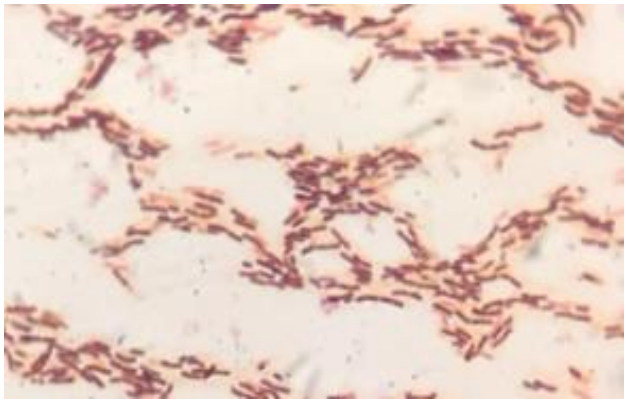
CTTGGGCCGTCTCCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTACTTCAGCACTAAAGGGCGGAACCCT
CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CCTCCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCA
AGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
AAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAG
CTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCAT
CACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGC
TACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCAT
CCAGTAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCATGTTCGAACCATGCAGTTCAAATATTATCC
GGTATTAGCCCCGGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTAC
TCACCGTCGCGCTACTTCATAGAGCAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAG
GCACGCCGCCAGCGTCATCCTGACAGAGGATCAAACTACT

4.2. Bakterilerin Gram boyama ve Spor boyaması

Denemeye alınan bakterilerde gram boyama ve spor boyama işlemleri 3.2.3.5' e göre yapılmıştır. Gram boyamada ilk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tuttuğu ve mor menekşe bir renk gösteren bakteri Gram (+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.2). Son boyayı (safranin) içinde tutan bakteriler ise pembe renk gösterdiğinden dolayı Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3). Sölom sıvısında hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilere rastlanılmıştır. Bakterilerin çubuk şeklinde olduğu görülmüştür.

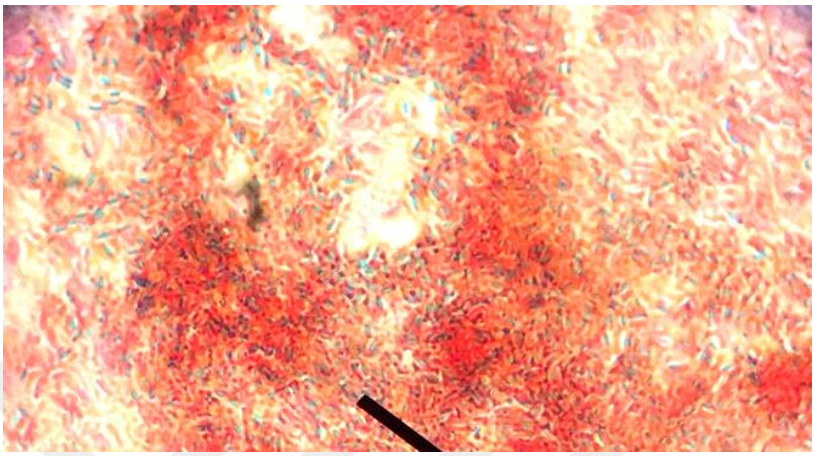


Şekil 4.2. Gram (+) bakterinin ışık mikroskobunda görünümü (10X100)



Şekil 4.3. Gram (-) bakterinin ışık mikroskobunda görünümü (10X100)

Spor boyamada ise bakterilerin sporlu (yeşil renkte görülmektedir) oldukları saptanmıştır (Şekil 4.4). Sporların hücre içindeki konumunun santral (merkez, ortada) bölgede olduğu görülmüştür. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopında, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapılmıştır.



Şekil 4.4. Spor boyama (10X100)

4.3. Sölom Sıvısında Bazı Enzimlerin Aktivitesinin Ölçülmesi

Sölom sıvısında bazı önemli enzimlerin varlığını belirlemek üzere proteaz, amilaz, selülaz, fitaz ve lipaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimlerin varlığı tespit edilmiştir. Yüksek miktarda fitaz (528 U/mL) ve amilaz (496 U/mL) enzimleri saptanmıştır. Proteaz (115 U/mL) ve selülaz (48 U/mL) enzim aktiviteleri de belirlenmiş olup, düşük miktarda lipaz (10 U/mL) enzimi saptanmıştır(Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *E.fetida*'nın sölom sıvısında tespit edilen enzimlerin aktivite değerleri ve bazı *Bacillus* sp.'lerden elde edilen enzim aktiviteler ile karşılaştırılması.

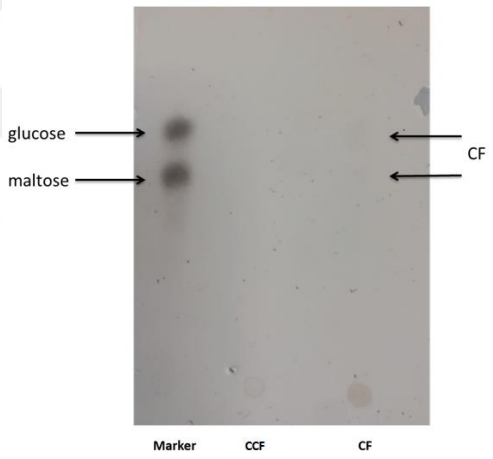
Enzimler	**Sölom Sıvısı**	***Bacillus sp.***	
	(U/mL)	**(U/mL)**	
Lipaz	9.5	6.6	(Demirkan,ÇetinkayaveAbdou, 2021)
Selülaz	48	68	(Myanski, 2020)
Amilaz	496.2	21.2	(Demirkan, Sevgi ve Baskurt, 2016)
Proteaz	115.6	224	(Sevinç ve Demirkan, 2011)
Fitaz	528	210	(Demirkan, Baygın ve Usta, 2014)

4.4.Sölom Sıvısında Protein ve Glukoz Tayini

Sölom sıvısında toplam protein ve glukoz tayini sonucunda toplam protein miktarı 5.68 mg/mL ve toplam glukoz miktarı 66 µg/mL olarak saptanmıştır.

4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Karbohidrat çeşidinin tayini

Çalışmada sölom sıvısında karbohidrat çeşidini olarak glukoz ve maltoz şekerini saptamak amacıyla kromatografi yönteminden faydalanılmıştır. Standart olarak saf ticari glukoz ve maltoz şekerleri (Merck) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda silika jel plakası üzerinde oluşan ürünler siyah ya da kahverengi noktalar halinde kalitatif olarak belirlenmiştir. Sölom sıvısında glukozun daha belirgin, maltozun ise silik bir şekilde görüldüğü saptanmıştır. Bununla birlikte, ticari CF'de (Commercial CF, CCF) şeker varlığı gözlenmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Ticari ve saf sölom sıvısında bulunan şekerlerin TCL ile gösterilmesi

4.6. SDS-PAGE (Sodyum-Dodesil-Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Profilinin Ortaya Çıkarılması)

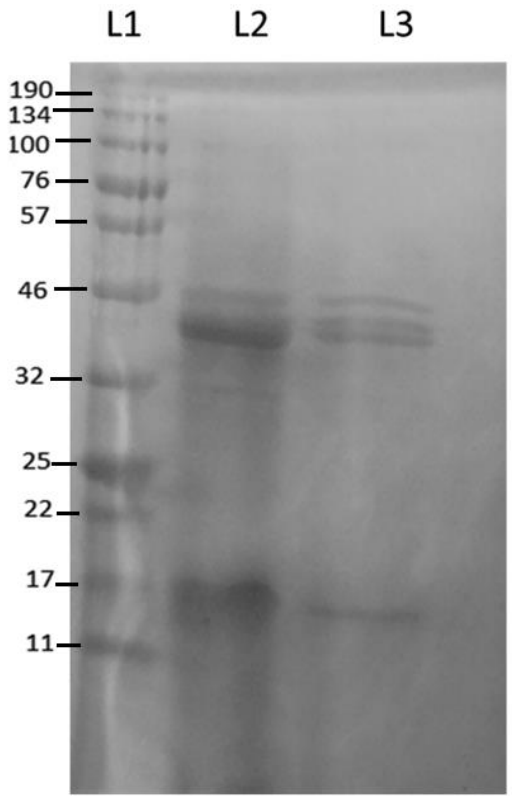
Sölom sıvısında hem proteinlerin profilini belirleme hem de proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla elektroforez yönteminden faydalanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elektroforez jeli üzerinde fazla sayıda silik ve az sayıda koyu protein

bantları gözlenmiştir. Bantlar birbirine yakın çıktığı için 1/10 oranında seyretilmiş sölom sıvısı içerisinde belirgin olarak 4 adet protein bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

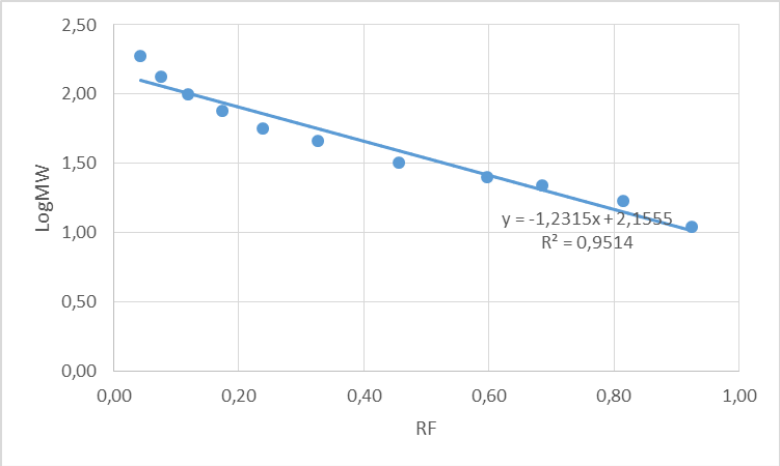
Proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlemek amacıyla, Rf değerlerinden yararlanılarak aşağıda verilen formüle göre proteinlerin ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

$$\boldsymbol{Rf} = \frac{\boldsymbol{Proteinin\ Aldığı\ Yol\ (cm)}}{\boldsymbol{İzleme\ Boyanın\ Aldığı\ Yol\ (cm)}}$$

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkları ile bir standart eğri elde edilmiştir (Şekil 4.7). Bu eğri yardımı ile bantlardaki proteinlerin tahmini moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen 4 banttan 3 tanesinin molekül ağırlıkları 46-32 kDa arasında, bir tanesinin 17 kDa olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Sölom sıvısında SDS-PAGE sonrası jelde protein bantlarının görünümü



Şekil 4.7. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri

4.7. Sölom Sıvısının Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti

Bu çalışmada, *E. fetida*'dan ekstrakte edilen sölomik sıvının (CF) üç gram pozitif bakteri (E. feacalis, S. epidermidis, S. aureus) ve beş gram negatif bakteriye (*E. coli, K. pneumonie, S. typhmurium, Y. enterocolitica, P. aeruginosa*) karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. CF'nin en iyi inhibitör etkileri *K. pneumoniae* (35 mm) ve *E. coli* (35 mm)'nin büyümesi üzerinde belirlendi (Çizelge 4.6). Standart antibiyotikle değerleri ile karşılaştırıldığında sölom sıvısının etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. CF'nin antibakteriyel etkisi en yüksekten en düşüğe şu şekilde incelenmiştir: *K. pneumoniae > E. coli = Y. enterocolitica > S. typhimurium > P. aeruginosa >S. aureus >S. epidermidis.*

Çizelge 4.6. CF'nin test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi

	İnhibisyon zonlarının çapları (mm)			
	(1 mg/mL)	Standart Antibiyotikler (1 mg/mL)		
Test bakterileri	CF	AMP	PEN	BAC
P. aeruginosa ATCC 35032	21	12	11	8
Y. enterocolitica ATCC 9610	25	21	12	15
K. pneumonie ATCC 70603	35	17	14	12
S. aureus ATCC 25923	20	20	24	15
S. typhmurium ATCC 14028	22	16	15	9
E. coli ATCC 25922	35	22	18	19
E. feacalis ATCC 29212	25	17	26	19
S. epidermidis ATCC 12228	15	9	12	10

BAC: Basitrasin, AMP: Ampisilin, PEN: Penisilin

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Solucanlar, kaba kullanım veya stres durumunda sölomdan dış ortama sıvı salmaktadır. Amoebositler, mukositler, dairesel hücreler ve kloragojen hücreler gibi sölomositlerden oluşan solucanların dorsal gözeneklerinden salınan sulu sıvıdan oluşan sölomik sıvı, patojenik mikroorganizmalara karşı mücadelede solucanların bağışıklığında çok önemli bir rol oynar. Solucanın sölomik sıvısında tıbbi değeri olan birçok kimyasal bileşen vardır. Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte solucandaki biyoaktif bileşikler, giderek daha fazla bilim insanının dikkatini çekmeye başladı (Cooper, Kauschke ve Cossarizza, 2002; Shen, 2010).

Bu çalışmada *E. fetida*'dan elde edilen sölomik sıvının bazı biyolojik özellikleri ortaya konmuştur. Nutrient Agar besiyerinde sölomik sıvının bakteriyel yükü 10^3 CFU/ml olarak belirlendi. Petri kabında 100'den fazla bakteri kolonisi gözlendi, bunlar arasında morfolojik olarak farklı dört bakteri seçildi. Bakteriler 5, 6, 7 ve 8 olarak adlandırıldılar. Bakteri 5, 6 ve 8'den alınan 16S rRNA gen dizilerine dayanan bir filogenetik ağaç, bu bakterilerin *Bacillus cereus* ile %100 dizi özdeşliğini paylaştığını gösterdi. Bakteri 7 ise *Bacillus thuringiensis* ile %100 benzerlik göstermiştir.

Yakkou ve diğerleri (2021), yeni tanımlanan solucanın CF'sinin kültürlenebilir bakteri topluluğunun yapısını analiz etti. 4 farklı kültür ortamında toplam 70 koloni ürediğini, 28 farklı bakteri izolatı ayırt edilebildiklerini rapor etmişlerdir. On altı izole bakterinin fenotipik ve genotipik çalışmaları, bunların *Pseudomonas, Aeromonas, Bacillus, Buttiauxella, Enterobacter, Pantoea* ve *Raoultella*'ya ait olduğunu göstermişlerdir.

Sölomik sıvıda rizosferdeki önemli rolleri kanıtlanan ve bitki gelişimi için faydalı bakteri olarak nitelendirilen türler vardır. Bunlar *Bacillus alttitudinis, Bacillus thuringiensis, Bacillus licheniformis, Pseudomonas azotoforman Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas helmanticensi, Pseudomonas azotoformans* olarak bildirilmiştir (Brown Feller, Blanchart, Deleporte ve Chernyanskii, 2003; Bhattacharyya ve Jha, 2012; Mishra ve diğerleri, 2014; Yousra, 2018).

Solucanların varlığı toprak verimliliğini, mikrobiyal ve enzimatik aktiviteleri önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca amilaz, selülaz, lipaz, lumbrokinaz, endoglukanaz ve β-glukosidaz gibi birçok sindirim enzimine sahip oldukları bilinmektedir. Enzimler, solucanların yiyecekleri sindirmesine yardımcı olur. Solucanlar, içerdikleri enzimler sayesinde, proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların sindirimini iyileştirmek için hayvan yemlerinde, ayrıca nişasta, deterjanlar, hayvan ve insan terapötiklerinin sakarifikasyonunda, kirli toprakların biyolojik olarak iyileştirilmesi için de önemlidir (Ramian, Arabi ve Hemmati 2018).

Bu çalışmada *E.fetida*'dan elde edilen sölomik sıvıda lipaz, selülaz, amilaz, proteaz, fitaz ve arilsülfataz enzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Sıvıda fitaz enziminin varlığı ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Bu enzimler sıvıda bulunan bakteriler tarafından salınmaktadır. Lipaz, selülaz, amilaz, proteaz ve fitaz için aktivite değerleri daha önceki çalışmalarımız olan *Bacillus* sp. bakterilerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Sölomda bulunan *Bacillus* bakterilerin de iyi birer enzim üreticisi oldukları belirlenmiştir. Diğer yandan, arilsülfataz değeri *Chlamydomonas reinhardtii* ile yapılan çalışmanın verileriyle de karşılaştırıldı. Arilsülfataz aktivitesinin CF'de oldukça düşük olduğu bulundu. Sıvıda fitaz enziminin varlığı ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sıvıda amilaz ve fitazın daha yüksek olması solucanın beslenmesinde fitat ve nişastalı gıdaların önemini göstermiştir.

Bazı araştırmacılar *E. fetida* sölomik sıvısındaki enzimleri araştırmışlardır. Akazawa ve diğerleri (2018), *E. fetida* sölomik sıvısında lumbrokinaz, amilaz, endoglukanaz, glukozidaz ve lipazın varlığını bildirmiştir. Solucan *E. fetida*'dan elde edilen ham nişasta sindiren (Amy I) ve soğuğa adapte edilmiş (Amy II) alfa-amilazlar Tsukamoto ve diğerleri (2021), tarafından saflaştırıldı ve karakterize edilmiştir.

Ramian, Arabi ve Hemmati (2018), *Allolobophora chlorotica* solucanından elde edilen sölomik sıvıda pH, sıcaklık ve metallerin amilaz enzimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.

Kauschke, Pagliara, Stabili ve Cooper (1997), *L. terrestris* solucanlarından elde edilen CF'de proteolitik enzimlerin varlığını bildirmiş, doğal PAGE ve jelatin-agar kaplamasından sonra farklı elektroforetik mobilitede sekiz proteaz tanımlamış ve bunların kimotripsin ve tripsin benzeri karakterlerini göstermiş ve nispeten ısıya dayanıklı bulunmuş, bir nötr ila bazik pH'da optimum aktivite ve esas olarak serin proteazları olarak sınıflandırılır.

Bilej, Brys, Beschin, Lucas ve Vercauteren, (1995), *E. foetida* solucanlarının CF'sinde bir sitolitik protein tanımladığını ve farklı memeli tümör hücre dizilerini parçalayabildiğini rapor etmişlerdir.

Yamaji ve diğerleri 1998), eritrosit lizisini indükleyen, solucan *E.foetida*'nın CF'sinden saflaştırılan Lysenin adlı yeni bir sfingomyelin spesifik bağlayıcı protein tanımlanmışlardır. Sölomik sıvıdan saflaştırılmış yeni bir 41 kDa proteini olan lysenin, eritrosit lizisine neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Kızılkaya ve Dengiz (2010), solucan *E. fetida* tarafından vermikompostlama sırasında üreaz, fosfataz ve arilsülfataz gibi enzim aktivitelerini bildirmiştir.

Eue ve diğerleri (1998), *E.fetida*'nın CF'sinde hemolitik aktivite bildirmiştir.

Vermikompost (solucan gübresi) uygulanmış topraklarda yetişen bitkilerin hastalıklara ve zararlılara karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Vermikompostun bitkiler üzerindeki antifungal ve antibakteriyel etkisi, solucanların çeşitli nedenlerle vücutlarından salgıladıkları sölomik sıvıdan kaynaklanmaktadır. Vermikompost ile karıştırılan sölomik sıvıdaki enzimler ve proteinler mantar, bakteri ve diğer zararlılara karşı etki ederek birçok hastalık ve zararlının olumsuz etkilerini zayıflatır (Wang, Sun ve Zheng, 2006).

Bu çalışmada, *E. fetida*'dan ekstrakte edilen sölomik sıvının (CF) üç gram pozitif bakteri (*E. feacalis, S. epidermidis, S. aureus*) ve beş gram negatif bakteriye (*E. coli, K. pneumonie, S. typhmurium, Y. enterocolitica, P. aeruginosa*) karşı antimikrobiyal

aktivitesi araştırıldı. CF'nin *K. pneumoniae* ve *E. coli* üremesi üzerinde oldukça fazla bir inhibitör etkiye sahipolduğu belirlenmiştir. Özellikle standart ticari antibiyotikler ile karşılaştırıldığında bunlardan daha yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, CF'nin çeşitli test bakterileri üzerinde oldukça fazla bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu açıkça göstermiştir.

Solucanlar, çevrelerinde her zaman patojen mikroorganizmaların istilasıyla karşı karşıya olmalarına rağmen, evrimin ilk aşamalarından beri savunma sistemlerinin yardımıyla yaşamaktadırlar (Engelmann, Kiss, Csöngei, Cooper ve Németh, 2004). Solucanların sölomik sıvısının 40'tan fazla protein içerdiği ve proteolitik, sitolitik, antimikrobiyal, hemolitik, tümörolitik, hemaglütinasyon ve mitojenik aktiviteler gibi çeşitli önemli biyolojik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (Cooper ve Roch, 2003, Omar, Ibraheim, El-Shimy ve Ali, 2012).
Solucanların CF'sinde antibakteriyel maddelerin varlığına ilişkin birçok araştırma bulunmaktadır. Valembois, Lassegues ve Roch, (1992), solucan *E. fetida*'nın CF'sinin, solucan patojenik bakteri olark Gram (-) *Aeromonas hydrophila* ve Gram (+) *Bacillus megaterium*'a karşı. antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir:

Scherbert ve Messner (1997), bazı lizozim benzeri molekülleri bakterolitik moleküller olarak tanımladılar ve sadece gram pozitif bakterilere karşı aktif bulmuşlardır.

Murugan ve Umamaheswari (2021), *Eudrilus eugeniae*'nin CF'sini gram pozitif bakteriler (*S. faecalis, B. subtilis, Micrococcus luteus*) ve gram negatif bakteriler (*E. coli, Salmonella abony, P. aeruginosa*) üzerinde test etti ve üreme üzerindeki en iyi inhibitör etkileri *P. aeruginosa* ve *B. subtilis* üzerinde belirlemişlerdir.

Tutar ve Karaman (2017), *E. fetida*'dan elde edilen CF'nin *Pseudomonas syringae, Xanthomonas campestris, Xanthomonas carotae, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi* ve *Pseudomonas cepacia* mikroorganizmalarına karşı inhinisyon zon çaplarını 8-54 mm arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Milochau, Lassègues ve Valembois (1997), *Eisenia andrei*'nin sölomik sıvısının, bazı memeli eritrositlerine ve bakterilere karşı güçlü hemolitik aktivite gösterdiğini belirtmiştir.

Vasanthi, Chairman ve Singh, (2013), *Eudrilus eugeniae* solucanlarından elde edilen sölom ekstraktının *Salmonella abony, Escherichia coli, S. aureus, K. pnuemoniae* ve *B. subtilis* bakterileri ile *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Candida albicans* ve *Penicillum notatum* mantarına karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada, *E.fetida*'dan ekstrakte edilen sölomik sıvıda şeker varlığı, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirlendi. TLC sonucuna göre standart olarak glukoz ve maltoz kullanıldığında çok az glukoz ve maltoz varlığı gözlendi. Bununla birlikte, ticari sölomik sıvıda şeker varlığı gözlenmedi.

Bazı bilim insanları da sölomda şeker varlığını göstermişlerdir.
Clark (1964), deniz solucanı türü olan *Nephtys hombergi*'nin sölomik sıvısında glikoz, maltoz ve trisakkaritin varlığını bildirmiştir.

Konosu, Chen ve Hashimoto (1966), birkaç farklı çözücü sistemi kullanarak TLC'de glikoz ve maltoz varlığını göstermişlerdir.

Yuk, Simpson ve Simpson (2012), toprak solucanı CF karbonhidratlarının spektrumunun maltoz, glikoz dahil olmak üzere çeşitli şekerlerin eser seviyelerinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ramian, Arabi ve Hemmati (2018), solucan sıvısında ve solucan *Allolobophora chlorotic*'ten vücut özütünde amilazların varlığını bildirmiş ve enzimin ham nişastayı son ürün olarak glikoz, maltoz ve maltotrioza hidrolize ettiğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada, sölomik sıvının protein profilleri SDS-PAGE ile analiz edildiğinde, koyu ve açık bant olarak tahmin edilen birkaç protein tespit edildi. Bu proteinlerin moleküler

ağırlıklarının 15-46 kDa arasında olduğu tahmin edilmektedir. 3 tanesinin tahmini moleküler ağırlıkları 46-32 kDa arasında, biri 32 kDa ve diğeri 15 kDa olarak bulundu. Bu çalışmada elde edilen protein bantlarının fitaz, amilaz, proteaz veya antimikrobiyal peptitler olduğu tahmin edilmektedir. Kalın bant şeklinde görünen proteinin fitaz enzimi olduğu tahmin edilmektedir. Çünkü kısmen saflaştırılmış fitaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 45 kDa olduğu tahmin edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2001; Demirkan, Sevgi, Akcakoca ve Ersoy, 2017).

Kauschke, Mohrig ve Cooper (2007) *A.caliginosa*'nın CF'sinde 94 kDa'nın altında çok sayıda proteolitik bant tespit edilmiş ve CF'de proteazın büyük bir kısmını serin proteazlar oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Milochau, Lassègues ve Valembois (1997), solucanların solömik sıvısında fetidinler adı verilen ve moleküler kütleleri 40 kDa ve 45 kDa olan proteinleri rapor etmişler.

Bilej, Brys, Beschin, Lucas ve Vercauteren (1995), 42 kDa'lık bir görünür moleküler ağırlığa sahip western blot analizi ile CF'de bir proteini tasvir etmişlerdir.

Eue, Kauschke, Mohrig ve Cooper (1998), *E. fetida*'nın sölomik sıvısındaki hemolitik aktivite, moleküler ağırlıkları sırasıyla 46, 43 ve 40 kD olan ve H1, H2, H3 olarak isimlendirilen üç proteininden kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada *E. fetida* sölom sıvısının bazı biyolojik özellikleri ortaya konmuştur. Solucanların toprak verimliliği yönetimine potansiyel katkısı göz önüne alındığında, agroekosistem yönetimi kararlarında bu sonuçların dikkate almaya ihtiyacı vardır. Bu sonuçlar diğer çalışmalara ışık tutacaktır. Elde edilen sonuçlara göre sölom sıvısı mikrobiyal gübrede önemli bir potansiyele sahip olarak görülmektedir Diğer yandan, sölom sıvısının yüksek antibakteriyel özellik göstermesinden dolayı eczacılık endüstrisinde de kullanım potansiyeli yüksektir.

KAYNAKLAR

Abacıoğlu, E., Yatgın, S., Tokel, E., & Yücesoy, P. (2020).Vermikompostun (solucan gübresi) üretimi ve bitki beslemesindeki önemi. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences,* 3(1): 1-10

Adamomowicz, A., & Wojtaszek, J. (2011). Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in Dendrobaena venata (Lumbricidae), *Zoologica Poloniae,* 46 (1-4): 91-104

Akazawa, S.I., Tokuyama, H., Sato, S., Watanabe, T., Shida, Y., & Ogasawara, W. (2018). High-pressure tolerance of earthworm fibrinolytic and digestive enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 125(2):155-159. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.08.011

Akyıl, M.H. (2013). Lipazın *Trichoderma citrinoviride*'den üretimi ve enzim bazı kinetik özelliklerinin saptanması. [Yüksek Lisans Tezi], Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Albani, J.R., Demuynck, S., Grumiaux, F., & Lepretre, A. (2003). Fluorescence fingerprints of *E. fetida* and Eisenia andrei, Photochem. *Photobiol,* 78 (2003) 599-602. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780599FFOEFA2.0.CO2

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology,* 215(3): 403-410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Anonim. (2007a). Niches within earthworms' habitat. Erişim adresi:https://www.sciencelearn.org.nz/resources/7-niches-within-earthworms-habitat

Anonim. (2007b). Noke definitions. Erişim adresi:https://www.encyclo.co.uk/meaning-of-Noke

Anonim.(2014). Enzymatic Assay of Phytase. Erişim adresi: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-phytase.html

Anonim. (2018, 14 Mart). Classifications of Earthworms. Erişim adresi: https://sciencing.com/7-classifications-earthworms-8233433.html.

Anonim. (2022a). Phylum Annelida. Erişim adresi https://www.toppr.com/guides/biology/structural-organisation-in-animals/earthworm/

Anonim. (2022b, 26 Ağustos). Earthworms. Erişim adresi: https://teara.govt.nz/en/earthworms/page-2

Anonim (2022c). NSP-Earthworms. Erişim adresi: https://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/spi/soibiodiversity/soilorganisms/by-type/earthworms/en/

Anonim. (2022d). *Phylum Annelida.* . Erişim adresi: https://quizlet.com/432304912/phylum-annelida-flash-cards/.

Anonim. (2022e). Global earthworm farming market. Erişim adresi: https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-earthworm-farming-market

Anonim. (2022f). Californian red worm. Erişim adresi: https://www.landuum.com/en/plantae-and-fauna/californian-red-worm/

Ansari, A.A., & Saywack, P. (2011). Identification and classification of earthworm epecies in Guyana. *International Journal of Zoological Research*, 7(1): 93-99.

Ansari, A.A., & Sukhraj, K. (2010). Effect of vermiwash and vermicompost on soil parameters and productivity of okra (*Abelmoschus esculentus*) in Guyana. *Current Advances in Agricultural Sciences (An International Journal)*, 5(14):1794-1798.

Arslan, E.Ö. (2005). Çeşitli solucan türlerinde vücut sıvısının antibakteriyel ve hemoliz aktivitelerinin araştırılması. [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul Üniversitesi.

Asshoff, R., Scheu, S., & Eisenhauer, N. (2010). Different earthworm ecological groups interactively impact seedling establishment. *European Journal of Soil Biology*, 46(5): 330-334. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.06.005.

Aydilek, S. (2005). Toprak solucanlarından elde edilen sölomsıvılarının çeşitli hücreler üzerine etkisi. [Yüksek Lisans Tezi], İstanbul Üniversitesi.

Bhatnagar, R.K., & Palta, R. (1996). Earthworm vermiculture and vermicomposting. Kalyani Publishers.

Bilej, M., Baetselier, P.D., Dijck, E.V., Stijlemans, B., Colige, A. & Beschin, A. (2001). District carbohydrate recognition domains of invertebrate defense molecule recognize Gram negative and Gram positive bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (49): 45840 – 45847.

Bilej, M., Brys, L., Beschin, A., Lucas, R., & Vercauteren, E. (1995). Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunology Letters*, 45: 123-128. doi:10.1016/0165-2478(94)00248-P

Bhattacharyya, P.N., & Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9.

Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E., Baker, G., Brussaard, L., & Butt, K.R. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64: 161–182. doi:10.1111/ejss.12025.

Bouche, A. (1992). Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Andover, UK, pp. 20–35.

Bouche, M.B. (1977). Strategies lombriciennes. In: Soil organism as component of Ecosystem. Lohn, U. and Person, T. (eds.). *Biological Bulletin (Stockholm)*, 2: 122-132

Brown, G.G., Feller, C., Blanchart, E., Deleporte, P., & Chernyanskii, S.S. (2003). With Darwin, earthworms turn intelligent and become human friends. *Pedobiologia (Jena)*, 47: 924-933. doi:10.1078/0031-4056-00282

Bundy, J.G., Osborn, D., Weeks, J.M., Lindon, J.C., & Nicholson, J.K. (2001). An NMR-based metabonomic approach to the investigation of coelomic fluid biochemistry in earthworms under toxic stress. *FEBS Lett*. 500 (2001) 31-35. doi:10.1016/S0014-5793(01)02582-0

Chaudhuri, P.S., (2005). Vermiculture and vermicomposting as biotechnology for conversion of organic wastes into animal protein and organic fertilizer. *Asian Journal of Microbiology, Biotech. Environ. Sci*., 7:359-370

Vasantha, C., Rajagopalan N., Selvan Christyraj, K., Subbiahanadar, J. D., Chelladurai, K., Ganesan, M., Azhagesan, A. & Christyraj, J.R.S. (2019). Heat-inactivated coelomic fluid of the earthworm Perionyx excavatus is a possible alternative source

for fetal bovine serum in animal cell culture. *Biotechnology Progress*, 35(4): e2817. https://doi.org/10.1002/btpr.2817

Choi, Y.M., Suh, H.J., & Kim, J.M. (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20: 287-292.

Clark, M.E. (1964). Biochemical studies on the coelomic fluid of *Nephtys hombergi* (Polychaeta: Nephtyidae), with observations on changes during different physiological states. *The Biological Bulletin*, 127(1): 63-84

Cooper, E.L., Kauschke, E., Cossarizza, A. (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff, *BioEssays*, 24: 319–33. doi:10.1002/bies.10077

Cooper, E.L., & Roch, P. (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia*, 47: 676-688. doi:10.1078/0031-4056-00245

Cooper, EL., & Balamurugan, M. (2010). Unearthing a source of medicinal molecules, Drug Discov. Today 15(21-22):966-972.

Cooper, E. L., Balamurugan, M., Huang, C.Y., Tsao, C.R., Heredia, J., Tommaseo-Ponzetta, M., & Paoletti, M.G. (2012). Earthworms dilong: ancient, inexpensive, noncontroversial models may help clarify approaches to integrated medicine emphasizing neuroimmune systems. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:164152

Curry, J.P., & Schmidt, O. (2007). The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, 50, 463–477

Dales, R.P., & Kalac, Y. (1992). Phagocytic defence by the earthworm Eisenia foetida against certain pathogenic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101A: 487-490. doi:10.1016/0300-9629(92)90499-G

Das, P.K., Jena, M.K. & Mohanty, S. (2002). Online edition of India"s National Newspaper 'The Hind'. Bhubaneswar, 17 Jan

Dash, M.C. (2012). *Charles Darwins Plough: Tools for vermitechnology Ik.* International Publishing House pvt. Ltd

Dash, M.C., Satpathy, B., Behera, N., & Dei, C. (1984). Gut load and turnover of soil, plant and fungal material by Drawida calebi, a tropical earthworm. *Industrial Reviews on Ecological Biology of Soil*, 21: 387-393

Demir, H., Polat, E., & Sönmez, İ. (2010). Ülkemiz için yeni bir organik gübre: solucan gübresi. *Tarım Aktüel*, 14, 54-60

Demirkan, E., Baygın, E., & Usta, A. (2014). Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (2): 206-214. doi: 10.5505/tjb.2014.26817

Demirkan, E., Çetinkaya, A. A., & Abdou, M. (2021). Lipase from New Isolate *Bacillus cereus* ATA179: Optimization of production conditions, partial purification, characterization and ıts potential in the detergent ındustry. *Turkish Journal of Biology*, 45: 287-300. doi:10.3906/biy-2101-22

Demirkan, E., Sevgi, T., & Baskurt, M. (2016). Optimization of Physical factors affecting the production of the α-Amylase from a newly Isolated *Bacillus* sp. M10 strain. *Karaelmas Fen Mühendislik Dergisi,* 6(2): 1-8

Demirkan, E., Sevgi, T., Akcakoca, D., Ersoy, F. (2017). Partial purification, characterization and wheat bran degradation studies of a new phytase from the Bacillus megaterium EBD 9-1 strain. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(3): 329-337. doi:10.1515/tjb-2016-0265

Domínguez, J. (2018). Earthworms and Vermicomposting. In: Soil of engineers ecological theeEarthworms. doi:10.5772/intechopen.76088

Domínguez, J., Velando, A., Aira, M., & Monroy, F. (2003). Uniparental reproduction of *E. fetida* and E. andrei (Oligochaeta: Lumbricidae): Evidence of self-insemination: The 7th international symposium on earthworm ecology · *Cardiff · Wales · 2002*. *Pedobiologia*, 47(5): 530–534. doi:10.1078/0031-4056-00224

Dorit, R. L., Walker, W. F., & Barnes, R.D. (1991). *Zoology.* Saunders College Publishing. pp. 190

Du Pasquier, L., & Du Prat, P. (1968). Humoral and cellular aspects of a non-specific natural immnunity in the oligochaeta *Eisenia foetida* Sav. (*Lumbricinae*). *CR Acad Sci Hebd séances Acad Sci D*. 266 (5): 538 -541

Edwards, C.A. (1988). Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. In: Edwards C. A, Neuhauser E.F. (eds) *Earthworms in Waste and Environmental Management.* SPB Academic Publishing, 21-31

Edwards, C.A., Arancon, N.Q., & Sherman, R.L. (eds). (2011). *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management.* CRC Press; pp. 25-37

Elvira, C. Dominguez, J., & Briones, M.J.I. (1996). Earthworm community composition in an uncontrolled rubbish dump, a pig farm dunghill, and a deposit of primary sludges, Nova Acta Cient. Compostel. Biol. 6, 123-129

Engelmann, P., Kiss, J., Csöngei, V., Cooper, E. L., & Németh, P. (2004). Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *Journal of biochemical and biophysical Methods*, 61(1-2): 215-227

Esaivani, C., Vasanthi, K., Singh, A. (2017). An investigation on antimicrobial potency of coelomic fluid of earthworm Eudrilus eugeniae. *British Journal of Medical and Health Research*, 4(4): 1-7

Eue, I., Kauschke, E., Mohrig, W., & Cooper, E. L. (1998). Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins. *Developmental & Comparative Immunology*, 22: 13–25. doi:10.1016/S0145-305X(97)00049-9

Fang, Y.S. (1999). *Eisenia foetida* fibrinolytic enzymes research VIII: determination of fibrinolytic enzymes active components. *Heilongjiang Journal of Medicine,* 12: 263-26

Field, S.G., Kurtz, J., Cooper, E.L., & Michiels, N.K. (2004). Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 86: 45-49

Fiołka, M.J., Czaplewska, P., Macur, K., Buchwald, T., & Kutkowska, J. (2019). Anti-Candida albicans effect of the protein- carbohydrate fraction obtained from the coelomic fluid of earthworm Dendrobaena veneta. *PloS one*, 14(3): e0212869

Furlong M.A, Singleton D.S, Coleman D.C., & Whitman W.B. (2002). Molecular and culture- based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology,* 68(3): 1265-1279. doi:10.1128/AEM.68.3.1265-1279.2002

Gajalakshmi, S., &Abbasi, S.A. (2004). Earthworms and vermicomposting. *Indian Journal of Biotechnology,* 3: 486-494

Gudeta, K., Kumari, S., Bhagat, A., Julka, J. M., Goyal, R., & Adama, E. (2020). Mitogenic, antioxidative and antimicrobial activities of G-90 and coelomic fluid from earthworm as a therapeutic agent, a review. *International Journal of*

Pharmaceutical Sciences and Research, 11(11): 5298-5307. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.11(11).5298-07

Gunathilagraj, K. (1996). *Earthworm: An Introduction.* Coimbatore: Indian Council of Agricultural Research Training Program, Tamil Nadu Agriculture University

Gunya, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2016). Nutrient composition and fatty acid profiles of oven-dried and freeze-dried earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(6): 343-348

Gupta, S., & Yadav, S. (2016). Immuno-defense strategy in earthworms: a review article. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,* 5(4): 2016, 1022-1035

Hand, P. (1988). Earthworm Biotechnology. In *Resources and Application of Biotechnology: The New Wave* (Greenshields, R. ed.). MacMillan Press Ltd. US.

Haque, S. F., Sen, S. K., & Pal, S. C. (1995). Nutrient optimization for production of broad spectrum antibiotic by Streptomyces antibioticus SR15. 4. *Acta Microbiologica et İmmunologica Hungarica*, 42(2): 155-162

Hatti, S. S., & Ramakrishna, B. (2013). Extraction of coelomic fluid from the earthworm Perionyx sansibaricus for antibacterial activities. Indian Journal Of Applied Research. 3(10), 1-3

Hua, Z., Wang, Y. H., Cao, H. W., Pu, L. J., & Cui, Y. D. (2011). Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm Eisenia foetida and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharmaceutical Biology,* 49: 269–275. https://doi.org/10.3109/13880209.2010.508498

Ireland, M.P. (1983). *Heavy metals uptake in earthworms. Earthworm Ecology*. Chapman & Hall

Ismail, S.A. (1997). Vermitechnology the biology of earthworms, Hyderabad. pp 66-72. Orient Longman

Jensen, B., Olsen, J., & Allermann, K. (1988). Purification of extracellular amylolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Canadian journal of Microbiology*, 34(3): 218-223. doi:10.1139/m88-04

Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69(3): 373–386

Julka, J.M. (1993). Earthworm resource andmvermiculture. Zoological survey of India earthworms. *Journal of MicrobiologymResidence Technology,* 47 (44):237-53.

Julka, J.M. (2008). Know you earthworms. Foundation for life Sciences and Business Management. 51 pp, Solan press.

Kauschke, E., & Mohrig, W. (1987). Cytotoxic activity in the coelomic fluid of the annelid *Eisenia foetida* (Sav.). *Journal of Comparative Physiology B*, 157(1): 77-83

Kauschke, E., Mohrig, W., & Cooper, E.L. (2007). Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 43: 110-115

Kauschke, E., Pagliara, P., Stabili, L., & Cooper, E. L. (1997). Characterization of proteolytic activity in coelomic fluid of *Lumbricus terrestris* L.(Annelida, Lumbricidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2): 235-242. doi:10.1016/S0305-0491(96)00248-9

Keay, L., & Wildi, B. S. (1970). Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. *Biotechnology and Bioengineering*, 12(2): 179-212. doi:10.1002/bit.260120205

Kizilkaya, R., & Dengiz, O. (2010). Variation of land use and land cover effects on some soil physico-chemical characteristics and soil enzyme activity. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97(2): 15-24

Kladivko, E. J., Mackay, A. D., & Bradford, J. M. (1986). Earthworms as a factor in the reduction of soil crusting. *Soil Science Society of America Journal*, 50(1): 191-196. doi:10.2136/sssaj1986.03615995005000010036x

Kobayashi, H., Ohta, N., & Umeda, M. (2004). Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *International Review of Cytology*, 236: 45-99

Koenig, S., Wagner, F., Kauschke, E., Katalinic, J.P., Cooper, E.L., & Eue, I. (2003). Mass spectrometric analyses of CL39, CL41 and H1, H2, H3 confirm identity with fetidin and lysenin produced by earthworm leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 513-520

Konig S., Wagner F., Kauschke, E., & Eue, I. (2004). Sequence analysis of earthworm hemolysins. *Spectroscopy*, 18: 347-353

Konosu, S., Chen, Y.N., & Hashimoto, Y. (1966). Constituents of the extracts of a marine worm, *Perinereis brevicirrus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 32(10): 881-886

Koziol, B., Markowicz, M., Kruk, J., & Plytycz, B. (2006). Riboflavin as a source of autofluorescence in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2): 570-573

Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., & Plytycz, B. (2007). Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, Allolobophora chlorotica (Sav). *European Journal of Soil Biology*, 43: 121 – 126

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Lal, R. (1999). Soil conservation and biodiversity, in D. L. Hawksworth, Ed., *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture*, pp. 89-103, CAB International

Lassègues, M., Roch, P., & Valembois, P. (1989). Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: Evidence, induction, and animal protection. *Journal of İnvertebrate Pathology*, 53(1): 1-6. doi:10.1016/0022-2011(89)90066-9

Lavelle, P., Chauvel, A., & Fragoso, C. (1995). Faunal activity in acid soils. In *Plant-soil interactions at low PH: principles and management* (pp. 201-211). Springer, Dordrecht

Lavelle, P., Spain, A., Blouin, M., Brown, G., Decaëns, T., Grimaldi, M., ... & Zangerlé, A. (2016). Ecosystem engineers in a self-organized soil: a review of concepts and future research questions. *Soil Science*, 181(3/4): 91-109

Lee, K.E. (1985). Earthworms their ecology and relationshipswith soils and land use. Sydney: Academic Press

Li, C., Chen, M., Li, X., Yang, M., Wang, Y., & Yang, X. (2017). Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, 89: 71-81. doi:10.1016/j.peptides.2017.01.016

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275

Maboeta, M. S., & Van Rensburg, L. (2003). Vermicomposting of industrially produced woodchips and sewage sludge utilizing *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 56(2): 265-270. doi:10.1016/S0147-6513(02)00101-X

Maková, J., Javoreková, S., Elbl, J., Medo, J., Hricáková, N., & Kovacik, P. (2019). Impact of vermicompost on biological indicators of the quality of soil under maize in a greenhouse experiment. *Journal of Elementology*, 24(1): 319-330.

McLean, M. A., & Parkinson, D. (1998). Impacts of the epigeic earthworm Dendrobaena octaedra on oribatid mite community diversity and microarthropod abundances in pine forest floor: a mesocosm study. *Applied Soil Ecology*, 7(2): 125-136. doi:10.1016/S0929-1393(97)00041-3

Mısırlıoğlu, M. (2017). Toprak solucanları: biyolojileri, ekolojileri, zirai yönleri, Türkiye türleri ve türlerin taksonomik özellikleri. Nobel Akademik Yayıncılık.

Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428

Milochau, A., Lassègues, M., & Valembois, P. (1997). Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1337(1): 123-132. doi:10.1016/S0167-4838(96)00160-4

Mishra, P. K., Bisht, S. C., Jeevanandan, K., Kumar, S., Bisht, J. K., & Bhatt, J. C. (2014). Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting Pseudomonas spp. and Rhizobium leguminosarum-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash (Phaseolus vulgaris L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(6): 799-815. doi:10.1080/03650340.2013.843773

Mohrig, W., Eue, I., Kauschke, E., & Hennicke, F. (1996). Crossreactivity of hemolytic and hemagglutinating proteins in the coelomic fluid of Lumbricidae (Annelida). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 115(1): 19-30

More S.B., & More, B.C. (2017). Efforts for biomass and biofertilizer by using earthworm Eudrilus eugeniae. *Journal of Environmental Research And Development*, *11*(03), 535-539

Msakni, S. (2020*).* Türkiye topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarından selülaz enzim üretiminin taranması, besinsel optimizasyon, enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve yünlü kumaştaki bitki atıklarının giderilmesinde etkinliği. [Yüksek Lisans tezi]. Bursa Uludağ Üniversitesi

Ncobela, C. N., & Chimonyo, M. (2015). Potential of using non-conventional animal protein sources for sustainable intensification of scavenging village chickens: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 208: 1-11

Omar, H. M., Ibraheim, Z. Z., El-Shimy, N. A., & Ali, R. S. (2012). Anti-inflammatory, antipyretic and antioxidant activities of the earthworms extract. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(1): 10-17

Özkaya-Durlu., F. (2000). Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Armoni matbacılık Ltd.

Pan, W., Liu, X., Ge, F., & Zheng, T. (2003). Reconfirmation of antimicrobial activity in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida andrei* by colorimetric assay. *Journal of Biosciences*, 28(6): 723-731

Patil, S. R., & Biradar, P. M. (2017). Earthworm's coelomic fluid: extraction and importance. *International Journal of Advanced Scientific Research*, 2(2): 1-4

Paul, S.G. 2014. In: Chaudhuri, P.S., Singh S.M., Biology and Ecology of Tropical Earthworms Discovery Publishing House Pvt.Ltd

Plavšin, I., Velki, M., Ečimović, S., Vrandečić, K., & Ćosić, J. (2017). Inhibitory effect of earthworm coelomic fluid on growth of the plant parasitic fungus *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Soil Biology*, 78: 1-6.

Prat, P., Charrier, M., Deleporte, S., & Frenot, Y. (2002). Digestive carbohydrases in two epigeic earthworm species of the Kerguelen Islands (Subantarctic). *Pedobiologia* 46(5):417-427. doi:10.1078/0031-4056-00149

Qobiljonovna Y.S., Ergashaliogli S.B. (2021). Bio ecological properties and significance of california red worm. ACADEMICIA: An International Multidisciplinary Research Journal, 11(4): 1946-1950. doi:10.5958/2249-7137.2021.01331.8

Rajesh, C., Rajamanikkam, K., Vadivu, G.N.R., & Palanichelvam, K. (2019). Coelomic fluid of earthworm, eudrilus eugeniae, ınhibits the growth of fungal hyphae, in vitro. *International Journal of Engineering and Advanced Technology,* 9(1S4), 792-796. doi:10.35940/ijeat.A1146.1291S419

Ramian, P., Arabi, M., & Hemmati, R. (2018). Novel amylase in coelomic fluid and body extract from the earthworm *Allolobophora chlorotica*. *Biomacromolecular Journal*, 4(1): 35-45

Richard, B., Decaëns, T., Rougerie, R., James, S. W., Porco, D., & Hebert, P. D. N. (2010). Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources,* 10(4): 606-614. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x

Robty, J.F. & White B.J. (1987). Biochemical Techniques. Theory and Practice, Chapter 4, Chromatic Techniques, 87 p.,Brooks/Cole Publishing Company, California

Roch, P., & Cooper, E. L. (1991). Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by aroclor 1254. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 22: 283-290. doi:10.1016/0147-6513(91)90079-5

Roch, P., Canicatti, C., & Valembois, P. (1989). Interactions between earthworm hemolysins and sheep red blood cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,* 983(2): 193-198. doi:10.1016/0005-2736(89)90233-2

Rochfort, S., Wyatt, M. A., Liebeke, M., Southam, A. D., Viant, M. R., & Bundy, J. G. (2017). Aromatic metabolites from the coelomic fluid of Eisenia earthworm species. *European Journal of Soil Biology*, 78: 17-19. doi:10.1016/j.ejsobi.2016.11.008

Roopa, R., Charulatha, M., & Meignanalakshmi, S. (2017). Production of cellulase from *Bacillus subtilis* under solid- state fermentation using fiber wastes of palmyra palm. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,* 6(6): 2225-2231

Rostami R., Nabaey A. & Akbar E. (2009). Survey of optimal temperature and moisture for worms growth and operating vermicompost production of food wastes. *Iranian Journal of Health and Environment,* 1(2): 105-112

Rostami, R., Nabaey, A., Eslami, A., & Najafi Saleh, H. (2010). Survey of optimal conditions for worm's growth and vermicompost production of prepared food wastes. *The Horizon of Medical Sciences,* 15(4): 76-83

Sarıkaya, E. 1995. α-Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. [Doktora Tezi]. Ankara Üniversitesi

Scherbert I., & Messner, B. (1971). Untersuchugen uber das vor kommenvon lysozyme bei anneliden. *Zoologische Jahrbücher Physiologie Biologie,* 76: 36-50

Scheu, S. (2003). Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia*, 47(5-6): 846–856

Sethulakshmi, K.C., & Lakshmi, R. (2018). Antibacterial Activities of Coelomic Fluid of Local Earthworms against Disease Causing Microorganisms. *Asian Journal of Biology,* 5(3): 1-7

Sevinc, N., & Demirkan, E. (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *Journal of Biology and Environmental Sciences*, 5(14): 95-103

Shen, Y. (2010). Earthworms in Traditional Chinese Medicine: (Oligochaeta: Lumbricidae, Megascolecidae). *Zoology in the Middle East*, 51(sup2): 171-173.

Shobha, S. V., & Kale, R. D. (2008). Invitro studies on control of soil-borne plant pathogens by earthworm *Eudrilus eugeniae* exudates. Green Pages. http://www.eco-web.com/edi/080106.html

Siddique, J., Khan, A. A., Hussain, I., & Akhter, S. (2005). Growth and reproduction of earthworm (*Eisenia fetida*) in different organic media. *Pakistan Journal of Zoology*, 37(3): 211

Singh, S., Singh, J., Kandoria, A., Quadar, J., Bhat, S. A., Chowdhary, A. B., & Vig, A. P. (2020). Bioconversion of different organic waste into fortified vermicompost with the help of earthworm: A comprehensive review. *Internatıonal Journal Of Recyclıng Of Organıc Waste In Agrıculture,* 9(4); 423 -439

Stahl, E. (2013). *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*. Springer Science & Business Media

Sugihara, A., Tani, T., & Tominaga, Y. (1991). Purification and Characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp*. *J. Biochem*, 109: 211–216

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*., 24:1596-1599. doi:10.1093/molbev/msm092

Temiz, A. (1994). Gıda mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Hatiboğlu Yayıncılık

Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673

Tiroesele, B., & Moreki, J.C. (2012). Termites and Earthworms as Potential Alternative Sources of Protein for Poultry. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 6: 368-76.doi:10.5455/ijavms.174

Tutar, U. (2013). Toprak solucanlarından elde edilen vermikompostun bazı bitki patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 34(2): 1-12

Tutar, U., & Karaman, İ. (2017). Investigation of antibacterial properties of mucus and coelomic fluid obtained from *Eisenia fetida*. *Cumhuriyet Science Journal*, 38(3): 427-434. doi:10.17776/csj.340474

Murugan S, Umamaheswari S (2021). Identification of Lysenin Protein Function in Coelomic Fluid of *Eudrilus eugeniae*. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*, 8 (03): 687-696

Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., & Cassand, P. (1982). Anti-bacterial activity of the hemolytic system from the earthworm, *E. fetida* Andrei. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 21-27. doi:10.1016/0022-2011(82)90032-5

Valembois, P., Lassegues, M., & Roch, P. (1992). Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia foetida Andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 16: 95-101

Vasanthi, K., Chairman, K., & Singh, A. R. (2013). Antimicrobial activity of earthworm (*Eudrilus eugeniae*) paste. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7(8): 789-793. Doi:10.5897/AJEST2013.1455

Veeramani, A. (2010). Study on the characterization of coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae* and its effect on plants and animal cells in the in-vitro culture system. . [Ph.D.Thesis], Bharathidasan University, India

Wang, C., Sun, Z., & Zheng, D. (2006). Research advance in antibacterial immunity ecology. *The Journal of Applied Ecology*, 17(3): 525-529

Wang, Y., Yao, B., Zeng, H., Shi, X., Cao, S., Yuan, T., Fang, Y. (2001). Purification and properties of neutral phytase form *Bacillus subtilis*. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 41:198–203

Wardle, D.A. (2002). Communities and ecosystems: Linking the abovegroundand belowground components. pp: 77-130, Princeton University Press

Yakkou, L., Houida, S., Domínguez, J., Raouane, M., Amghar, S., & El Harti, A. (2021). Identification and characterization of microbial community in the coelomic fluid of earthworm (*Aporrectodea molleri*). *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49(3): 391-402

Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., & Umeda, M. (1998). Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 5300-5306. doi:10.1074/jbc.273.9.5300

Yamaji-Hasegawa A., Makino A., Baba T., Senoh Y., Kimura-Suda H., Sato S. B., Terada N., Ohno S., Kiyokawa E., Umeda M., & Kobayashi T. (2003). Oligomerization and Pore Formation of a Sphingomyelin-specific Toxin, Lysenin, *Journal of Biological Chemistry*, 278: 22762-2770. doi:10.1074/jbc.M213209200

Yanqin, L., Yan, S., Zhenjun, S., Shijie, L., Chong, W., Yan, L., & Yuhong, G. (2007). Coelomic Fluid of the earthworm *Eisenia foetida* induces apoptis of Hela cells in vitro. *European Journal of Soil Biology, 43*: S143-S148. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.049

Yoo, Y.J., Hong, J., & Hatch, R.T. (1987). Comparison of α-amylase activities from different assay methods. *Biotech. Bioengn*, 30(1): 147-151

Yousra, B. 2018. Diversity in the susceptibility of *Botrytis cinerea* strains to the biological control agent *Pseudomonas helmanticensis. IOBC/WPRS Bull*, 133: 100-104

Yuk, J., Simpson, M.J., Simpson, A.J. (2012). Coelomic fluid: a complimentary biological medium to assess sub-lethal endosulfan exposure using 1H NMR-based earthworm metabolomics. *Ecotoxicology*, 21: 1301-1313

Zambare, V. P., Padul, M. V., Yadav, A. A., & Shete, T. B. (2008). Vermiwash: biochemical and microbiological approach asecofriendly soil conditioner. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 3(4): 1-5