

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DARGEÇİT VE GÜÇLÜKONAK SICAK SU
KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Hamşi PİRİNÇÇİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
HAZİRAN- 2010**

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DARGEÇİT VE GÜÇLÜKONAK SICAK SU
KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Hamşi PİRİNÇÇİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
HAZİRAN-2010**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Hamşi PİRİNÇÇİOĞLU tarafından yapılan "Dargeçit ve Güçlükönak Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Doç. Dr. Sait ERDOĞAN

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../.....

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

ÖZ

Mardin ili Dargeçit ve Şırnak ili Güçlükönak ilçeleri sıcak su kaynaklarından su ve çamur örnekleri alınarak bakteri izolasyonu yapıldı. Bu bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipit analizi ve 16S rRNA dizi analizi yapılarak tanımlanması yapıldı.

Hısta (Güçlükönak) sıcak su kaynağından izole edilen iki tane izolat GE1 ve GE2 olarak adlandırıldı. Bu izolatlar çubuk şeklinde, gram-pozitif, aerobik, hareketli ve spor oluşturan termofil karakterde oldukları belirlendi. GE1'in basilleri genellikle ikili halde GE2'nin ise tekli halde bulunmaktadır. Üreme sıcaklık aralığı GE1 için 30-65 °C (optimum 60°C), GE2 içinde 35-65 °C (optimum 60°C) olarak bulundu. Optimum üreme pH'sı GE1'in 9.0, GE2'nin 9.5 olarak bulundu. GE1 ve GE2'nin büyüme grafiği çizildi ve sırası ile 15. ve 12. saatlerde en yüksek oranda üredikleri görüldü. GE1 ve GE2'nin nişasta, katalaz, üreaz, fosfataz testleri pozitif tespit edildi. İzolatların %1'lik NaCl'e tolerans gösterdikleri saptandı. GE1'in karbon kaynağı olarak galaktoz, sakkaroz, maltoz ve laktozu kullandığı; glukoz, fruktoz ve gliserolü de zayıf bir şekilde kullandığı saptandı. GE2'nin maltozu karbon kaynağı olarak kullandığı, glikoz ve sakkaroz da zayıf olarak kullandığı tespit edildi.

Ilısu (Dargeçit) kaplıcasından izole edilen, AH1 ve AH2 olarak adlandırılan izolatlar çubuk şekilli, gram-pozitif, spor oluşturan, aerobik, hareketli termofilik özellikte bakterilerdir. Hücreleri genellikle ikili halde bulunmaktadır. AH1'in üreme sıcaklık aralığı 30-65 °C (optimumu 60 °C) olarak bulundu. AH2'nin üreme sıcaklık aralığı ise 30-65 °C (optimum 65 °C) olarak bulundu. AH1'in pH üreme aralığı 5.5-10.0 (optimum 7.5) bulundu. AH2'nin pH üreme aralığı 6.0-11.0 (optimum 7.5) olarak bulundu. AH1 ve AH2'nin büyüme grafiği incelendiğinde, çoğalmanın

sırasıyla 24. saat ve 15. saat olduğu saptandı. İzolatların nişasta hidrolizi, katalaz, kazein, lipaz ve fosfataz testleri pozitif olarak tespit edildi. Her iki izolatın da lizozim duyarlılığı ve sodyum azid duyarlılığı pozitif görüldü. Ayrıca izolatların %2'lik NaCl'e toleranslı oldukları görüldü. AH1'in karbon kaynağı olarak galaktoz ve gliserolü zayıf olarak kullandığı tespit edildi. AH2'nin ise sakkaroz, laktoz ve gliserolü zayıf bir şekilde kullandığı tespit edildi.

GE1, GE2, AH1'in lipid analizleri *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* ve *Geobacillus toebii* standartları ile yapılan karşılaştırmalarda izolatların fosfolipitleri, glikolipitleri ve aminolipitlerinin *Geobacillus* standartlarına benzerlik gösterdiği görüldü.

GE1'in 16S rRNA gen dizisinin veri tabanındaki diğer türlerle karşılaştırılması sonucunda *Geobacillus* cinsine ait türle yakınlık gösterdiği görüldü. *Geobacillus* cinsinin yeni bir türü olabileceği düşünülmektedir.

GE2'nin 16S rRNA gen dizi analizi sonuçları diğer türlerle karşılaştırıldığında *Geobacillus kaue*'a yakınlık gösterdiği görüldü.

AH1 ve AH2'nin 16S rRNA gen dizi analizi veri tabanındaki mevcut türlerle karşılaştırıldığında *Anoxybacillus flavithermus*'a % 99 oranında yakınlık gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bakteri tanımlanması, termofilik bakteri, 16S rRNA, Sıcak su kaynağı

ABSTRACT

In Dargeçit, Mardin and in Güçlükonak, Sirnak districts of hot springs water and mud samples of bacteria were isolated. Morphological, physiological, biochemical characteristics, lipid analysis and identification 16S rRNA sequence analysis of these bacteria was performed and identified.

Two strains isolated from hot springs of Hısta (Güçlükonak) was called GE1 and GE2. These isolates were rod shaped, gram-positive, aerobic, and sports animated character has been identified as forming thermophile. Bacillus of GE1 is usually found as bilateral. Otherwise, bacillus of GE2 is found as asingle. 30-65 °C (optimum 60 °C) for GE1 and 35-65 °C (optimum 60 °C) for GE2 was found as the temperature range of reproductive. Optimum growth pH for GE1 and GE2 were found 9 and 9,5. Growt graphic of GE1 and GE2 were drawn and produce the highest rate of they were seen in the fifteenth and twelfth hours, respectively. Starch, catalase, urease, phosphatase tests of GE1 and GE2 have determined positive. 1% NaCl tolerance of isolates were found to show. GE1 used galactose, sucrose, maltose and lactose as carbon source; glucose, fructose and glycerol which are used in a way that very little was stated. GE2 used maltose as the carbon source, glucose and were used as the weak.

Strains isolated from hot springs of Ilısu (Dargeçit) was named AH1 and AH2. These bacteria are rod-shaped, gram-positive, spore forming, aerobic, active thermophilic properties. Cells of these bacteria are usually bilateral. 30-65 ° C (optimum 60 ° C) was found as temperature range of reproductive for AH1, 30-65 (optimum 65 ° C) was found as the temperature range of reproductive for AH2. Reproductive pH range was found 5.5-10 (optimum 7.5) for AH1. reproductive pH

range 6-11 (optimum 7.5) was found. Reproductive pH range was found 6-11 (optimum 7.5) for AH2. The optimum time to produce for AH1 and AH2 have been seen 24th and 15th hours, respectively. Starch hydrolysis, catalase, casein, lipase and phosphatase tests of isolates were positive. the lysozyme sensitivity and sodium azide sensitivity of both isolates have been seen positive. 2 % NaCl tolerance of isolates were found to show. AH1 as a carbon source used galactose and glycerol poorly. AH2 also used sucrose, lactose, and glycerol in a weak manner were determined.

Lipid analysis of GE1, GE2, AH1, the comparison with standard isolates *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* and *Geobacillus toebii*, phospholipids, glycolipids and amino lipids of isolates were similar to the standard of the *Geobacillus toebii*.

16S rRNA gene sequence database of GE1 by comparing with other species in the genus *Geobacillus* species were found to sympathize with. A new species of the genus *Geobacillus* is thought to be.

16S rRNA gene of GE2 compared with other types of analysis is showed *Geobacillus kaue'*a sympathize.

16S rRNA gene sequence analysis of AH1 and AH2 in comparison with the existing data base is similar to *Anoxybacillus* genus and *Anoxybacillus flavithermus* was 99 % affinity.

Keywords: Bacterial identification, thermophilic bacteria, 16S rRNA, Hot springs

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren ve bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof Dr. Kemal GÜVEN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tezimin deney aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen ve her türlü desteğini gördüğüm Arş.Gör. Fatma MATPAN BEKLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Hem lipit analizinde hem de tezimin her aşamasında yardımlarından dolayı Dr. Reyhan Gül-GÜVEN'e teşekkür ederim.

Lipit analizinde yardımcı olan Napoli (Italy)'deki Biyomoleküler Kimya Enstitüsü (Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB)) çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım ve tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını gördüğüm Ömer ACER'e teşekkür ederim

Desteklerinden dolayı MOLEKÜLER BİYOLOJİ laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında benimle ilgilenen, destek veren geniş ve büyük aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİM DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR	xiv

1. GİRİŞ.....	1
KAYNAKLAR.....	4

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mikroorganizmaların Tarihçesi.....	6
2.2. Bakteri Sınıflandırması.....	7
2.2.1. Doğal (filojenik) klasifikasyon.....	7
2.2.2. Numerikal (sayısal) klasifikasyon.....	7
2.2.3. Genetik klasifikasyon.....	8
2.2.4. Antijenik klasifikasyon.....	9
2.2.5. Fajla tiplendirme.....	9
2.2.6. Kemotaksonomi.....	9
2.3. Gram-pozitif Endospor Oluşturan Basiller.....	9
2.3.1. <i>Geobacillus</i> Cinsi.....	13

2.3.2. <i>Anoxybacillus</i> Cinsi.....	16
2.4. Termofilik Mikroorganizmalar.....	17
2.5. Bakterilerin Tanımlanması.....	20
2.5.1. Morfolojik Özellikleri.....	20
2.5.2. Fizyolojik Özellikleri.....	20
2.5.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	21
2.5.4. Genetik Özellikleri.....	21
2.5.5. Lipit Analizi.....	21
2.6. Önceki Çalışmalar.....	23
KAYNAKLAR.....	32

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Biyolojik Materyal.....	39
3.1.1. Bakterilerin İzole Edildikleri Sıcak Su Kaynakları ve Özellikleri.....	39
3.2. Bakteri İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Üretimi.....	42
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	42
3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimi.....	43
3.5. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi.....	43
3.6. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler.....	44
3.6.1. Gram Boyama.....	44
3.6.2. Spor boyama.....	44
3.6.3. Hareket Testi.....	45
3.6.4. Nişasta Hidrolizi Testi.....	45
3.6.5. Katalaz Testi.....	46

3.6.6. Lipaz Testi.....	46
3.6.7. Kazein Hidrolizi Testi.....	47
3.6.8. Jelatin Hidrolizasyon Testi.....	47
3.6.9. Üreaz Testi.....	47
3.6.10. İndol Testi.....	48
3.6.11. Fosfataz Testi.....	48
3.6.12. Lizozim Duyarlılığı.....	48
3.6.13. Sodyum Azid Duyarlılığı.....	49
3.6.14. NaCl Toleransı.....	49
3.7. Karbon Kaynağı Kullanımı.....	49
3.8. Lipit Analizi.....	51
3.9.16S rRNA Gen Dizi Analizi.....	52
KAYNAKLAR.....	54

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Bakteri İzolasyonu.....	55
4.1.2. Morfolojik Özelliklerin Tespiti.....	55
4.1.3. Optimum Üreme Şartlarının Tespiti.....	55
4.1.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler.....	56
4.1.4.1. Nişasta Hidrolizi Testi.....	57
4.1.4.2. Katalaz Testi.....	57
4.1.4.3. Lipaz Testi.....	57
4.1.4.4. Kazein Hidrolizi Testi.....	57

4.1.4.5. Jelatin Hidrolizasyon Testi.....	58
4.1.4.6. Üreaz Testi.....	58
4.1.4.7. İndol Testi.....	58
4.1.4.8. Fosfataz Testi.....	59
4.1.4.9. Lizozim Duyarlılığı.....	59
4.1.4.10. Sodyum Azid Duyarlılığı.....	59
4.1.4.11. NaCl Toleransı.....	59
4.1.4.12. Karbon Kaynağı Kullanımı.....	60
4.1.5. Lipit Analizi Sonuçları.....	60
4.1.4.6. Bakterilerin 16S rRNA Gen Dizilimi ve Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi.....	60
4.2. TARTIŞMA.....	61
RESİMLER.....	69
ŞEKİLLER.....	72
KAYNAKLAR.....	97
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	102

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1: *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Taksonomisi

Tablo 2.2: *Geobacillus* cinsine ait türler

Tablo 2.3: Termofilik Mikroorganizmalara ait Ürünlerin Kullanım Alanları

Tablo 3.1: Kullanılan Karbon Kaynakları

Tablo.3.2: Lipit Analizinde Kullanılan Besiyeri ve Bakteri Miktarları

Tablo.4.1:Lizozim Duyarlılığı (OD 540nm)

Tablo 4.2: Sodyum Azid Duyarlılığı (OD 540 nm)

Tablo 4.3: Değişik NaCl Konsantrasyonlarında Bakterilerin Üremeleri (OD 540)

Tablo 4.4: GE1'in Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

Tablo 4.5: GE2'nin Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

Tablo 4.6: AH1'in Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

Tablo 4.7: AH2'nin Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

Tablo 4.8: GE1'in 1000 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

Tablo 4.9: GE2'nin 680 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

Tablo 4.10: AH1'in 1130 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

Tablo 4.11: AH2'nin 1120 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

Tablo 4.2.1: GE1 ve GE2'nin Fenotipik Özelliklerinin Diğer *Geobacillus* Türleri ile Karşılaştırılması

Tablo 4.2.2: AH1 ve AH2'nin Fenotipik Özelliklerinin Diğer *Anoxybacillus* Türleri ile Karşılaştırılması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Canlıların Filogenetik Sınıflandırılması

Şekil 2.2: *Geobacillus* cinsinin diğer *Bacillus* cinsleri ile ilişkisi

Şekil 3.1: Bakterilerin izole edildikleri sıcak su kaplıcaları

Şekil 4.1: Bakterilerin Hareket Testi

Şekil 4.2: Sıcaklığın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.3: Sıcaklığın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.4: Sıcaklığın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.5: Sıcaklığın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.6: pH'nın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.7: pH'nın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.8: pH'nın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.9: pH'nın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.10: Zamanın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.11: Zamanın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.12: Zamanın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.13: Zamanın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.14: Nişasta Hidroliz Testi

Şekil 4.15: Katalaz Testi

Şekil 4.16: Lipaz Testi

Şekil 4.17: Jelatin Hidroliz Testi

Şekil 4.16: Üreaz Testi

Şekil 4.19: İndol Testi

Şekil 4.20: İzolatlara ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin Standartların Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması

Şekil 4.21: İzolatlara ait Fosfolipitlerin Standartların Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması

Şekil 4.22: İzolatlara ait Glikolipitlerin Standartların Glikolipitleri ile Karşılaştırılması

Şekil 4.23: İzolatlara ait Aminolipitlerin Standartların Aminolipitleri ile Karşılaştırılması

Şekil 4.24: GE1'in Filogenetik Durumu

Şekil 4.25: GE2'nin Filogenetik Durumu

Şekil 4.26: AH1'in Filogenetik Durumu

Şekil 4.27: AH2'nin Filogenetik Durumu

RESİM DİZİNİ

Resim 3.1: Hısta sıcak su kaynağı

Resim 3.2: Ilısu kaplıcası

Resim 4.1: GE1'in gram boyama özelliği

Resim 4. 2 : GE2'nin gram boyama özelliği

Resim 4.3 : AH1'in gram boyama özelliği

Resim 4.4 : AH2'nin gram boyama özelliği

Resim 4.5 : AH1'in spor boyama özelliği

Resim 4.6 : AH2'nin spor boyama özelliği

KISALTMALAR

NB	Nutrient Broth
LB	Luria Broth
CHCl ₃	Triklor Metan
CH ₃ OH	Metanol
H ₂ O	Su
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
H ₂ SO ₄	Hidrojen Sülfat
Ce (SO ₄) ₂	Seryum Sülfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonukleik asit
rRNA	Ribozomal Ribonukleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
TE	Tris- EDTA Tamponu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
NaCl	Sodyum Klorür

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaları belli, geçerli ve devamlı bir klasifikasyona tabi tutma fikri eskiden başlamış olmasına karşın, yeni mikroorganizmaların bulunması ve bunların değişik karakterlere sahip olmaları nedeniyle yapılan sistematikler devamlı değişmekte ve yerlerine yeni bulgulara uygun olanları hazırlanmakta ve konulmaktadır.¹

Günümüzde biyosferin yaygın ve önemli bir kısmını oluşturan mikroorganizmaların besin üretiminde kullanılanlar ve hastalık yapanlarının dışında büyük bir çoğunluğu, tanımlanamamıştır.²

Son yıllarda mikrobiyolojide yüksek sıcaklıklardaki karasal sıcak su kaynaklarında yapılan çalışmalar filogenetik ve fizyolojik farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Bakteri popülasyonları ile çalışmak çok büyük karmaşıklığa ve bir çok üyenin kültüre alınabilme özelliğinden dolayı oldukça zordur. Ancak DNA'ya dayanan analizler bu çevrelerden izole edilen bakterilerin karakterize edilmesine büyük katkı sağlamıştır.³

Sıcaklık çevresel değişkenler arasında en önemli etkenlerden biridir. Yaşayan organizmaların sınıflandırılması sık sık biyolojik sistemlerde temel olarak düşünülen sıcaklıkla yakından ilişkilidir.⁴

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır. Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır.⁵

Yaşam koşullarımızdan oldukça farklı şartlarda yaşayan ekstrem canlı gruplarından biri olan termofilik bakteriler son yıllarda yoğun ilgi duyulan araştırma odaklarından biri olmuştur. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkansız olduğu sıcaklıklarda bile enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir.² Bu organizmalar 45 - 80 °C aralığında kolayca üreyebilmektedirler.⁶

Termofilik bakterilerle ilgili yapılan çalışmaların çoğu *Bacillus* cinsine ait Grup 5 içinde sınıflandırılan bakterilerle ilgilidir. Bu cinse ait termofilik bakteriler genelde aerobik veya fakültatif anaerobik gram pozitif spor formu oluşturan bakteriler olup Grup 1 ve 5 içinde sınıflandırılmıştır.⁷

Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklardaki ortamlarda yaşayabilmeleri için ve hücrenin dayanıklı olması için hücre membranlarındaki doymuş yağ asitlerinin oranının fazla olduğu, yağ asitlerinin hücre için hidrofobik bir ortam oluşturduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur.⁸

Dünyamızda solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır.² Özellikle Türkiye'yi de içeren İtalya, Bulgaristan, Yunanistan, Çin, Hindistan, Yellow Stone Ulusal parkı ve İzlanda gibi dünyanın farklı bölgelerdeki birçok jeotermal alanlardan termofilik bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonu yapılmıştır.⁹

Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde İller Bankası'nın 2001 yılında yayınlamış olduğu listeye göre resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. Yapılan literatür araştırmaları bu alanda daha önce yapılmış kapsamlı çalışmaların olmadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca ülkemiz

sınırları içinde ise sıcaklığı 40 °C'nin üzerinde olan 133 adet sıcak su kaynağı bulunmaktadır.²

Sıcak su kaynakları ve greyzler, sıcak su, buhar ve bazen düşük pH, cıva gibi zararlı elementler ile karakterize edilir. Bu alanlar ve son çalışmalar evrimci biyologlar, biyoteknoloji potansiyeli ve astrobiyoloji tarafından ilham alınmıştır.¹⁰

Bu çalışmada, daha önce bakteri izolasyonu ve tanımlanması yapılmayan Mardin ili Dargeçit ve Şırnak ili Güçlükonak ilçeleri sıcak su kaynaklarından su ve çamur örnekleri alınarak biyoteknolojik açıdan önemli termofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca tanımlanmış olan termofilik bakterilerin yeni tür veya alt tür olup olmadıklarının tespit edilmeleri taksonomik açıdan önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Temel Mikrobiyoloji. Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/> 19.04.2010
2. Akkaya, S.; Kıvanç, M. Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram Negatif Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, **2009**, 07, 01-23.
3. Abou-Shanab, R.A.I. Caharacterization and 16S rDNA Identification of Thermo-tolerant Bacteria Isolated from Hot Springs, Journal of Applied Sciences Research, **2007**, 3(10), 994-1000.
4. Nicolaus, B.; Improta, R.; Manca, M.C.; Lama, L.; Esposito, E.; Gambacorta, A. *Alicyclobacilli* from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann, Polar Biol, **1998**, 19, 133-141.
5. Kıran, Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9(1), 12-19
6. Akhmaloka, A.; Suharto, S.; Nurbaiti, I.N.; Tika & F.M. Warganegara. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater, PROC. ITB Eng. Science, **2006**, 38, 1-10.
7. Savas, S.; Adıgüzel, A.; Inan, K.; Ozkan, H.; Gulluce, M.; Sahin, F. Molecular characterization of thermophilic bacteria isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal hot spring, *Biotechnological Letters*, **2009**, 14, 4445-4454.
8. Coşkun, A. *Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni Bacillus sp.Suşlarının İzolasyonu ve Karekterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 4s, 2010

9. Adigüzel, A.; Ozkan, H.; Baris, O.; Inan, K.; Gulluce, M.; Sahin, F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot spring in Turkey, *Journal of Microbiological Methods*, **2009**, 79, 321-328.

10. Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. Life in extreme environments, *Nature*, **2001**, 409, 1092-1101.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. MİKROORGANİZMALARIN TARİHÇESİ

Mikroorganizmaları ilk bulan, şekillerini çizen ve hareketlerini izleyen A. van Leeuwenhoek'dan sonra, İŖveçli bir botanist olan Carl von Linne (Carolus Linneaus) bakterileri kendi yaptığı bir sınıflamaya dahil etmiş ve ilk defa binomial sistem içinde sınıflandırmaya çalışmıştır. Linne "Species Plantarum ve Systema Naturae" adlı eserinde binomial sisteme göre isimlendirmeye özen göstermiştir. Bu sistemde, bir mikroorganizma iki bilimsel adla belirlenmektedir. Bunlardan biri cins (genus) ve diğeri de tür (species) ismidir. Danimarkalı bir doğa bilimcisi olan Otto Frederich Müller, 1773'de, mikroorganizmaları sınıflandırmaya çalışmış ve kendi sistematüğinde bakteri içeren iki cinse yer vermiştir. 1-Monas: oval ve yuvarlak bakteri türlerini ve 2- Vibrio: uzun formu (çomak biçiminde) olanları içine almaktadır. Mikroorganizmaların morfolojik karakterlerini esas alan bir klasifikasyon F.Cohn tarafından 1872'de yapılmıştır. Bu sınıflamada birçok sporlu mikroorganizmalara da yer verilmiştir. Migula, 1897'de, mikroorganizmaları sadece morfolojilerine göre değil, aynı zamanda renk (koloni) ve bazı fizyolojik karakterlerini dikkate alan (nitrogen fiksasyonu gibi) bir sistem geliştirmiş ve bunu "System of the bacteria" adı altında yayımlamıştır. D.F.Chester, 1899 ve 1901 yılları arasında, "Manual of determinative bacteriology"yi yayımlamışlar ve bu eser, "Society of American Bacteriologists" in kurulmasına önderlik etmiştir. 1923'de Society of American Bacteriologists tarafından "Manual of Determinative Bacteriology" yayımlanmıştır. Bu kitabı hazırlayan komitenin başına da D.H. Bergey getirilmiştir. Bu manual zamanla 1984-1986 yıllarında "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" adı altında yayın çıkarılmıştır.¹

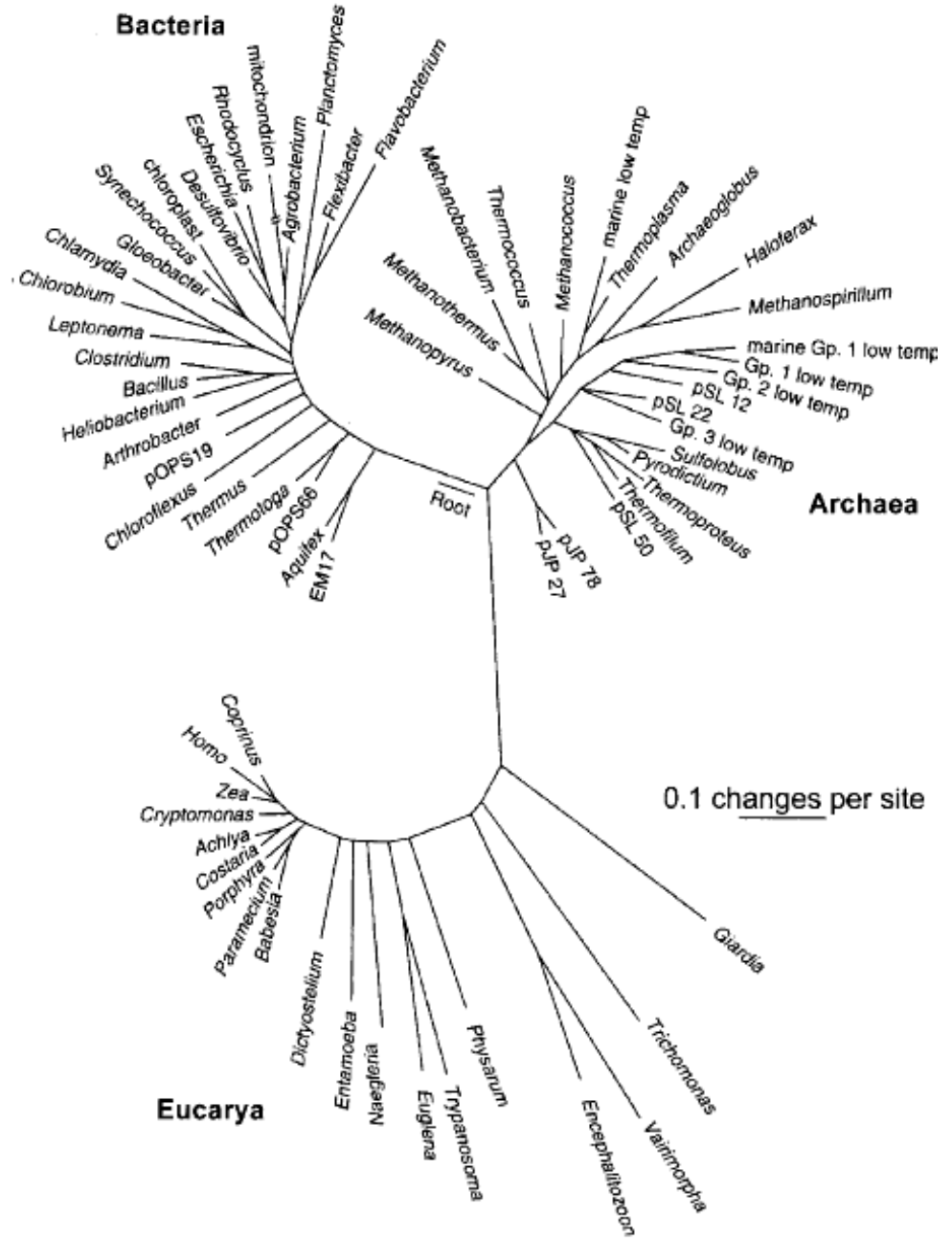
2.2. BAKTERİ SINIFLANDIRMASI

Canlılar 16S rRNA dizi analizlerine göre incelendiğinde Archaea, Bacteria ve Eucarya olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1). Mikroorganizmaların özellikleri, onları yüksek canlılarda uygulandığı gibi filogenetik temele dayalı olarak tam bir şekilde tür, cins, familya, takım, sınıf, şube taksonomik dizisine uygun bir sınıflandırma yapılabilmesi için sınırlıdır.²

Tarihsel gelişim içinde bakterilerin taksonomisi konusunda bir çok karakterler esas alınarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bunlardan bazıları;

2.2.1. Doğal (filojenik) klasifikasyon: Bu sistematığın esasını, mikroorganizmalardan birbirlerine çok benzeyenler bir araya toplamak ayrı karakter taşıyanları çıkarmak oluşturmaktadır. Burada benzerlik kavramı içinde, morfolojik, kültürel, fizyolojik, biyokimyasal, kimyasal, patolojik, vs. özellikler bulunmaktadır.¹

2.2.2. Numerikal (sayısal) klasifikasyon: Bu yöntemde, belli başlı özellikler ile benzerlik gösteren çok sayıda bakteri kökenleri incelenir. Her bakteri kökeninde görünüm, hücre ince yapısı, metabolizma ve enzimler ile ilgili yüzeylerle karakter incelenir ve sonuçlar bilgisayarlara verilir. Bu özellikleri bakımından yakından uzaktan benzerlik gösteren kökenler gruplandırılır.²



(Clarridge, 2004)³

Şekil 2.1: Canlıların Filogenetik Sınıflandırılması

2.2.3. Genetik klasifikasyon: Bakterilerde belirli yöntemlerle yapılan DNA+DNA hibridizasyon deneylerinde ayrı bakterilere ait olan iki tek DNA sarmalı

birbirleri ile karşılaştıklarında birbirlerine uyan bazlar karşılıklı olarak birleşerek çift sıralı hibrit DNA'lar oluşturabilirler. İki bakteri filogenetik bakımdan birbirlerine ne kadar yakın iseler, nükleotid bazları arasındaki birleşme sayısı o kadar fazla olur. Bu şekilde DNA'ları birbirleri ile %70 ve daha fazla oranda birleşme gösteren iki bakteri aynı türden sayılırlar. Bakterilerde DNA/DNA hibridizasyonları dışında DNA/RNA ve 16S rRNA gen sıralarının analizi de türler arası ilişkileri saptamada yararlanılan yöntemlerdir.²

2.2.4. Antijenik klasifikasyon: Bazı bakteri familya veya cinslerini kapsayan ve antijenik yapılarını esas alan bir klasifikasyon çeşididir.

2.2.5. Fajla tiplendirme: Türler içi veya türler arası ilişkiyi saptamada fajla tiplendirme de kullanılmaktadır. Aynı türe ait suşlar, kendilerine özgü fajlara göre gruplara ayrılabilirler.¹

2.2.6. Kemotaksonomi: Daha az oranda spesifitesi olan ve bakterilerin kimyasal yapılarını esas alan bir sınıflandırmadır. Bu kimyasal yapılar arasında, başlıca, hücre duvar kompozisyonu, lipid kompozisyonu, çeşitli proteinlerin amino asit sıraları ve türleri, enzim karakterleri vs. vardır.¹

2.3. Gram-pozitif Endospor Oluşturan Basiller

Birçok bakteri cinsi endospor-formu oluşturabilmektedir.⁴ Bunlardan gram pozitif çubuk şeklinde, zorunlu aerobik olan *Bacillus* cinsi ve zorunlu anaerobik *Clostridium* cinsi en iyi bilinenleridir.^{4,5} Bu organizmalar çevresel şartlara karşı değişime uğrarlar. Besin yokluğunda her bir hücre tek bir internal spor oluşturur.⁴

Hareketsiz bir hücre olan spor sıcaklıktan dolayı, kurumaya ve kimyasal ajanlara karşı oldukça dirençlidir. Uygun ortam sağlandığı zaman spor gelişmeye başlar ve tek bir vejetatif hücre oluşur.⁴ Sporların oluşumu bakterinin karbonhidrat kaynaklarının tükenmesi sonucu hücrelerin üremeyi durdurmasından 4 ile 8 saat sonra meydana gelir.⁵

Tablo 2.1: *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Taksonomisi (Garrity ve ark, 2007)⁶

Sistemik Durum	Tür/Alt tür sayısı
Domain <i>Bacteria</i>	
Filum <i>Firmicutes</i>	
Sınıf <i>Bacilli</i>	
Takım <i>Bacillales</i> ^{AL}	
Familya I. <i>Bacillaceae</i> ^{AL}	
Cins I. <i>Bacillus</i> ^{AL}	135
Cins II. <i>Alkalibacillus</i> ^{VP}	4
Cins III. <i>Amphibacillus</i> ^{VP}	3
Cins IV. <i>Anoxybacillus</i> ^{VP}	11
Cins V. <i>Caldalkalibacillus</i> ^{VP}	1
Cins VI. <i>Cerasibacillus</i> ^{VP}	1
Cins VII. <i>Exiguobacterium</i> ^{VP}	10
Cins VIII. <i>Filobacillus</i> ^{VP}	1
Cins IX. <i>Geobacillus</i> ^{VP}	18
Cins X. <i>Gracilibacillus</i> ^{VP}	4
Cins XI. <i>Halobacillus</i> ^{VP}	10
Cins XII. <i>Halolactibacillus</i> ^{VP}	2

Cins XIII. <i>Jeotgalibacillus</i> ^{VP}	1
Cins XIV. <i>Lentibacillus</i> ^{VP}	5
Cins XV. <i>Marinibacillus</i> ^{VP}	4
Cins XVI. <i>Oceanobacillus</i> ^{VP}	5
Cins XVII. <i>Ornithinibacillus</i> ^{VP}	2
Cins XVIII. <i>Paraliobacillus</i> ^{VP}	1
Cins XIX. <i>Paucisalibacillus</i> ^{VP}	1
Cins XX. <i>Pontibacillus</i> ^{VP}	2
Cins XXI. <i>Saccharococcus</i> ^{VP}	1
Cins XXII. <i>Salinibacillus</i> ^{VP}	2
Cins XXIII. <i>Tenuibacillus</i> ^{VP}	1
Cins XXIV. <i>Thalassobacillus</i> ^{VP}	1
Cins XXV. <i>Ureibacillus</i> ^{VP}	4
Cins XXVI. <i>Virgibacillus</i> ^{VP}	15
Cins XXVII. <i>Salibacillus</i> ^{VP}	
Cins XXVIII. <i>Vulcanibacillus</i> ^{VP}	1
Familija II. <i>Alicyclobacillaceae</i>	
Cins I. <i>Alicyclobacillus</i> ^{VP}	16
Cins II. <i>Pasteuria</i> ^{AL}	4
Cins III. <i>Sulfobacillus</i> ^{VP}	4
Familija III. <i>Caryohanaceae</i> ^{AL}	
Cins I. <i>Caryophanon</i> ^{AL}	2
Familija IV. <i>Listeriaceae</i>	
Cins I. <i>Listeria</i> ^{AL}	8
Cins II. <i>Brochothrix</i> ^{AL}	2
Familija V. <i>Paenibacillaceae</i>	

Cins I. <i>Paenibacillus</i> ^{VP}	96
Cins II. <i>Ammoniphilus</i> ^{VP}	2
Cins III. <i>Aneurinibacillus</i> ^{VP}	8
Cins IV. <i>Brevibacillus</i> ^{VP}	24
Cins V. <i>Cohnella</i> ^{VP}	2
Cins VI. <i>Oxalophagus</i> ^{VP}	2
Cins VII. <i>Termicanus</i> ^{VP}	1
Cins VIII. <i>Termobacillus</i> ^{VP}	1
Familya VI. <i>Planococcaceae</i> ^{AL}	
Cins I. <i>Planococcus</i> ^{AL}	6
Cins II. <i>Filibacter</i> ^{VP}	1
Cins III. <i>Kurthia</i> ^{AL}	3
Cins IV. <i>Planomicrobium</i> ^{VP}	11
Cins V. <i>Sporosarcina</i> ^{AL}	8
Familya VII. <i>Sporolactobacillaceae</i>	
Cins I. <i>Sporolactobacillus</i> ^{AL}	6
Cins II. <i>Marinococcus</i> ^{VP}	4
Cins III. <i>Sinococcus</i> ^{VP}	1
Familya VIII. <i>Staphylococcaceae</i>	
Cins I. <i>Staphylococcus</i> ^{AL}	54
Cins II. <i>Gemella</i> ^{AL}	7
Cins III. <i>Jeotgalicoccus</i> ^{VP}	3
Cins IV. <i>Macrococcus</i> ^{VP}	8
Cins V. <i>Salinicoccus</i> ^{VP}	4
Familya IX. <i>Thermoactinomycetaceae</i> ^{VP} .	
Cins I. <i>Thermoactinomyces</i> ^{AL}	3

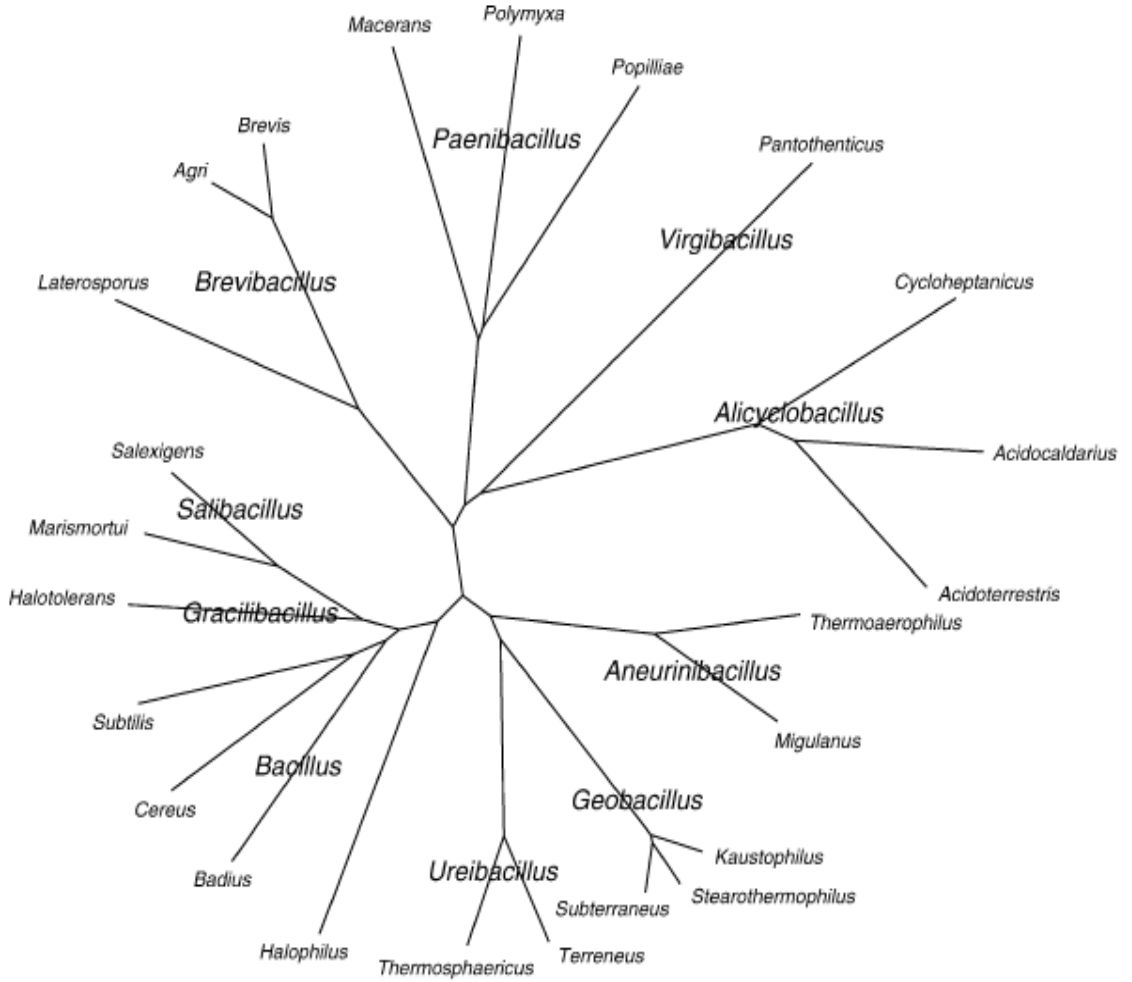
Cins II. <i>Laceyella</i> ^{VP}	5
Cins III. <i>Planifilum</i> ^{VP}	2
Cins IV. <i>Seinonella</i> ^{VP}	2
Cins V. <i>Thermo flavimicrobium</i> ^{VP}	2
Familya X. <i>Turicibacteraceae</i>	
Cins I. <i>Turicibacter</i> ^{VP}	1

Bacilli sınıfı yapılan sınıflandırmaya göre *Bacillales* takımında 10 tane familya ayrılmıştır (Tablo 2.1). Bu familyalarda bulunan cinslerin çoğu endospor oluşturmaktadır. Bu çalışmada *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine ait türler izole edilmiştir. Bundan dolayı burada detaylı olarak bu cinslerin özellikleri anlatılacaktır.

2.3.1. *Geobacillus* Cinsi

Bacillus cinsini oluşturan gram-pozitif, endospor formu bakteriler son bir kaç yılda *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Gracilibacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus* ve *Virgibacillus* gibi bir çok cinsine ayrılmıştır⁷ (Tablo 2.1), (Şekil 2.2). *Geobacillus* cinsine ait türler *Bacillus* cinsi içerisinde değerlendiriliyordu. Daha sonra ayrı bir cins olarak değerlendirildi.⁸ *Geobacillus* cinsi 2001 yılında ilk olarak Nazina ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Bu cins çubuk şeklinde, endospor oluşturan, gram- pozitif hücre duvarına sahip fakat bu durum değişiklik gösterebilir. Bu cins fakültatif anaerobik veya aerobik olabilmektedir. Zorunlu termofilik türleri 37-75 °C arasında üreyebilmekte ve optimumu 55-65 °C arasında değişmekte, nötrofilikler pH 6.0 ile 8.5 arasında üremektedir.⁷ Bunlar satüre edilmiş yağ asidi içerirler.^{8,10} 16S rRNA dizi

analizleri % 96.5'ten daha fazla benzerlik göstermekle birlikte DNA' daki G+C oranları % 48.2-58 mol'dur.^{7,11}



Şekil 2.2: *Geobacillus* cinsinin diğer *Bacillus* cinsleri ile ilişkisi (Marchant and Banat, 2010)⁷

Geobacillus cinsine ait türler dünyada doğal ve insan yapımı termal habitatlarda yayılış göstermektedir.¹² Günümüzde *Geobacillus* cinsine ait 19 tane geçerli tür tanımlanmıştır^{7,9,13} (Tablo 2.2). Bu türler esas olarak doğaya geniş bir

ölçüde yayılmışlardır.⁷ Bazı izolatlar serin toprak bölgelerinden (*Geobacillus debilis*)^{7,14}, yüksek sıcaklıktaki petrol rezervlerinden (*Geobacillus lituanicus*)¹⁵, saman gübresinden (*Geobacillus toebii*)⁸, sıcak su kaynaklarından (*Geobacillus gargensis*)⁹ izole edilmiştir.

Geobacillus cinsinin karakteristik özelliklerinden biri endospor oluşturmalarıdır. Mezofilik basillerde endospor değişik çevre koşullarında yaşamalarını sağlamaktadır. Mezofilik bakterilerde vejetatif hücrelerinin farklılığı, sıcaklık ve kimyasal ajanlar tarafından öldürülerek kolayca anlaşılabilir. Fakat bu durum termofilik bir mikroorganizma olan *Geobacillus* cinsi için gösterilmemiştir. Çünkü *Geobacillus* cinsi bu ajanlara karşı vejetatif hücreler tarafından dirençlilik göstermektedir. Bu yüzden sporların dağılımı ve *Geobacillus*'ların bu çevrelerde hayatta kalmaları direkt olarak henüz saptanamamıştır.⁷

Tablo 2.2: *Geobacillus* cinsine ait türler

<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>
<i>Geobacillus debilis</i>
<i>Geobacillus gargensis</i>
<i>Geobacillus jurassicus</i>
<i>Geobacillus kaustophilus</i>
<i>Geobacillus lituanicus</i>
<i>Geobacillus pallidus</i>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Geobacillus subterraneus</i>

<i>Geobacillus tepidamans</i>
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
<i>Geobacillus toebii</i>
<i>Geobacillus uzenensis</i>
<i>Geobacillus vulcani</i>
<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>
<i>Geobacillus zaliwane</i>

(Rahman ve ark. 2007)⁹

2.3.2. *Anoxybacillus* Cinsi

Termofillerin ilk rapor edilmişinden günümüze kadar, bir çok spor oluşturan termofilik bakterilerin türü rapor edilmiş olup bunlar genelde *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine aittir.¹⁶

Anoxybacillus cinsi *Bacillus* cinsinden ayrılmıştır ve ilk türü *Anoxybacillus pushchinoensis* DSM 12423^T dir. İlk olarak bu cinse ait tür Pikuta ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.¹⁷ İlk tanımlamalar bu türün zorunlu anaerob olduğu şeklindeydi. Daha sonra pikuta ve arkadaşları bu türün doğru olarak tanımlaması sonucu bunların zorunlu anaerob veya aerotolerant anaerob şeklinde olabildiğini belirtmiştir. Ayrıca yapılan daha ayrıntılı tanımlamalar sonucunda *Anoxybacillus* cinsin zorunlu anaerob, fakültatif anaerob, aerotolerant anaerob veya fakültatif anaerob şeklinde değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.¹⁷ Bu cinsin şimdiye kadar

tanımlanan 11 tane türü bulunmaktadır. Bunlar; *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus voinovskinsis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Anoxybacillus amylolyticus*, *Anoxybacillus rupiensis* ve *Anoxybacillus bogrovensis*' dir.¹⁸ Ayrıca Batman (Türkiye) sıcak su kaplıcasından *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* olarak adlandırılan yeni bir alt tür izole edilmiştir.^{18,19}

2.4. Termofilik Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında psikrofiller (20 °C altında), mezofiller (20-55 °C) ve termofiller (55 °C üzeri) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Bunların haricinde Kristjansson ve Stetter (1992) termofil grubunu daha da genişleterek 60-80 °C arasında üreyenler için ekstremofil, 80 °C'nin üzerinde üreyenler için ise hipertermofil tanımını kullanmıştır. Gerek termofilik gerekse hipertermofilik enzimler karakteristik olarak 40 °C'nin altında etkin bir aktivite göstermezler.²⁰ Ekstrem termofilik mikroorganizmalar genellikle Arkea (Archeae)'lara dahil edilen mikroorganizmalardır.^{20,21}

Termofilik bakterilerin karakterizasyonu ile ilgili ilk çalışma aerobik sporformlu ve 70 °C' de üreyen bakteriler ile yapılmıştır.^{22,23} İlk termofilik bakteri 1888'de Miquel tarafından tanımlanmıştır.²³ Daha sonra *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait bir çok spor formlu bakteri türü izole edilmiştir.^{22,23}

Termofilik ve hipertermofilik anaerob mikroorganizmalar kıtasal ve deniz altı volkanik bölgelerden, jeotermal elektrik santralleri olarak ısınmış sedimentlerden ve hidrotermal ağızlardan izole edilmekteler.²⁴ Anaerobik termofiller, aerobik

termofillere göre daha çok çeşitlilik göstermektedir ve ekstrem yüksek sıcaklıklarda çoğalmaları daha kolaydır. Zorunlu anaerobik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük pH'da adaptasyon göstermektedirler.²⁵

Mikroorganizmalar yaşayan tüm canlılar gibi yaşamak zorunda olduğu şartlara adapte olmuşlardır. Termofillerin termostabil, denatüranlara ve proteolizlere karşı direçli proteinler içerdikleri rapor edilmiştir. Bu organizmalar tarafından özelleşmiş bu proteinler şaperon olarak bilinmektedir. Bu proteinlerin, katlanarak eski doğal yapısını geri kazanmasını sağlamaktadır. Termofillerin hücre duvarı doymuş yağ asitleri içermektedir. Bu yağ asitleri hidrofobik bir ortam oluşturarak hücrelerin sert bir yapı kazanmalarını sağlayarak yüksek sıcaklıklarda yaşamalarını sağlamaktadır.²⁶

Termofillerin DNA'ları ters DNA giraz içermektedir. Bu DNA giraz, pozitif süper sarmal oluşturur. Bu, DNA 'nın erime noktasını yükselterek organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına kadar yükseltir. Ayrıca termofiller nontermotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri yükselterek yüksek sıcaklıkları tolere eder.²⁶

Termofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik potansiyellerinden ve önemli ekolojik fonksiyonlarından dolayı büyük ilgi çekmektedirler. Bu grup mikroorganizmaların biyoteknolojik alanlara sağladığı katkılar; 1) Kısa zamanda çoğalmaları yüksek oranda üreme kapasitelerini sağlamaktadır. 2) Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler geniş sıcaklık ve pH aralıklarında daha stabildir. 3) Çünkü bunların biyosentetik aktiviteleri farklıdır, termofiller değerli metabolitlerin üretimi için aday olabilecek özelliktedir.²⁷

Aşağıdaki tabloda termofilik mikroorganizmalardan elde edilen ürünler ve biyoteknolojide kullanım alanları gösterilmektedir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Termofilik Mikroorganizmalara ait Ürünlerin Kullanım Alanları

<u>Kaynak</u>	<u>Kullanım</u>
DNA polimeraz	PCR ile DNA amplifikasyonunda
DNA ligaz	Ligaz reaksiyon zinciri (LCR)
Alkalin fosfataz	Teşhis
Proteaz ve lipaz	Süt ve süt ürünlerinde
Lipaz, pullanaz, amylopullulanaz, proteaz α - Amilaz, glukoamilaz, α - glukosidaz, xyloze ve glukoz izomeraz	Fırıncılık, biracılık, keratinden amino acid üretiminde
Alkol dehidrogenaz	Kimyasal sentezlerde
Xylanases	Kağıt beyazlatmada
Antibiyotik	Eczacılıkta ilaç yapımında
Kükürt oksitleyici mikroorganizmalar	Biyoliç, kömür, atık gaz Desülfürizasyon
Termofilik mikroorganizmalar	Atık arıtma ve metan üretiminde

(Satyanarayana, 2005)²⁸

2.5. Bakterilerin Tanımlanması

Bakterilerin identifikasyonları için morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik özelliklerini ortaya çıkaran analizler yapılmaktadır.

2.5.1. Morfolojik Özellikleri

Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle ancak mikroskoplar (ışık mikroskobu, karanlık saha, faz kontrast, elektron mikroskop, vs.) altında gözlenerek, saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin bireysel formları (yuvarlak, oval, kokoid, çomak, kokobasil, virgül, spiral, pleomorfik, vs.), büyüklüğü (küçük, büyük, vs.), kenarları (düz, köşeli, eğri, paralel, vs.), dizilişi (küme, zincir, filament, vs.), spor durumu (var veya yok, varsa terminal, subterminal, sentral, lateral, vs.) ve boyanma özelliği (Gram negatif veya pozitif) incelenir. Ayrıca sıvı ortamlardan hazırlanan preparatlarla hareketli olup olmadıkları hakkında bir fikir edinilebilir ve aynı zamanda morfolojileri belirlenir.²⁹

2.5.2. Fizyolojik Özellikleri

Bakterilerin cinslerine göre fizyolojik karakterleri de değişmektedir. Üreme ısıları, inkubasyon süreleri, oksijene ihtiyaç durumları, besi yerinin bileşimi ve diğer fizyolojik özelliklerinin araştırılması ve saptanması gereklidir.²⁹

2.5.3. Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmaların identifikasyonlarında biyokimyasal aktivitenin belirlenmesinin önemi çok fazladır. Bu amaçla, çok değişik testler kullanılır. Bunlar arasında, nişasta, indol, jelatin, üre, katalaz, fosfataz gibi testler, mikroorganizmaların türüne göre seçilerek kullanılır.²⁹

2.5.4. Genetik Özellikleri

Bakterilerin genetik materyalleri, kompozisyon bakımından farklar gösterirler. Türler arasında baz sırası ve sayısı hemen hemen aynı ve sabit olmasına karşın, aynı cinsin farklı türleri arasında da değişiklik bulunmaktadır. Özellikle, G+C oranının % olarak değeri türler arasında ayırıcıdır. Genetik yönden yakınlıkları saptamada DNA'daki baz homologluk oranının belirlenmesi önem taşır ve bu hibridizasyon yöntemleri ile belirlenir.²⁹

Yağ asidi methyl ester, rep-PCR profilleri ve 16S rRNA dizi analizi gibi moleküller biyoloji tekniklerinin ilerlemesi ile mikroorganizmaların tür ve alt türlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu için oldukça büyük fırsatlar sağlanmıştır.²²

2.5.5. Lipit Analizi

Bazı organizmalarda çevre sıcaklığındaki değişikliğe yanıt olarak membran lipid kompozisyonu değiştirilir ve bunun sonucunda membranın değişik fonksiyonları için gerekli olan optimum membran akıcılığı sağlanmış olur. Bu durum "homeoviscos adaptasyon" şeklinde adlandırılır. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu tanımın genel olmayıp genotipte meydana gelebilecek değişikliklere bağlı olarak

lipidlerde değişiklik olması nedeniyle organizmadan organizmaya değiştiiğini göstermiştir. Organizmanın genotipinde meydana gelen değişiklik termofil ve psikrofil gibi bakterilerin ekstrem çevre koşullarında yaşamaya uyum sağlamalarına yardımcı olur. Membranın protein içeriği ve lipid gruplarının değişmesiyle karotenoid tipi, yağ asidi zincirinin uzunluğu ve yağ asitlerindeki cis ve trans oranları değişir.³⁰

Yağ asitleri lipidlerin esas maddesidir. Basit lipiler trigliseritler olarak adlandırılırlar. Kompleks lipidler, fosfat, azot kükürt şeker vb. maddeler bulunduran lipidlerdir. Fosfolipitler ve glikolipitler kompleks lipidlerdir. Fosfolipitler sitoplazma zarının yapısında bulunan önemli bileşiklerdir. Lipitlerin hidrofilik ve hidrofobik uçlarının olması sitoplazma zarının bariyer özelliği göstermesinde çok önemli ve istenen bir özelliktir. Fosfolipit çeşitlerinden biri olan fosfatidiletanolamin mikroorganizmalarda fazla bulunabilir. Fosfatidilserin ve fosfatidilinositol da bakterilerde bulunan fosfolipitlerdendir. Glikolipitler membranın dış yapısında bulunurlar. Hücrenin çevre ile iletişim kurmasında görevlidirler. Sfingolipitlere ise uzun zincirli alfatik aminler ihtiva eden lipidler sınıfını oluşturur.³¹

2.6. Önceki Çalışmalar

Beffa ve ark. (1996)³² *Thermus* türlerini 65 ile 82°C arasındaki termal karışımlardan izole etmişlerdir. Optimum üreme sıcaklığını 65-75°C olarak tespit etmişlerdir. DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda bu bakterilerin *Thermus thermophilus* HB8 türleriyle çok yakın olduğunu gözlemlemişlerdir.

Studholme ve ark. (1999)³³ Termofilik *Bacillus* türlerinin filogenetik analizlerini yapmışlardır. Bunun için 16S rRNA genlerini kullanmışlardır.

Nicolaus ve ark. (1998)³⁴ Antartika'nın keşfedilmemiş Mount Rittmann geotermal bölgesinden *Alicyclobacillus* cinsine ait bir alt tür izole etmişlerdir. İzolatın termoasidofilik olduğunu, optimum sıcaklığını 63 °C ve üreme aralığının 45-70 °C arasında pH'yı ise 3.5- 4.0 olarak belirlemişlerdir. MR1 olarak adlandırdıkları izolatın türün C+G oranını % 64,9 olarak tespit etmişler ve 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda % 99.3 *Alicyclobacillus acidocaldarius* ile benzerlik olduğunu tespit etmişlerdir. DNA-DNA homolojisi % 69.7 oranında *A. acidocaldarius* DSM 446. ile uyumlu çıkmıştır ve bu türün *Alicyclobacillus* cinsine ait *acidocaldarius*'nin alt türü olarak ritmannii şeklinde adlandırmışlardır.

Pikuta ve ark. (2000)³⁵ anaerobik, alkalifilik, ılımlı, fermentatif, spor oluşturan yeni bir termofilik bakteriyi gübre örneklerinden izole etmişlerdir. İzolatın gram pozitif, düz, hareketsiz, çubuk şeklinde, üreme sıcaklığı ve pH sırasıyla 37-66 °C (optimum 62°C) ve pH 8.0-10,5 (optimum 9,5-9,7) olarak belirlenmiştir. Bakteri,

D-gulkoz, sükröz, D-fruktoz, D-trehaloz ve nişasta karbon kaynaklarında ürettiği ve vitaminlere gereksinim duyduğu, yeast ekstrakta üremenin fazlaştığı gözlemlenmiştir. Ana metabolik üretimin H₂ ve asetat olduğu, katalaz testinin negatif olduğu gözlemlenmiştir. DNA'daki G+C oranı % 42.2 mol olarak bulunmuş, fenotipik özellikler, 16S rDNA gen dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu bu izolatin *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu anlaşılmıştır. Bu türü *Anoxybacillus flavithermus* olarak isimlendirmişlerdir.

Nazina, ve ark. (2001)¹¹ Rusya, Kazakistan ve Çin'deki petrol alanlarındaki sulardan hidrokarbon oksitleyici 5 tür izole etmişlerdir. Bu türlerin ılımlı termofilik, nötrofilik, hareketli, spor formu, çubuk şeklinde aerobik ya da fakültatif aerobik olduğunu bulmuşlardır. DNA'daki G+C oranı % 49.7 - 52.3 arasında bulunmuştur. Bu bakterilerin biyokimyasal testleri, 16S rRNA gen dizi analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu ve filogenetik ilişkileri incelenerek bu 5 türün yeni *Geobacillus* türleri olduğunu tespit edilmiştir.

Sung ve ark. (2002)⁸ Koredeki saman gübresinden izole edilen spor formulu, çubuk şeklindeki termofilik bakteriyi taksonomik çalışmalara bağlı olarak tanımlamışlardır. Bu mikroorganizma SK-1^T olarak adlandırılmış ve aerobik, gram-pozitif, hareketli ve çubuk şeklinde tanımlanmıştır. Bu izolatin 45 ile 70 °C arasında (optimum 60 °C) ve pH 6 ile 9 arasında (optimum 7.5) ürettiğini bulmuşlardır. Genomik DNA'daki G+C oranını % 43.9 mol olarak bulmuşlardır. Yağ asitleri analizi sonucunda SK-1^T türünün kemotaksonomik karakteristiği *Geobacillus* cinsi ile benzer çıkmıştır. Ayrıca, 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda SK-1^T türü

Geobacillus thermoglucosidasius türü ile yakın benzerlik gösterdiği tespit etmişlerdir. Ancak fenotipik özelliklerinin bu türden oldukça farklı olduğunu bulunmuştur. DNA-DNA benzerlik oranı % 27 olarak tespit etmişlerdir. Fenotipik özellikler ve moleküler sistematik dataya dayanarak SK-1^T türünün yeni bir *Geobacillus* türü olduğunu ve bunun *Geobacillus toebii* sp. olarak adlandırılmasını önermişlerdir.

Beldüz ve ark. (2003)¹⁶ Türkiye'nin, Balıkesir ve Ağrı illerinin sırasıyla Gönen ve Diyadin sıcak su kaynaklarının çamur ve su örneklerinden birbirlerine yakın yedi tane termofilik *Anoxybacillus* cinsi izole etmişlerdir. Bu izolatların 55-60 °C arasında ürediği tespit edilmiş olup, morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır. İzolatların glukoz, nişasta, xyloze ve mannitol gibi geniş karbon kaynaklarında iyi üredikleri ve fakültatif anaerob bakteriler olduklarını tespit etmişlerdir.

Nazina ve ark. (2004)¹⁰ Garga sıcak su kaynağından sporlu yeni bir tür olan termofilik *Geobacillus gargensis* sp. izole etmişler ve tanımlamışlardır. Bu türün aerobik, gram-pozitif, çubuk şeklinde olduğunu, optimum üreme sıcaklığının 60-65 C'de olduğu tespit edilmiştir. DNA'daki G+C oranını %52.9 mol olarak bulmuşlardır. 16S rRNA gen dizi analizi ve yağ asidi analizi sonucunda bunun *Geobacillus* cinsinin bir üyesi olabileceği öngörülmüştür. Yaptıkları fizyolojik, biyokimyasal ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçları bu bulguların desteklemiştir.

Kuisiene ve ark. (2004)¹⁵ Lithuania'da yüksek sıcaklıktaki petrol rezervlerinden izole edilen spor formlu, aerobik, proteolitik, termofilik N-3^T izolatını çalışmışlardır. 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda % 99.4 oranında *Geobacillus thermoleovorans* türüne benzerlik gösterdiği saptanmıştır. N-3^T izolatın G+C oranı % 52.5 mol olarak bulunmuştur. DNA-DNA ilişkisi, morfolojik ve fizyolojik analizler sonucu N-3^T türünün *Geobacillus* cinsinin bir türü olduğunu ve *Geobacillus lituanicus* sp. olarak adlandırmışlardır.

Yumoto ve ark. (2004)³⁶ Kamchatka sıcak su kaplıcalarından yeni ılımlı termofilik TH13^T varyetesini izole etmişlerdir. Türün gram-pozitif, fakültatif, aerob, düz hareketsiz ve çubuk şeklinde olduğunu, 30- 64 °C arasında ürediğini (optimum 54 °C) bulmuşlardır. Varyetenin katalaz ve oksidaz testleri pozitif çıkıp, nitratı nitrite çevirdiği gözlenmiştir. Fakat H₂S üretimi ve % 3'den fazla NaCl (w/v) de üremediğini tespit edilmiştir. İzolatın pH 7-8 ürediği tespit edilmiştir. DNA 'daki G+C oranını %43,9 mol olarak bulmuşlardır. 16S rRNA' ya dayalı filogenetik analizler ve DNA-DNA hibridizasyonu bu türün *Anoxybacillus* cinsinin bir üyesi olduğunu ve bu nedenle *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. olarak adlandırmışlardır.

Dulger ve ark. (2004)¹⁷ Türkiye'deki Rize ve Çanakkale'de bulunan Ayder ve Kestanbol sıcak su kaplıcalarından iki termofilik basil izole etmişlerdir. ABO4^T ve K4^T olarak adlandırdıkları izolatların spor formlu, fakültatif anaerob, gram-pozitif, çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların optimum sıcaklıklarına 50-55 °C, yeni ılımlı termofilik olduklarını bulmuşlardır. Bu türlerin çeşitli karbon kaynaklarında (D-glukoz, D- rafinoz, D-sükroz, D-xylose, D-fruktoz,

L-arabinoz, maltoz, D-mannoz, D-mannitol) üreyebildiklerini tespit etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu sonucu bu türlerin *Anoxybacillus* cinsine ait olduklarını bulmuşlar ve *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. ve *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. olarak adlandırmışlardır.

Schaffer ve ark. (2004)³⁷ Lomer Austria'da Leopoldsdorf şeker pancarı fabrikasından ılımlı termofilik, gram-pozitif, spor formulu iki bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu sonuçları bu türlerin % 89.9 mol birbirlerine benzerlik gösterdiklerini bulmuşlardır. Optimum sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 55 °C ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda bu izolatların *Geobacillus* cinsine ait olduklarını ve bu izolatın yeni tür olarak *Geobacillus tepidamans* sp. şeklinde adlandırmayı önermişlerdir.

Romano ve ark. (2005)³⁸ İtalya'nın güneyindeki Eolian adasındaki volkanik bölgeden aerobik, endospor formulu yeni termofilik bakteri izole etmişlerdir. İzolatın gram pozitif, çubuk şeklinde oldukları, 50-75 °C'de (optimum 70°C) ve pH 5-8 arasında ürediğini (optimum 7) tespit etmişler. İzolatın %0.4 NaCl'de ürediğini fakat hidrokarbon testlerinde üreme gözlenmediğini tespit etmişlerdir. DNA'daki G+C oranı % 54.1mol olarak bulunmuş olup, 16S rRNA gen dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu bu türün *Geobacillus* cinsine yakın olduğunu, filogenetik ve fizyolojik analizler bu türün *Geobacillus thermoleovrans* türünün yeni bir üyesi olduğunu ve *Geobacillus thermoleovrans* subsp. *stromboliensis*, subsp. olarak sınıflandırmayı önermişlerdir.

Kevbrin ve ark. (2005)³⁹ Kamchatka' daki jeotermal kaynaklarından termofilik bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen bakteriyi KG4 olarak adlandırmışlardır. KG4' ün spor oluşturan hareketli, fakültatif, aerob, gram pozitif çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Aerobik olarak glukoz, fruktoz trehaloz, proteinli substratı ve pektini karbon kaynağı olarak kullandıkları bulunmuştur. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığının ve pH'sının sırasıyla 60 °C ve 6.8-8.5 olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA gen dizi analizi ile bu bakterinin *Anoxybacillus kamchatkensis* olarak adlandırılmasına karar vermişlerdir.

Poli ve ark. (2006)⁴⁰ Antartika'daki jeotermal alanlardan yeni bir spor formu olan *Anoxybacillus* türünü izole etmişlerdir. Bu türün gram pozitif olduğunu optimum üreme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 61°C'de ve 5.6 olarak bulmuşlardır. Bu türün galaktoz, trehaloz, maltoz ve sükroz karbon kaynaklarını kullandıklarını belirlemişlerdir. Bu organizmanın ekzopolisakarid ve ekstraselüler amilaz ürettiğini gözlemlemişlerdir. DNA'daki G+C oranını %43.5 mol olarak bulmuşlar. 16S rRNA gen dizi analizini, yağ asidi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçlarından bu türün yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu tespit etmişlerdir ve *Anoxybacillus amylolyticus* olarak adlandırmışlardır.

Poli ve ark. (2006)⁴¹ Pomigliano, Naples, İtaly'daki sıcak gübrelerden spor-formlu, gram-pozitif, aerobik, çubuk şeklinde termofilik bakteri izole etmişlerdir. DNA'da G+C oranını % 43.5 mol olarak bulmuşlardır. Üreme sıcaklığını 55-75 °C arasında bulmuşlardır. Fenotipi filogenetik, yağ asidi analizleri ve DNA-DNA

hibridizasyonu sonuçları bu türün *Geobacillus* cinsine ait yeni bir alt türü olduğunu ve *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* subsp. olarak adlandırılması öngörülmüştür.

Akhmaloka ve ark (2006)⁴² Papandayan Crater 'inde bulunan sıcak su kaynağından termofilik bakterilerin izolasyonunu yapmışlardır. Termofilik bakteriden kromozomal DNA izole etmişlerdir ve bu DNA'nın 16S rDNA gen fragmentini çoğaltmak için kullanmışlardır. Sonuçta 1.5 kb 16S rDNA fragmenti elde edilmişlerdir. 16S rRNA gen fragmentini klonlaması ve dizi analizini sonucunda bu bakterilerin filogenetik soyağacına bakmıştır ve *Bacillus caldolyticus* ve *Bacillus caldotenax*'a yakınlık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

DeFlaun ve ark. (2007)⁴³ Güney Afrika'da altın madeninden fakültatif termofilik bir izolat izole etmişlerdir ve GE-7 olarak adlandırmışlardır. GE-7'nin optimum büyüme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 65 °C ve 6.5 olarak tespit etmişlerdir. İzolatın karbon kaynağı olarak sellobioz, hidrokarbon ve laktatı kullandığını belirlemişlerdir. GE-7'nin çubuk şeklinde (uzunluğu 4-6 µm x genişliği 0.5 µm), sporlarının terminalde ve çamıya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. GE-7'nin 16S rDNA dizi analizi sonucunda % 99.6 oranında *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T'ya benzer olduğunu bulmuşlardır.

Derekova ve ark. (2007)⁴⁴ Bulgaristan'ın Rup basin bölgesindeki sıcak su kaplıcalarından gram-pozitif, spor formu, oldukça aerobik, termofilik üç yeni tür izole etmişlerdir. Optimal üreme sıcaklığı ve pH sırasıyla 55-58 °C ve 6.0-6.5 olarak tespit edilmiştir. R270^T olarak adlandırdıkları türün 16S rRNA, DNA-DNA

hibridizasyonu, yağ asidi profili bu türün *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğunu ve bu nedenle *Anoxybacillus rupiensis* sp. olarak adlandırmışlardır.

Rahman ve ark. (2007)⁹ Malezya'daki hurma yağı fabrikasından *Geobacillus* türünü izole etmişlerdir. İzole edilen türü T1^T olarak adlandırmışlardır. Türün gram pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testler, DNA-DNA hibridizasyonu sonucu bu türün yeni bir tür olduğunu bulmuşlar ve *Geobacillus zalihane* sp. olarak adlandırmışlardır.

Gul-Güven ve ark. (2008)¹⁹ Batman Taşlıdere kaplıcalarındaki çamur örneklerinden spor formu yeni termofilik KG8^T türünü izole etmişlerdir. Türün gram-pozitif, çubuk şeklinde, hareketli olduğunu bulmuşlardır. Türün 35-65 °C de (optimum 55 °C) ve pH 5.5- 9.5 (optimum pH 7.5) ürediğini belirlemişlerdir. Türün nişastayı kullanabildiği, %3' lük NaCl konsantrasyonuna toleranslı olduğu ve nitratı redükte edebildiğini tespit etmişlerdir. 16S rRNA dizi analizi türün *Anoxybacillus* cinsine ait olduğunu ortaya koymuştur. DNA-DNA hibridizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucu bu türün *Anoxybacillus kamchatkensis*' in yeni bir alt türü olduğunu ortaya koymuşlardır ve *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. olarak adlandırmışlardır.

Poli ve ark. (2009)¹⁸ İtalya termal sıcak su kaplıcalarından çamur örneklerinden yeni termofilik bakteriler üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu izolatların endospor oluşturan, gram-pozitif, hareketli, çubuk şeklinde (flamentöz oluşturan) bakteriler olduğunu ve bunlardan bir bakterinin 55-67 °C (optimum 65 °C)

ve pH 6-7,5 (optimum 7.2) aralığında ürediği tespit edilmiştir. Türün aerobik ve karbon kaynakları olarak maltoz, trehaloz ve sodyum asetatta ürediğini, DNA'daki G+C oranını ise %53.5 mol olarak belirlemişlerdir. 16S rRNA dizi analizleri türün %95-99 arasında *Anoxybacillus* cinsine benzerliği görülmüştür. Kemotaksonomik, fenotipik, 16S rRNA gen dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonucuna dayandırılarak bu türün *Anoxybacillus* cinsine ait olan yeni *Anoxybacillus thermarum* sp . olduğunu tespit etmişlerdir.

Adigüzel ve ark. (2009)²¹ Türkiye'deki değişik sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri izolasyonunu ve tanımlanmasını yapmışlardır. Fenotipik ve genotipik özelliklerinden yararlanılarak yağ asidi metil eser, rep-PCR profili ve 16S rRNA gen dizi analizine bakılmışlardır. Yapılan analizler sonucunda *Geobacillus*, *Anoxybacillus* and *Bacillus* spp. türlerinin tanımlanması ve taksonomik karakterizasyonu yapılmışlardır.

Coleri ve ark. (2009)⁴⁵ Türkiyenin değişik bölgelerinden 42 sıcak su kaplıcalarından 451 termofilik basil izole etmişlerdir. Yapılan 16S rDNA analizi sonucu beşinin *Geobacillus* cinsine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Savas ve ark. (2009)²³ Türkiye Van Erciş' de bulunan Hasanabdal sıcak su kaplıcasından izole ettikleri termofilik bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu yapmışlardır. 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda 6 izolatan *Geobacillus pallidus* türünün üyeleri olduklarını tespit etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Temel Mikrobiyoloji. Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/19.04.2010>.
2. Bilgehan, H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, Şafak Matbaacılık, ANKARA, **1993**.
3. Clarridge, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, **2004**,17, 840-862.
4. Brooks, G.F.;Butel, J.S.;Ornston,L.N. Medical Microbiology, Middle East Edition, USA 1991.
5. Benjamin, V.; Parsons, K. Essentials of Medical Microbiology, J.B. Lippincott Company, USA, 1991.
6. <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/viewFile/186/218> /05.05.2010
7. Marchant, R.; Banat, I. M. The Genus *Geobacillus* and Hydrocarbon Utilization, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 2010.
8. Sung, M H.; Kim, H.; Bae, J.W.; Rhee, S.K.; Jeon, C.O.; Kim, K.; Kim, J.J.; Hong, S.P.; Lee, S.G.; Yoon, J.H.; Park, Y.H.; Baek, D.H. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2002**, 52, 2251-2255.
9. Rahman, R.N.Z.R.A.; Leow, T.C.; Salleh, A.B.; Basri, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov. strain T1^T, a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, *BMC Microbiology*, **2007**, 7, 77.
10. Nazina, T. N.; Lebedeva, E.V.; Poltarau, A.B.; Tourova, T.P.; Grigoryan, A.A.; Sokolova, D.Sh.; Lysenko, A.M.; Osipov, G.A. *Geobacillus gargensis* sp.

nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2004**, 54, 2019-2024.

11. Nazina, T.N.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Novikova, E.V.; Grigoryan, A.A.; Ivanova, A.E.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Osipov, G.A.; Belyaev, S.S.; Ivanov, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2001**, 51, 433-446.

12. Rahman, T.J.; Marchant, R.; Banat, I.M. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments, Biochemical Society, **2004**, 32, 209-213.

13. Kuisiené, N.; Raugalas, J.; Citavicius, D. Identification of *Geobacillus stearothermophilus* by restriction digestion with *AluI* of the amplified 16S rDNA, BIOLOGIJA, **2007**, 53, 62-66.

14. Banat, I.M.; Marchant, R.; Rahman, T.J. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately

thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 2197-2201.

15. Kuisiene, N.; Raugalas, J.; Chitavichius, D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 1991-1995.

16. Beldüz, A. O.; Dulger, S.; Demirbag, Z. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2003**, 53, 1315-1320.

17. Dulger, S.; Demirbag, Z.; Beldüz, O. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 1499-1503.

18. Poli, A.; Romano, I.; Cordella, P.; Orlando, P.; Nicolaus, B.; Berrini, C.C. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy, *Extremophiles*, **2009**, 13, 867-874.

19. Gul-Güven, R.; Güven, K.; Poli, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman, *J. Gen Appl. Micbiobol*, **2008**, 54, 327-334.

20. Coşkun, A. *Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni Bacillus sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 4s, 2010.

21. Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. Life in extreme environments, *Nature*, **2001**, 409, 1092-1101.
22. Adigüzel, A.; Ozkan, H.; Baris, O.; Inan, K.; Gulluce, M.; Sahin, F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot spring in Turkey, *Journal of Microbiological Methods*, **2009**, 79, 321-328.
23. Savas, S.; Adigüzel, A.; Inan, K.; Ozkan, H.; Gulluce, M.; Sahin, F. Molecular characterization of thermophilic bacteria isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal hot spring, *Biotechnological Letters*, **2009**, 14, 4445-4454.
24. Andrade. C.M.M.C.; Jr.Pereira, N.; Antranikian, G. Extremely Thermophilic Microorganisms and Their Polymer-hydrolytic Enzymes. *Revista de Microbiologia*, **1999**, 30, 287-298.
25. Fukara, G.; *Bazı Estrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 6s, 2007.
26. Haki, G.D.; Rakshit, A.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology*, **2003**, 17-34.
27. Panikov, N.S.; Popova, N.A.; Dorofeev, A.G.; Nikolaev, Y.A.; Verkhovtseva, N.V. Growth of the Thermophilic Bacterium *Geobacillus uralicus* as a Function of Temperature and pH: An SCM-Based Kinetic Analysis, *Microbiology*, **2003**, 72, 277-284.
28. Satyanarayana, T.; Raghukumar, C.; Shivaji, S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives, *Current Science*, **2005**, 89, 78-87.
29. Arda, M. *Temel Mikrobiyoloji*, Medisan Yayın Serisi no 46, Ankara, 2000.

30. Üzümcü, Z. *Pseudomonas sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 19s, 2009.

31. Gül-Güven, R.; *Sıcak Su Kaplıcaından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve Alicyclobacillus acidocaldarius subsp.rittmanu'nun β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır 19-20s, 2007.

32. Beffa, T.; Blance, M.; Lyon. P.F.; Vogt, G.; Marchiani, M.; Lott-Fischer, J.; Aragno, M. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), *Applied and Environmental Microbiology*, **1996**, 62, 1723- 1727.

33. Studholme, D.J.; Jackson, R. A.; Leak, D.J. Phylogenetic analysis transformable strains of thermophilic *Bacillus* species, *FEMS Microbiology Letters*, **1999**, 172, 85-90.

34. Nicolaus, B.; Improta, R.; Manca, M.C.; Lama, L.; Esposito, E.; Gambacorta, A. *Alicyclobacilli* from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann, *Polar Biol*, **1998**, 19, 133-141.

35. Pikuta, E.; Lysenko, A.; Chuvilskaya, N.; Mendrock, U.; Hippe, H.; Suzina, N.; Nikitin, D.; Osipov, G.; Laurinavichius, K. *Anoxybacillus pushchinensis* gen.nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* com. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2000**, 50, 2109-2117.

36. Yumoto, I.; Hirota, K.; Kawahara, T.; Nodasaka, Y.; Okuyama, H.; Matsuyama, H.; Yokota, Y.; Nakajima K.; Hoshino, T. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately termophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka,

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2004**, 54, 1239-1242.

37. Schaffer, C.; Franck, W.L.; Scheberl, A.; Kosma, P.; McDermott, T.R.; Messner, P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2004**, 54, 2361-2368.

38. Romano, I.; Poli, A.; Lama, L.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *stromboliensis* subsp. nov., isolated from the geothermal volcanic environment, *J.Gen. Appl. Microbiol.*, **2005**, 51, 183-189.

39. Kevbrin, V.K.; Zengler, K.; Lysenko, A.M.; Wiegler, J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka, *Extremophiles*, **2005**, 9, 391-398.

40. Poli, A.; Esposito, E.; Lama, L.; Orlando, P.; Nicolaus, G.; Appolonia, F.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica), *Systematic and Applied Microbiology*, **2006**, 29, 300-307.

41. Poli, A.; Romano, I.; Caliendo, G.; Nicolaus, G.; Orlando, P.; Falco, A.; Lama, L.; Gambarcotta, A.; Nicolaus, B. *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost, *J. Gen. Appl. Microbiol*, **2006**, 52, 223-234.

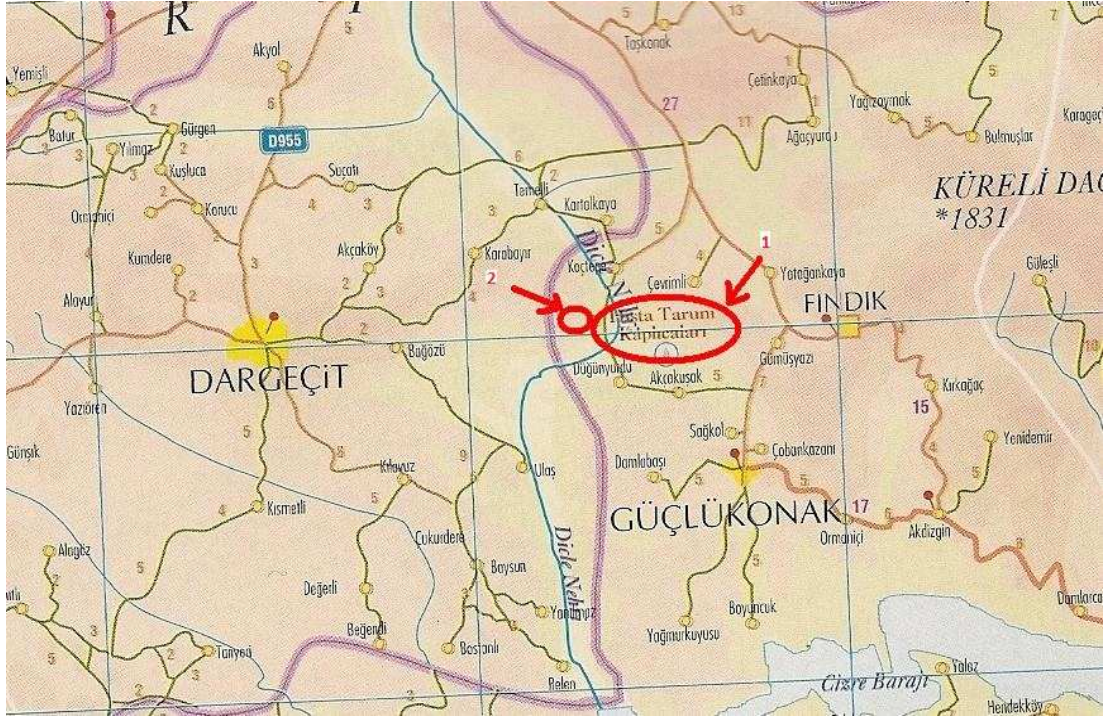
42. Akhmaloka, A.; Suharto, S.; Nurbaiti, I.N.; Tika & F.M. Warganegara. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater, *PROC. ITB Eng. Science*, **2006**, 38, 1-10.

43. DeFlaun, M.F.; Fredrickson, J.K.; Dongc,H.; Pfiffnerd,S.M.; Onstotte, T.C.; Balkwillf, D.L.; Stregerg, S.H.; Stackebrandth, E.; Knoesseni, S.; van Heerden, E. Isolation and characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* strain from an ultra-deep South African gold mine, *Systematic and Applied Microbiology*, **2007**, 30, 152–164.
44. Derekova, A.; Sjöholm, C.; Mandeva, R.; Kambourova, M. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria), *Extremophiles*, **2007**, 11, 577-583.
45. Coleri, A.; Cokmus, C.; Ozcan,B.; Akkoc, N.; Akcelik, M. Isolations of α -Glucosidase-Producing Thermophilic Bacilli from Hot Springs of Turkey, *Microbiology*,**2009**,78, 56-66.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada Dargeçit (Mardin) ve Güçlükonak (Şırnak) kaplıcalarından alınan su ve çamur örneklerinden izole edilen bakteriler kullanıldı (Şekil 3.1).¹



Şekil 3.1: Bakterilerin izole edildikleri sıcak su kaplıcaları

3.1.1. Bakterilerin İzole Edildikleri Sıcak Su Kaynakları ve Özellikleri

Hısta (Güçlükonak) Sıcak Su Kaynağı : Hısta Kaplıcası, Düğünyardu köyü içinde ve Şırnak ili, Güçlükonak ilçesine 10 km uzaklıkta olup, ortalama 250 m batısındaki Dicle nehri kıyısında yer almaktadır (Resim 3.1). Su sıcaklığı 60 °C, pH'sı 6.9'dir. Kaynağın suyu sülfat (% 64.54 mval), klorür (% 22.94 mval), kalsiyum (% 66.53 mval), magnezyum (% 23.08 milival) ve hidrojen sülfür (273.5 mg/l) içeren sular sınıfına girmektedir.²



Resim 3.1: Hısta sıcak su kaynağı

İlsu (germav) (Dargeçit) Kaplıcası : Kaynak, Mardin ili Dargeçit ilçesinin 15 km doğusunda Dicle nehrinin kenarında yer almaktadır (Resim 3.2). Su sıcaklığı 58 °C 'dır. Kaplıca kimyasal özellikleri yönünden incelendiğinde $SO_4^- > HCO_3^- > Cl^- > CO_3^-$ anyonlarına ve $Ca^{++} > Mg^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+$ katyonlarına sahip olduğu

anlaşılmıştır. Böylece su analiz sonuçlarına göre suyun kalsiyumlu, magnezyumlu, sülfatlı termal su sınıfına girdiği anlaşılmıştır.³



Resim 3.2: Iısu kaplıcası

3.2. Bakteri İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Üretimi

İlisu (Dargeçit) ve Hısta (Güçlükonak) kaplıcalarından su ve çamur örnekleri alınarak soğuk şartlarda muhafaza edildi. Laboratuvarda steril koşullarda su ve çamur örneklerinden alınarak steril su içeren tüplere aktarılarak 10^{-1} lik seyreltme elde edildi. Karışım vortex yardımı ile çalkalanarak homojen hale getirildi. Daha sonra benzer şekilde ard arda 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} lik şekilde seyreltmeler yapıldı. Farklı oranda seyreltilmiş homojen karışımlar 80 °C'de 10 dakika ısı işlemine tutuldu. Bu işlem de edospor oluşturan bakteriler canlıklarını korurken oluşturmayanlar ölmektedirler. Su ve çamur örneklerinden yapılan her seyreltme katı Nutrient Broth (NB) besiyerin ekim yapıldı ve 55 °C' de 24 saat inkübe edildi. Ayrıca su ve çamur örneklerinden 25 ml' lik Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerine ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 120 rpm'de 55 °C' de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden katı besiyerine ekim yapıldı. İnkübasyondan sonra petrielerde üreyen bakteri kolonilerinden tek koloni alınıp çizgi ekim yapılarak saf kültür elde edildi.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Steril kabin	(TELSTAR AV-100)
Otoklav	(Hirayama)
Etüv	(Heraus)
Çalkalamalı su banyosu	(Julabo)(Selecte P)
Spektrofotometre	(UV mini1240SHIMADZU)
Hassas terazi	(Gec Avery, 0.0001)
pH metre	(Mettler Toledo MP220)

Soğutmalı santrifüj	(Sigma Christ 2K 15)
Magnetik karıştırıcı	(Stuart Sciencitific)
Buzdolabı	(Arçelik)
İnkübatör	(Sanyo)
Vortex	(VWR INTERNATIONAL)
Santrifüj	(S E D)

3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimi

Sıvı besi yerinin bileşimi: NB; Nutrient Broth (merck) : 8 gr

Çeşme suyu : 1000 ml

LB; (Luria Broth :%1 pepton, %1 NaCl, %0.5 yeast extract)

Katı besiyerinin bileşimi: Nutrient Broth (merck) : 8 gr

Agar (merck) : 12-15 gr

Çeşme suyu : 1000 ml

3.5. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi

Bakterilerin optimum sıcaklığını belirlemek için 25 ml'lik Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerinde 25-70 °C sıcaklık aralığında bakteriler inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra spektrofotometrede 470 nm, 540 nm ve 660 nm'de değerler okunarak en iyi dalga boyu seçildi. Böylece en iyi 540 nm'de absorbanlar okundu.

Belirlenen optimum üreme sıcaklığında optimum pH değeri tespit edildi. Bunun için pH 5.0-11.5 aralığına sahip besiyerleri hazırlandı ve ekim yapılarak inkübe edildi. Bir günlük inkübasyondan sonra değerler spektrofotometrede okundu.

Bakterilerin uygun üreme zamanını tespit etmek için optimum üreme sıcaklığında ve optimum pH'da besiyeri hazırlanarak 3-72 saat aralığında 3 saatte bir örnek alınarak spektrofotometrede üreme oranlarına bakıldı.

3.6. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

3.6.1. Gram Boyama

Bakteriler katı besiyeri NB'de bir gecelik üretilip öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamın bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi yapıldı ve preparatlar havada kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparat kristal viyole çözeltisinde 2 dakika bekletildi ve daha sonra su ile yıkanarak boyanması sağlandı. Preparatlar 1 dakika lugol çözeltisinde bekletildikten sonra yıkandı ve kurutuldu. Deklorizasyonu sağlamak amacıyla % 96'lık alkolde 15-20 sn. bekletildi ve tekrar su ile yıkanıp kurutuldu. Son işlem olarak sulu fuksin ile 2 dakika bekletilerek boya giderilmesi sağlandı. Preparatlar kurutma kağıdında kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

Yapılan incelemeler sonucunda bakterilerin mavi veya mor renkte görünmesi gram pozitif, pembe renkte görünmesi durumunda ise gram negatif olarak değerlendirildi

3.6.2. Spor boyama

Bakteriler katı besiyeri NB'de bir gecelik üretilip öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamın bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi yapıldı ve preparatlar havada kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde

edilen preparatlara önce karbol fuksin ile 5 dakika ısıtılarak boyandı. Preparatlar yıkandıktan sonra %10'luk nitrik asitle 10 sn. muamele edildi ve su ile yıkandı. En sonda metilen mavisi ile 2 dakika boyanan preparatlar yıkanıp kurutularak immersiyon yağı damlatıldı ve mikroskopta immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

3.6.3. Hareket Testi

Bu test mikroorganizmaların hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemede kullanılır. Bunun için; % 0,4-0,5 berrak yarı katı agarlı besiyeri tüplerin içinde kapiler tüplerin bulunduğu besi ortamına döküldü. İzolatların gecelik taze kültürlerinden tek koloni iğne öze yardımıyla alınarak kapiler tüp içerisine daldırmak suretiyle ekim yapıldı ve her izolat için optimum sıcaklıkta 24 veya 48 saat inkübasyona bırakıldı. Eğer besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz kabul edildi, fakat inokülasyon hattından etrafa doğru agarın içine doğru bir yayılma gözlenmesi durumunda hareketli kabul edildi

Mikroorganizmalar besin gereksinimlerini karşılamak için hareket ederler ve dolayısıyla oksijen burada etkili oluyor üstte doğru çıktıklarında aerobik, alt kısımda kalmaları durumunda anerobik olarak tespit edilirler.⁴

3.6.4. Nişasta Hidrolizi Testi

Bu test, bir polisakkarid olan nişastanın bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstraselüler amilaz enzimi tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Bunun için petri kutularında %3'lük nişastalı agar

hazırlandı ve bir günlük katı besi yerlerinde üretilen bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ayrı ayrı ekim yapıldı. Her bakteri için optimum sıcaklıkta 1-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda agarların üzerine 0,5 g I₂ ve 1g KI (150 ml) ile hazırlanan çözelti döküldü ve reaksiyon 5 dakika içinde değerlendirildi. Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşur. Negatif durumlarda ise besiyeri mavi-mor renkte görülür.⁴

3.6.5. Katalaz Testi

Bu testin amacı mikroorganizmaların katalaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini saptamaktır. Bu test için katı olarak hazırlanan NB besiyerine taze haldeki katı bakteri kültüründen ekim yapıldı. Bir gün inkübatürde tutuldu. Daha sonra taze olarak hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit yavaş yavaş ilave edildi ve değerlendirildi.

Hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıklar veya gaz çıkışının görülmesi durumunda katalaz enziminin sentezlendiği yani pozitif olarak değerlendirildi.⁴

3.6.6. Lipaz Testi

Bu test, bakterilerin yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanıldı. Bunun için; 0,75 gr beef extrac, 1,25 gr pepton, 3,79 gr agar ve 2,5 gr tereyağı içeren besiyeri (250 ml) hazırlanıp otoklavlandıktan sonra her bir bakteri için taze kültüründen ayrı ayrı ekim yapıldı ve optimum sıcaklıkta 1 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün oluşan

kolonilerin bulunduğu petri kutusuna aşırı doygun CuSO_4 çözeltisi damlatıldı. Mat yeşilimsi bir sahanın oluşması lipaz üretimi olarak değerlendirildi.⁴

3.6.7. Kazein Hidrolizi Testi

Bunun için; içinde %10 skim milk bulunan besi yeri hazırlandı ve 110 °C'de 5 dakika steril edildi. Taze kültürden ekim yapılarak bir gün süreyle optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kolonilerin üzerlerine %1'lik HCl damlatılarak bakterilerin süt proteinini oluşturan kazeini proteaz enzimi aracılığı ile hidrolizleyip hidrolizlemediklerine bakıldı. Şeffaf zonların oluşumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi.⁴

3.6.8. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test mikroorganizmaların, jelatini hidrolizleyen jelatinaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini ölçmek için yapılır. Bunun için %12 jelatin içeren besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Her bakteri için 9 ml jelatinli besiyeri ve 1 ml taze kültürden ekim yapıldı. Tüpler optimum sıcaklıkta 1-3 gün inkübatürde tutuldu. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabında 1-2 saat bekletilerek katı olan tüpler negatif, eriyen pozitif olarak değerlendirildi.⁵

3.6.9. Üreaz Testi

Bu test için üre agarlı besi yeri içeren tüplerde yatık bir şekilde hazırlandı. Taze kültüre edilmiş bakterilerden besi yerine ekim yapılarak 2-5 gün boyunca bakteriler optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi. Bu testin amacı mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz

enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek, bakterilerin cins ve tür tayininde kullanılır.⁴

3.6.10. İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda bakterilerin cins ve türlerin ayırımında kullanılıyor. Bunun için; içinde 10g/L / tripton ve 5g/L NaCl bulunan sıvı besiyeri 9 ml olacak şekilde tüplerde hazırlandı. Bir günlük taze ve saf bakteri kültüründen 1 ml ekim yapıldı ve optimum sıcaklıkta 1-5 gün inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürlerin üzerine Kovaks ayırıcından bir iki damla damlatıldı.. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon, sarımsı halkanın oluşması indolün oluşmadığı gösterdi.⁴

3.6.11. Fosfataz Testi

Bu test, bakterilerin sentezledikleri fosfataz enzimini belirlemek amacıyla yapılır. İçinde, % 0.5 fenolftalein disfofat bulunan sıvı besi yeri tüplerde hazırlandı. Bir tüp kontrol olmak üzere diğer tüplere taze bakteri kültüründen ekim yapıldı. Optimum sıcaklıkta 1-2 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüplerin üzerine % 40 NaOH damlatıldı. Tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi.⁴

3.6.12. Lizozim Duyarlılığı

Her bakteri ve bir tane kontrol için 20 ml sıvı NB besiyeri saf su ile hazırlandı ve otoklavlandı. Hazırlanan steril her bir besiyerinin içine 20 µm çapındaki steril filtreden (Merck) geçirilmiş 20µl (% 0.001) lizozim konuldu. 1 ml inokulum bakteri

kültüründen besiyerine ekim yapıldı ve bir gün inkübe edildi. Sonuçlar 540 nm'de spektrofotometrede okunarak kontrolle karşılaştırıldı.⁵

3.6.13. Sodyum Azid Duyarlılığı

Her bakteri ve kontrol için 20 ml %0,02 sodyum azid içeren sıvı besiyeri saf su ile hazırlanıp steril edildi. 1 ml inokulum bakteri kültüründen ekim yapıldı ve çalkamalı su banyosunda 1-2 gün inkübe edildi. Sonuçlar 540 nm'de spektrofotometrede okunarak kontrolle karşılaştırıldı.⁵

3.6.14. NaCl Toleransı

Her bakteri ve kontrol için 20 ml NB sıvı besiyeri saf su ile hazırlanıp % 0.5, %1, %2, %3, %5 miktarlarında NaCl eklendi. Ayrıca çeşme suyu ile her bakteri için NB sıvı besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerinin içine 1 ml inokulum ekim yapıldı ve bir gün inkübe edildi. Bu süre sonunda değerler 540 nm'de spektrofotometrede okunarak kontrol ve çeşme suyunda üretilen örneklerle karşılaştırıldı.

3.7. Karbon Kaynağı Kullanımı

İzole edilen bakterilerin hangi karbon kaynağını kullandığını bulmak için bakterilerin üremelerinin minimum olduğu besi yerleri belirlenerek hazırlandı ve % 1 oranında Tablo 3.1.'de gösterilen karbon kaynakları ilave edildi.

Bakterilerin karbon kaynaklarını kullanma özelliklerini tespit etmek için kullanılan minimal besiyerleri; 10 kat seyreltilmiş NB (8 gr /lt Nutrient Broth (merck), 5gr/lt NaCl) ve LB (Luria Broth = %1 pepton, %1 NaCl, %0.5 yeast extract).

Monosakkarid	Disakarid	Diğer
Glikoz	Sakaroz(sükroz)	Sodyum sitrat
Galaktoz	Maltoz	
Fruktoz	Laktoz	
Gliserol		

Tablo 3.1: Kullanılan Karbon Kaynakları

Minimal besiyeri hazırlandı. Önce her karbon kaynağının besiyerinin pH'sını değiştirip değiştirmediğine bakıldı. Her karbon kaynağı ve kontrol için 9 ml minimal besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Her şekerden 100 mg (0.1g) veya 100µl (sıvılar için) tartılıp 1-2 saat U.V altında tutulup steril edildi. Hazırlanmış olan besiyerlerine seril şartlarda steril edilen şekerler besiyerlerine aktarıldı. Önceden öninkübasyona bırakılan bakterilerden 1 ml alınarak hazırlanan besiyerlerine ekim yapıldı. 1-3 gün inkübatörde tutuldu. Spektrofotometrede 540 nm'de absorbans değerleri okundu. Okunan değerler kontrolle değerlendirilerek uygun değerler için bir diğer aşamaya geçildi. Diğer aşamada her bir erlenden 2 ml alınıp önceden hazırlanmış 8 ml'lik besiyerlerine transfer edildi ve bir gün sonra 540 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okundu.

3.8. Lipit Analizi

Lipit analizinde sadece 3 izolatin (GE, GE2, AH1) analizleri yapıldı. Bunun için 3 litre LB (Luria Broth = %1 pepton, %1 NaCl, %0.5 yeast extract) besiyeri hazırlandı. İnokulum kültürden ekim yapıldı ve bir gün inkübatörde tutuldu. Bir gün sonunda üretilen bakteri kültürleri 50 ml' lik falkon tüplerinde 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Peletler üzerinde 1 ml kalacak şekilde üst sıvısı döküldü ve bu peletler bir tüpte toplandı. Bu tüpte bulunan peletler 3 defa steril saf su ile 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Peletler en sonunda darası alınmış bir tüpte toplandı ve ağırlıkları ölçüldü (Tablo.3.2). Yaş bakteriler 65 °C 'de kurutuldu.⁵

Tablo.3.2: Lipit Analizinde Kullanılan Besiyeri ve Bakteri Miktarları

İzolatlar	Besiyeri (ml)	Yaş Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)
GE1	3000	5,517	0,918
GE2	3000	3,661	0,669
AH1	3000	12,314	1,463

Kurutulan bakteri numuneleri lipit analizi için Napoli (Italy)' deki Biyomoleküler Kimya Enstitüsü (Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB))'ne gönderildi. Orada yapılan çalışmalara göre numuneler 65/25/4 oranlarında CHCl₃ (triklor metan)/CH₃OH (metanol)/H₂O ilave edildikten sonra 24 saat karıştırıcı üzerinde tutulmuştur. Süpernatant kısmı filtre edildikten sonra rotavapordan geçirilerek azot gazı (N₂) altında kurutulduktan sonra numunelere 1ml tampon eklenmiştir. Numuneler ve standartlar (*Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* *Geobacillus toebii*) TLC'ye (Thin Layer Chromataghy) uygulanmıştır.

Örnekler solventte ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4)) yürütüldükten sonra TLC'ler bakterilerin fosfolipitleri için Dittmer ve Lester solüsyonu, glikolipitleri için alfa-naftalin, aminolipitleri için ninhidrin solüsyonu ve ayrıca gliko-fosfo-aminolipitleri için $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ile muamele edilerek bakterilerin lipit profilleri bakımından *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* ve *Geobacillus toebii* ile olan benzerlikleri analiz edilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler:

Dittmer ve Lester

Çözelti A: 1litre H_2SO_4 (25 N %70 v/v) 'e 40.11 g MoO_3 ilave edilir ve MoO_3 bitinceye kadar kaynatılır.

Çözelti B: 500 ml çözelti A'ya 1.78g Mo ilave edilir ve 15 dak. kaynatılır. Soğuyan karışımdan 50 ml ve çözelti A'dan 50 ml alınıp üzerine 200 ml distile su ilave edilerek hazırlanır.

α - Naftalin

α - Naftalin: 2.2 g

Etil alkol: 10.5 ml 'de çözündürülür ve buna

H_2SO_4 : 6.5 ml

Etil alkol:40.5 ml

Destile su: 4.0 ml

α - Naftalin 10.5 ml etil alkol de çözündürülür ve bu karışım H_2SO_4 , etil alkol ve su karıştırılır.

Ninhidrin:

Ninhidrin: 0.2 g

Etil alkol 100 ml.

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$

120 ml H_2SO_4 destile su ile 1000 ml ye tamamlanarak hazırlanır.

3.9. 16S rRNA Gen Dizi Analizi

16S ribozomal RNA dizi analizi için bakteriler Ref-Gen (Teknokent ODTÜ/Ankara) firmasına gönderildi. Bakteriler sırası ile şu aşamaldan geçirilerek analiz

edildi. 16S ribozomal RNA genin yaklaşık 1000 baz çiftlik dizi analizi yapıldı. DNA izolasyonu gerçekleştirilerek, 16S rDNA'nın PCR ile çoğaltılması ve iki yönlü DNA dizi analizi yapılarak MicroSeq ID yazılımı ile analiz ve tanımlama yapılarak filogenetik ağaç belirlendi.

DNA izolasyonu⁶:

1. Besiyerinde bir gece üretildikten sonra elde edilen bakteri kültürü santrifüj ile çöktürülür.
2. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çökelti TE (Tris- EDTA, pH 8.0) tamponu içerisinde çözündürülür.
3. Hücre duvarı lizozim (murimidaz) enzimi ile zayıflatılır.
4. SDS eklenerek hücre parçalanır.
5. 0.15 M NaCl çözeltisi eklenerek DNA çift zincirinin birlikte kalması sağlanır.
6. Proteinlerin parçalanması için üzerine Kloroform/ izoamil alkol eklenir ve karıştırılır. Daha sonra santrifüj edilir.
7. Üst faz dikkatli biçimde temiz bir santrifüj tüpüne alınır ve üzerine etanol /izopropanol eklenir. DNA çökünceye kadar karıştırılır.
8. Bu aşamada tüp alt üst edilerek yavaş şekilde karıştırılırken DNA'nın iplikçikler şeklinde çökeldiği gözle görülebilir.
9. DNA santrifüj edilerek çöktürülür.

KAYNAKLAR

1. Yaman, Yücel., Köy Köy Türkiye Yol Atlası, Map Medya Basın Yayın, Pazarlama ve Danışmanlık Ltd., İstanbul, 2004, 177s.
2. Özel, N., Gap'ta Yer Alan Jeotermal Kaynaklara Genel Bakış ve Güçlükönak (Şırnak) Milçesi Hısta Kaplıcaları, T.C. Başbakanlık GAP Bölge Kalkınma İdaresi Bölge Müdürlüğü, Şanlıurfa.
3. Türkiye Termal ve Mineralli Sular Envanteri Mardin (47), Ankara, 2000.
4. Temel Mikrobiyolojik Analizler Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/22.03.2010>.
5. Gül-Güven, R.; *Sıcak Su Kaplıcalarıdan Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmanu'nun β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır 49s,54-57s, 2007.
6. Temizkan, G.; Arda, N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008, 58s.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Bakteri İzolasyonu

Dargeçit ilçesindeki Ilısu kaplıcasından alınan su ve çamur örneklerinden iki tane izolat izole edildi. İzole edilen izolatlar AH1 ve AH2 olarak adlandırıldı. Güçlükonak ilçesinde bulunan Hısta sıcak su kaynağından da iki tane izolat izole edildi ve bunlarda GE1 ve GE2 olarak adlandırıldı.

4.1.2. Morfolojik Özelliklerin Tespiti

Hısta sıcak su kaynağından izole edilen GE1'in gram-pozitif, spor oluşturan, aerobik, hareketli ve hücreleri genellikle ikili çubuk halinde bulunmaktadır. GE2'nin de hücreleri tekli halde bulunmaktadır, gram-pozitif, aerobik, hareketli ve spor oluşturmaktadır (Resim 4.1,4.2).

Ilısu kaplıcasından izole edilen AH1 ve AH2'nin hücreleri genellikle ikili halde, düzgün kenarlı, çubuk şeklinde, gram-pozitif, hareketli ve sporları uç kısımda görüldü (Resim. 4.3,4.4, 4.5, 4.6).

İzole edilen tüm izolatların (GE1, GE2, AH1 ve AH2) hareketli aerobik basiller oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

4.1.3. Optimum Üreme Şartlarının Tespiti

İzole edilen bakterilerin optimum üreme yeteneklerini tespit etmek için spektrofotometrede 470 nm, 450 nm 660 nm'de değerler denenerek en iyi 540 nm'de değerler tespit edildi. GE1'in üreme sıcaklık aralığı 30-65 °C, optimum üreme sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi (Şekil 4.2). GE2'nin üreme sıcaklık aralığı 35-65 °C,

optimum üreme sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi (Şekil 4.3). AH1'in üreme sıcaklık aralığı 30-65 °C, optimum üreme sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi (Şekil 4.4). AH2'nin üreme sıcaklık aralığı ise 30-65, optimum üreme sıcaklığı 65 °C olarak belirlendi (Şekil 4.5). Böylece bu izolatların termofilik bakteriler olduğu anlaşılmaktadır.

GE1'in pH üreme aralığı 5.5-10, optimum pH 9.0 olarak belirlendi (Şekil 4.6). GE2'nin pH üreme aralığı 6.5-10, optimum pH 9.5 olarak belirlendi (Şekil 4.7). AH1'in pH üreme aralığı 5.5-10, optimum pH 7.5 olarak belirlendi (Şekil 4.8). AH2'nin pH üreme aralığı 6.0-11, optimum pH'sı 7.5 olarak belirlendi (Şekil 4.9).

Optimum üreme sıcaklığı ve pH belirlendikten sonra bakterilerin uygun üreme zamanını tespit etmek için optimum üreme sıcaklığında ve optimum pH'da bakteriler inkübe edildi. GE1'in Şekil 4.10'da görülenbüyüme grafiğinde bakteri üremesi 15. Saatte en yüksek değerde olduğu görülmektedir. Daha sonraki saatlerde ise sabit kalmıştır. GE2'nin ise 12. Saat bakteri üremesinin en yüksek olduğu süre olarak belirlendi. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi sonraki saatlerde hızlı bir düşüş görülmektedir. AH1'in büyüme grafiği Şekil 4.12'de görülmektedir. En yüksek oran 24. saat olarak tespit edildi ve sonraki saatlerde sabit kalmıştır. AH2'nin üremesinin en yüksek değeri 15. saatte tespit edildi. Daha sonraki saatlerde sabit kalmakta ve belirli bir süreden sonra azalmaktadır (Şekil 4.13).

4.1.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

4.1.4.1. Nişasta Hidrolizi Testi

Bakterilerin nişastayı sentezlenen amilaz enzimi tarafından parçalayıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Nişastalı besi yerine yapılan

ekimden sonra üzerine dökülen iyodür çözeltisini sayesinde besiyerinin üzeri koyu menekşe rengine boyandı ve kolonilerin etrafında açık renkli zonlar oluştuğu gözlemlendi. GE1, AH1, AH2'nin nişasta hidrolizi güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği ancak GE2'nin pozitif reaksiyon gösterdiği anlaşıldı (Şekil 4.14).

4.1.4.2. Katalaz Testi

Bu testte bakterilerin katalaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini bulmak için yapıldı. % 3'lük H₂O₂ 'in besiyerindeki kolonilerin üzerine damlatılmasından sonra hava kabarcıklarının veya gaz çıkışının olması katalaz enziminin sentezlendiği gösterdi. GE1, AH1 ve AH2'nin pozitif, GE2'in ise güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.15).

4.1.4.3. Lipaz Testi

İzole edilen GE1, GE2, AH1 ve AH2 bakterilerinin yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini anlamak için yapıldı. Üretilen bakterilerin üzerine CuSO₄ çözeltisi damlatıldıktan sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde yeşilimsi bir saha görüldü. Böylece bakteriler lipaz enzimi sentezleyerek kolonilerinin etrafında yeşilimsi sahalar oluşturdular. GE1 ve AH2 pozitif, GE2 negatif ve AH1 ise güçlü pozitif reaksiyon göstermektedir (Şekil 4.16).

4.1.4.4. Kazein Hidrolizi Testi

GE1, GE2, AH1 ve AH2 'nin süt proteinini oluşturan kazeinin proteaz enzimi aracılığı ile hidrolizleyip hidrolizlemediklerini anlamak için yapıldı.

Damlatılan %1'lik HCl ile kolonilerin etrafında şeffaf zonlar oluştu. GE1 negatif, GE2, AH1 ve AH2 'nin ise pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

4.1.4.5. Jelatin Hidrolizasyon Testi

GE1, GE2, AH1 ve AH2 bakterileri tarafından sentezlenen jelatini hidrolizleyen jelatinaz enziminin sentezlenip sentezlemediklerini anlamak için yapıldı. Jelatinli besiyerinde üretilen bakterilerin jelatinaz enzimini sentezlemeleri durumunda 1-2 saat buzdolabındaki bırakılma süresinden sonra besi yerindeki jelatini parçalamaları pozitif reaksiyon gösterir. Böylece GE1, GE2, AH1 ve AH2' nin jelatin hidrolizasyon testi negatif gözlemlendi (Şekil 4.17).

4.1.4.6. Üreaz Testi

GE1, GE2, AH1 ve AH2 bakterilerinin üreaz enzimini tayin etmek için yapıldı. Yatık agar besiyerinde renk değişimine bakıldı. Bu durumda GE1 ve GE2 bakterileri pozitif reaksiyon gösterirken AH1 ve AH2 bakterileri negatif reaksiyon göstermektedir (Şekil 4.18).

4.1.4.7. İndol Testi

GE1, GE2, AH1 ve AH2 bakterilerinin bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneklerini belirlemek için kullanıldı. Böylece inkübe edilen tüplerin üzerine Kovaks ayırıcı damlatıldı ve Şekil 4.19'da görüldüğü gibi tüplerin üst kısmında kırmızı halka oluşmadı. Bu nedenle GE1, GE2, AH1 ve AH2 'nin negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

4.1.4.8. Fosfataz Testi

GE1, GE2, AH1 ve AH2'in sentezledikleri fosfataz enzimini belirlemek amacıyla yapıldı. Bunun için tüpteki kolonilerin üzerine % 40 NaOH damlatıldı ve kırmızı rengin oluştuğu gözlemlendi. Böylelikle GE1, GE2, AH1 ve AH2'nin pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

4.1.4.9. Lizozim Duyarlılığı

Bakterilerin % 0.001 lizozim konsantrasyonuna tabi tutulması ile bir gün sonunda spektrofotometrede okunan absorbans değerlerinin kontrol ile karşılaştırılması sonucunda GE1 ve GE2'nin negatif reaksiyon gösterdiği, AH1'in pozitif reaksiyon ve AH2'nin ise zayıf reaksiyon gösterdiği belirlendi (Tablo 4.1).

4.1.4.10. Sodyum Azid Duyarlılığı

Bakterilerin % 0,02 sodyum azid duyarlılığını tespit etmek için bir günlük inkübasyon süresinden sonra GE1'in ve GE2'nin negatif özellik, AH1 ve AH2'nin ise pozitif özellik gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.2).

4.1.4.11. NaCl Toleransı

GE1, GE2, AH1 ve AH2'in farklı NaCl konsantrasyonlarında bir günlük inkübasyon süresinden sonra kontrollerle karşılaştırılması ile değerlendirildi. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi GE1 ve GE2 %1, AH1 ve AH2'nin ise %2 oranındaki NaCl konsantrasyonlarına toleranslı oldukları belirlendi.

4.1.4.12. Karbon Kaynağı Kullanımı

İki ayrı deney sonucunda okunan OD (absorbans) değerlerinin ortalaması ile karbon kaynakları değerlendirildi. GE1'in galaktoz, sakkaroz, maltoz ve laktozu karbon kaynağı olarak kullandığı; glikoz, fruktoz ve gliserolü de zayıf bir şekilde kullandığı anlaşıldı (Tablo 4.4). GE2'nin maltozu karbon kaynağı olarak kullandığı, glikoz ve sakkaroz da zayıf olarak kullandığı tespit edildi (Tablo 4.5). AH1'in galaktoz ve gliserolü zayıf olarak kullandığı tespit edildi (Tablo 4.6). AH2'nin sakkaroz, laktoz ve gliserolü zayıf bir şekilde karbon kaynağı olarak kullandığı tespit edildi (Tablo 4.7).

4.1.5. Lipit Analizi Sonuçları

Lipit analizleri *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* ve *Geobacillus toebii* standartları ile yapılan karşılaştırmalarda izolatların (GE1, GE2, AH1) fosfolipitleri, glikolipitleri ve aminolipitlerinin *Geobacillus* standartlarına benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir (şekil 4.20- şekil 4.23).

4.1.4.6. Bakterilerin 16S rRNA Gen Dizi Analizi ve Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi

Ref-Gen (Teknokent ODTÜ/Ankara) firmasına gönderilen analizler sonucunda GE1'in 16S rRNA'sına ait 1000, GE2'e ait 680, AH1'e ait 1130 ve AH2'e ait 1120 nükleotit dizisi belirlendi (Tablo 4.8-4.11). Belirlenen nükleotit diziler gen bankasındaki mevcut olan diğer türlerle karşılaştırılarak filogenetik durumları belirlendi (şekil 4.24-4.27).

4.2. TARTIŞMA

Sıcak su kaplıcalarındaki mikroflorayla ilgili son yıllarda bir çok çalışma yapılmıştır. Sıcak su kaplıcalarının araştırılması ekstrem sıcaklıklarda yaşayan mikrobiyal ekosistemlerin tespit edilmesini sağlamaktadır.¹

Son zamanlarda araştırmacılar termofilik bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü bu mikroorganizmalar endüstriyel uygulamalar için temel bilimlere bir çok avantaj sağlamaktadır. Termofilik mikroorganizmalar termostabil enzimler için kaynak olarak kullanılabilir. Termostabil enzimlerin kullanımı biyoteknolojik süreçlerin daha ucuza mal olmasını sağlamaktadır.²

Bu çalışmada, Mardin ili Dargeçit ilçesinde bulunan Iısu kaplıcası ile Şırnak ili Güçlükonak ilçesinde bulunan Hısta sıcak su kaynağından su ve çamur örnekleri alınarak biyoteknolojik açıdan önemli termofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması amaçlanmıştır. Dargeçit kaplıcasından iki ve Güçlükonak sıcak su kaynağından da iki tane en iyi üreme özelliği gösteren izolatlar izole edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipid ve 16S rRNA gen dizi analizleri yapılarak bakteri tanımlanma çalışması yapılmıştır.

Hısta (Güçlükonak) sıcak su kaynağından izole edilen, GE1 ve GE2 olarak adlandırılan izolatların çubuk şekilli, gram-pozitif, spor oluşturan, areobik, hareketli olduğu bulunmaktadır. GE1'in hücreleri genellikle ikili halde GE2'nin ise tekli halde bulunmaktadır. GE1 ve GE2'nin sırası ile 15. ve 12. saatlerde üremeleri görüldü. Üreme sıcaklık aralığı GE1 için 30-65 °C (optimum 60°C), GE2 içinde 35-65 °C (optimum 60°C) olarak bulundu. Optimum üreme pH'sı GE1'in 9.0, GE2'nin 9.5 olarak bulundu. Bu izolatların termofil özellikte bakteriler olduğu anlaşılmaktadır. %1'lik NaCl'e tolerans gösterdikleri saptandı. GE1'in karbon kaynağı olarak

galaktoz, sakkaroz, maltoz ve laktozu kullandığı; glikoz, fruktoz ve gliserolü de zayıf bir şekilde kullandığı saptandı. GE2'nin maltozu karbon kaynağı olarak kullandığı, glikoz ve sakkaroz da zayıf olarak kullandığı tespit edildi.

Tablo 4.2.1: GE1 ve GE2'nin Fenotipik Özelliklerinin Diğer *Geobacillus* Türleri ile Karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5	6	7
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Gram Özelliği	+	+	+	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	ND
Büyüme Sıcaklığı (°C)	30-65	35-65	45-65	45-70	45-70		50-70
Optimum büyüme sıcaklığı (°C)	60	60		60	60-65	55	
Büyüme pH'sı	5.5-10.0	6.5-10.0	6.2-7.8	6.0-9.0	5.5-8.5		5-9
Optimum büyüme pH'sı	9.0	9.5		7.5		7	
Nişasta Hidrolizi	+	+	+	-	+	w	ND
Katalaz	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
Kazein Hidrolizi	-	+	+	+	+	-	-
Jelatin Hidrolizi	-	-	+	-	+	-	-
İndol	-	-	ND	ND	ND	-	ND
Üreaz	+	+	ND	ND	-	-	ND
% 0.001 Lizozim duyarlılığı	-	-	ND	ND	ND	-	-
% 1 NaCl' de gelişme	+	+	+	+	+	+	ND
Glikoz kullanımı	w	w	ND	ND	ND	+	ND
Galaktoz kullanımı	+	-	+	-	+	+	+
Laktoz kullanımı	+	-	-	-	-	w	+
Fruktoz kullanımı	w	-	ND	ND	ND	+	ND
Maltoz kullanımı	+	+	ND	ND	ND	+	ND
Gliserol kullanımı	w	-	+	-	+	ND	ND

1, GE1 izolatı; 2, GE2 izolatı; 3, *Geobacillus uzensis* U^T (Nazina, ve ark. 2001)³; 4, *Geobacillus toebii* (Sung ve ark. 2002)⁴; 5, *Geobacillus gargensis* (Nazina ve ark. 2004)⁵; 6, *Geobacillus tepidamans* (Schaffer ve ark. 2004)⁶; 7, *Geobacillus zalihane* (Rahman ve ark. 2007)⁷

+: pozitif özellik gösterme, - : negatif özellik gösterme, w: zayıf özellik gösterme,

ND: test edilmemiş.

Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi GE1 ve GE2'nin değişik bir çok çalışmada tanımlanmış olan *Geobacillus* türlerine morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler bakımından benzer özellik göstermektedir (Tablo 4.2.1). Ancak GE1 ve GE2'nin optimum pH'sı 9.0, 9.5 olduğu için bu bakterilerin alkalifilik olarak tanımlanabilir. Pikuta ve ark.⁸ anaerobik, alkalifilik, ılımlı, fermentatif, spor oluşturan yeni bir termofilik bakteriyi gübre örneklerinden izole etmişlerdir ve optimum pH'sını 9.5-9.7 olarak bulmuşlardır. Ayrıca GE1 ve GE2'nin farklı karbon kaynaklarını kullandıkları için iki türün birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

GE1'in 16S rRNA gen dizisinin veri tabanındaki diğer türlerle karşılaştırılması sonucu bu türün filogenetik ağacı belirlendi. Bu türün filogenetik ağaçtaki tanımlanmış *Geobacillus* cinsine ait türle yakınlık gösterdiği, *Geobacillus* cinsinin yeni bir türü olabileceği düşünülmektedir.

GE2'nin 16S rRNA gen dizi analizi sonuçları diğer türlerle karşılaştırıldığında *Geobacillus kaue*'a yakınlık gösterdiği görülmektedir.

Kuisiene ve ark.⁹ Lithuania'da yüksek sıcaklıktaki petrol rezervlerinden izole edilen spor formlu, aerobik, proteolitik, termofilik N-3^T türünün izolasyonunu yapmışlardır. 16S rRNA gen dizi analizi yapılmış. Bu sonuçlara göre *Geobacillus thermoleovorans* türüne benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Savas ve ark.¹⁰ Türkiye Van Erciş' de bulunan Hasanabdal sıcak su kaplıcasından izole ettikleri termofilik bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu yapmışlardır. 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda 6 türün *Geobacillus pallidus* olduğunu tespit etmişlerdir.

Rahman ve ark.⁷ Malezya'daki hurma yağı fabrikasından *Geobacillus* türünü izole etmişlerdir. İzole edilen türü T1^T olarak adlandırmışlardır. Türün gram pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda bu türün yeni bir *Geobacillus* tür olduğunu bulmuşlardır.

DeFlaun ve ark.¹¹ Güney Afrika'da altın madeninden fakültatif termofilik bir izolat izole etmişlerdir ve GE-7 olarak adlandırmışlardır. GE-7'nin optimum büyüme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 65 °C ve 6.5 olarak tespit etmişlerdir. GE-7'nin çubuk şeklinde, sporlarının terminalde ve çamıya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. GE-7'nin 16S rDNA gen dizi analizi sonucunda % 99.6 oranında *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T'ya benzer olduğunu bulmuşlardır.

Schaffer ve ark.⁶ Lomer Austria'da Leopoldsdorf şeker pancarı fabrikasından ılımlı termofilik, gram-pozitif, spor formlu iki bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizleri sonuçları bu türlerin % 89.9 mol birbirlerine benzerlik gösterdiklerini bulmuşlardır. Optimum sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 55 °C ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda bu izolatların *Geobacillus* cinsine ait olduklarını bulmuşlardır.

Ilısu (Dargeçit) kaplıcasından izole edilen, AH1 ve AH2 olarak adlandırılan izolatlar çubuk şekilli, gram-pozitif, endospor oluşturan, aerobik, hareketli bakterilerdir. Hücreleri genellikle ikili halde bulunmaktadır. AH1 ve AH2'nin büyüme grafiği incelendiğinde, gelişmeleri sırasıyla 24. saat ve 15. saat olduğu saptandı. AH1'in üreme sıcaklık aralığı 30-65 °C (optimumu 60 °C) olarak bulundu. AH2'nin üreme sıcaklık aralığı ise 30-65 (optimum 65 °C) olarak bulundu. AH1'in pH üreme aralığı 5.5-10.0 (optimum 7.5) bulundu. AH2'nin pH üreme aralığı 6.0-

11.0 (optimum 7.5) olarak bulundu. Böylece bu izolatların termofilik karakterde bakteriler olduğu anlaşılmaktadır. İzolatların nişasta hidrolizi, katalaz, kazein, lipaz ve fosfataz testleri pozitif olarak tespit edildi. Her iki izolatın da % 0.001 lizozim duyarlılığı ve % 0.02 sodyum azid duyarlılığı pozitif görüldü. Ayrıca izolatların % 2'lik NaCl'e toleranslı oldukları görüldü. AH1'in karbon kaynağı olarak galaktoz ve gliserolü zayıf olarak kullandığı tespit edildi. AH2'nin ise sakkaroz, laktoz ve gliserolü zayıf bir şekilde kullandığı tespit edildi.

Bu izolatlar Tablo 4.2.2'deki *Anoxybacillus* türleri ile karşılaştırıldığında morfolofik, fiziksel ve biyokimyasal özellikler yönünden bir çok benzerlik göstermektedir.

AH1 ve AH2 kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman bir çok özellik bakımından benzerlik göstermektedir. Ancak ikisinin de farklı pH aralıklarında üredikleri, farklı optimum sıcaklıklarda üredikleri ve farklı karbon kaynaklarını kullandıkları tespit edilmiştir (Tablo 4.2.2). AH1'in üreme pH aralığı 5.5-10.0, AH2'nin ise 6.0-11.0'dir. AH1'in optimum sıcaklığı 60 °C, AH2'nin ise 65 °C'dir. Karbon kaynağı olarak AH1 galaktoz ve gliserolü zayıf bir şekilde, AH2 ise sükkroz, laktoz ve gliserolü kullanmaktadır.

AH1 ve AH2'nin 16S rRNA gen dizi analizi EMBL veri tabanındaki mevcut türlerle karşılaştırıldığında *Anoxybacillus* cinsine benzediği ve *Anoxybacillus flavithermus*'a % 99 oranında yakınlık gösterdiği görülmüştür.

Pikuta ve ark.⁸ anaerobik, alkalifilik, ılımlı, fermentatif, spor oluşturan yeni bir termofilik bakteriyi gübre örneklerinden izole etmişlerdir. İzolatın gram pozitif, düz, hareketsiz, çubuk şeklinde, üreme sıcaklığı ve pH sırasıyla 37-66 °C (optimum 62°C) ve pH 8.0-10,5 (optimum 9,5-9,7) olarak belirlenmiştir. Bakterinin, D-gulkoz,

sükroz, D-fruktoz, D-trehaloz ve nişasta karbon kaynaklarında ürediği gözlemlenmiştir. Katalaz testinin negatif olduğu gözlemlenmiştir. Fenotipik özellikler, 16S rDNA gen dizi analizi bu izolatın *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu anlaşılmıştır.

Yumoto ve ark.¹ Kamchatka sıcak su kaplıcalarından yeni ılımlı termofilik TH13^T varyetesini izole etmişlerdir. Türün gram-pozitif, fakültatif, aerob, düz hareketsiz ve çubuk şeklinde olduğunu, 30- 64 °C arasında ürediğini (optimum 54 °C) bulmuşlardır. Varyetenin katalaz testi pozitif ve % 3'den fazla NaCl (w/v) de üremediğini tespit edilmiştir. İzolatın pH 7-8 ürediği tespit edilmiştir. 16S rRNA'ya dayalı filogenetik analizler sonucunda bu türün *Anoxybacillus* cinsinin bir üyesi olduğunu bulmuşlardır.

Dulger ve ark.¹² Türkiye'deki Rize ve Çanakkale'de bulunan Ayder ve Kestanbol sıcak su kaplıcalarından iki termofilik basil izole etmişlerdir. ABO4^T ve K4^T olarak adlandırdıkları izolatların spor formu, fakültatif anaerob, gram-pozitif, çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların optimum sıcaklıklarına 50-55 °C, yeni ılımlı termofilik olduklarını bulmuşlardır. Bu türlerin çeşitli karbon kaynaklarında (D-glukoz, D- rafinoz, D-sükroz, D-xylose, D-fruktoz, L-arabinoz, maltoz, D-mannoz, D-mannitol) üreyebildiklerini tespit etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizleri sonucunda bu türlerin *Anoxybacillus* cinsine ait olduklarını bulmuşlardır.

Poli ve ark.¹³ Antartika'daki jeotermal alanlardan yeni bir spor formu olan *Anoxybacillus* türünü izole etmişlerdir. Bu türün gram pozitif olduğunu optimum üreme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 61°C'de ve 5.6 olarak bulmuşlardır. Bu türün galaktoz, trehaloz, maltoz ve sükroz karbon kaynaklarını kullandıklarını

belirlemişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizi sonuçlarından bu türün yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu tespit etmişlerdir.

Kevbrin ve ark.¹⁴ Kamchatka' daki jeotermal kaynaklarından termofilik bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen bakteriyi KG4 olarak adlandırmışlardır. KG4' ün spor oluşturan hareketli, fakültatif, aerob, gram pozitif çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Aerobik olarak glukoz, fruktoz trehaloz, proteinli substratı ve pektini karbon kaynağı olarak kullandıkları bulunmuştur. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığının ve pH'sının sırasıyla 60 °C ve 6.8-8.5 olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA gen dizi analizi ile bu bakterinin *Anoxybacillus kamchatkensis* olarak adlandırılmasına karar vermişlerdir.

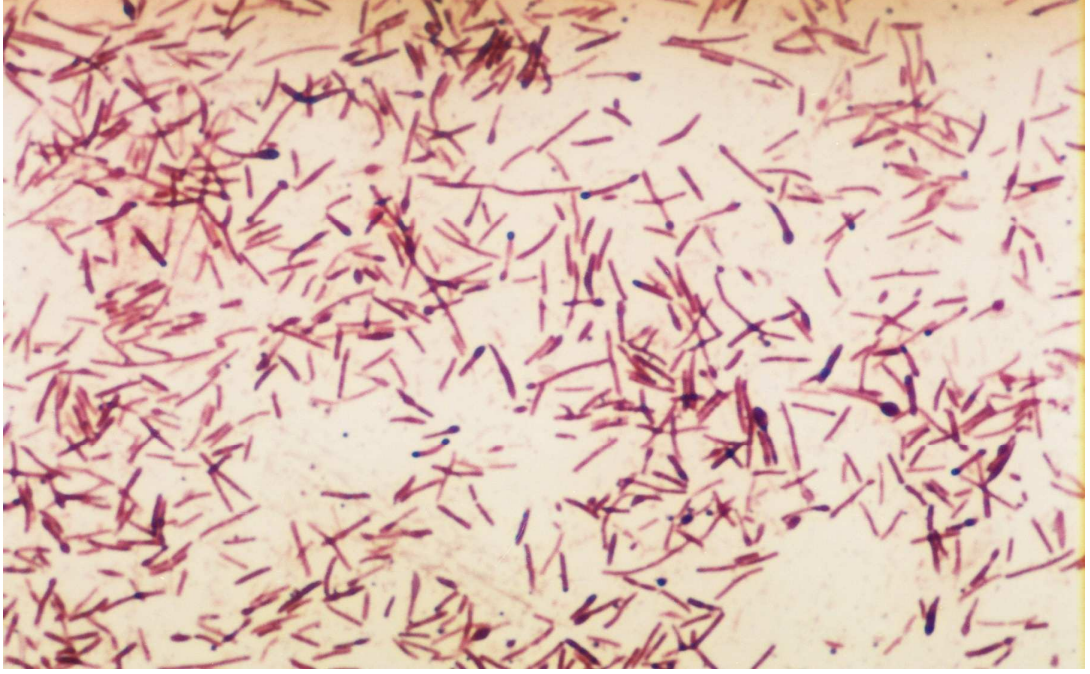
Derekova ve ark.¹⁵ Bulgaristan'ın Rup basin bölgesindeki sıcak su kaplıcalarından gram-pozitif, spor formlu, oldukça aerobik, termofilik üç yeni tür izole etmişlerdir. Optimal üreme sıcaklığı ve pH sırayla 55-58 °C ve 6.0-6.5 olarak tespit edilmiştir. R270^T olarak adlandırdıkları türün 16S rRNA, yağ asidi profili bu türün *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğunu ve bu nedenle *Anoxybacillus rupiensis* sp. olarak adlandırmışlardır

Tablo 4.2.2: AH1 ve AH2'nin Fenotipik Özelliklerinin Diğer *Anoxybacillus* Türleri ile Karşılaştırılması

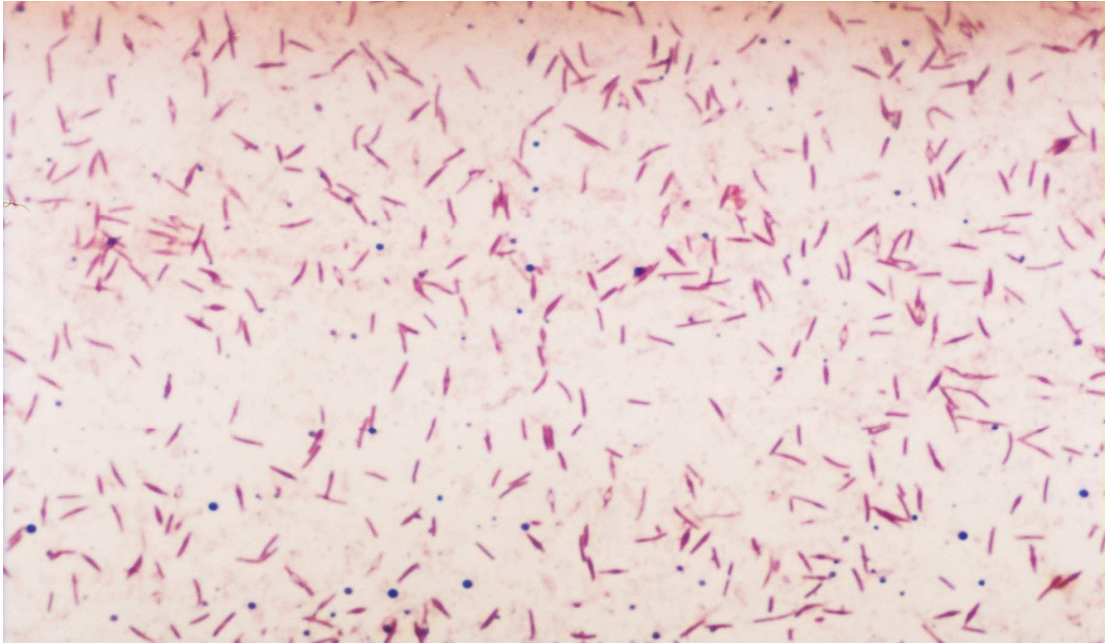
Özellikler	1	2	3	4	5	6	7
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Gram Özelliği	+	+	+	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	-	+	+	+	+
Büyüme Sıcaklığı (°C)	30-65	30-65	37-66	30-70	45-65	35-65	55-67
Optimum büyüme sıcaklığı (°C)	60	65	62	50	61	55	65
Büyüme pH'sı	5.5-10.0	6.0-11.0	8.0-10.5	6.0-11.0	5.0-6.5	5.5-9.5	6.0-7.5
Optimum büyüme pH'sı	7.5	7.5	9.5-9.7	7.5-11	5.6	7.5	7.2
Nişasta Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	-
Katalaz	+	+	-	ND	ND	+	+
Kazein Hidrolizi	+	+	-	ND	ND	-	-
Jelatin Hidrolizi	-	-	-	+	-	-	-
Üreaz	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
Lizozim duyarlılığı	+	w	ND	ND	ND	-	+
% 2 NaCl' de gelişme	+	+	+	+	+	+	ND
Glikoz kullanımı	-	-	+	+	+	-	-
Galaktoz kullanımı	w	-	ND	ND	ND	w	-
Sükroz kullanımı	-	w	+	+	ND	ND	ND
Laktoz kullanımı	-	w	ND	-	ND	-	-
Gliserol kullanımı	w	w	ND	ND	ND	ND	ND

1, AH1 izolatı; 2,AH2 izolatı; 3,*Anoxybacillus punchinensis* (Pikuta ve ark. 2000)⁸; 4, *Anoxybacillus ayderensis* (Dulger ve ark. 2004)¹² 5,*Anoxybacillus amylolyticus* (Poli ve ark. 2006)¹³; 6, *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* KG8 (Gul-Güven ve ark. 2008)¹⁶; 7, *Anoxybacillus thermarum* (Poli ve ark. 2009)¹⁷
 +: pozitif özellik gösterme -: negatif özellik gösterme w: zayıf özellik gösterme
 ND: test edilmemiş.

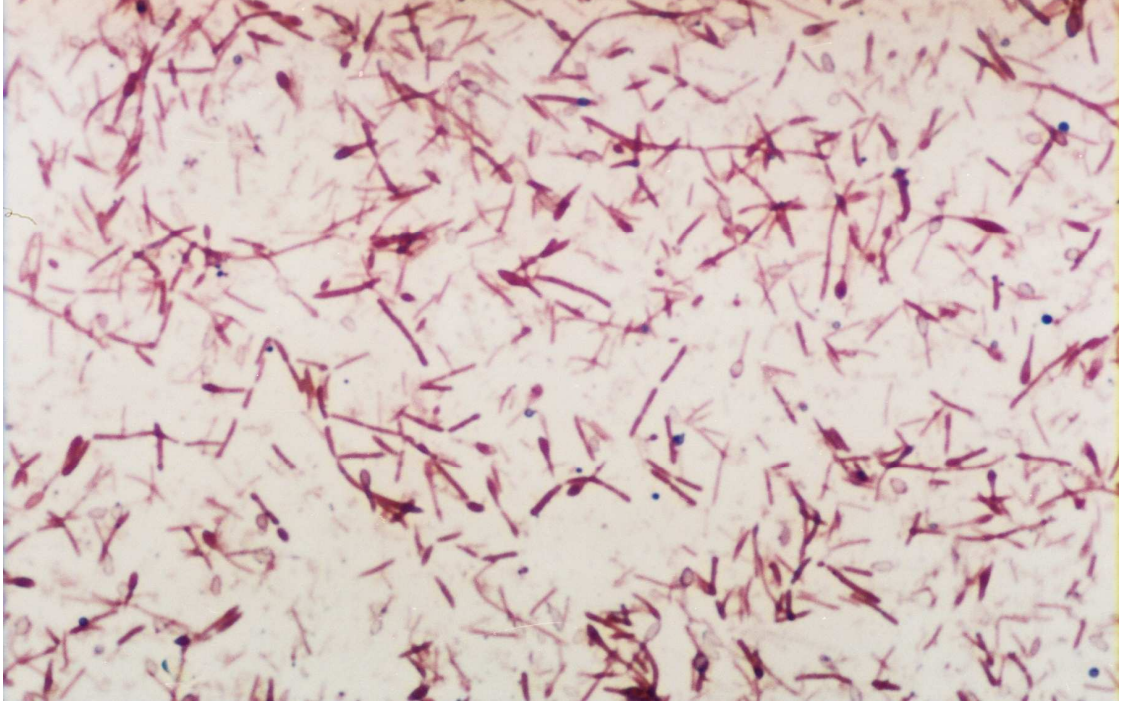
RESİMLER



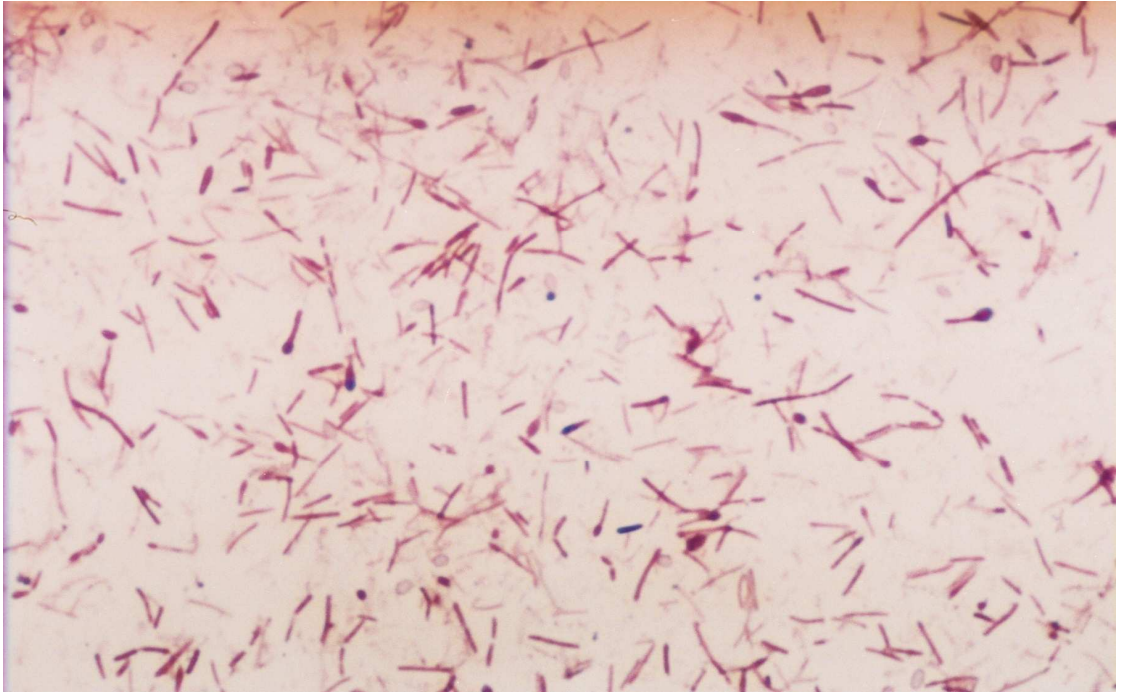
Resim 4.1: GE1'in gram boyama özelliği



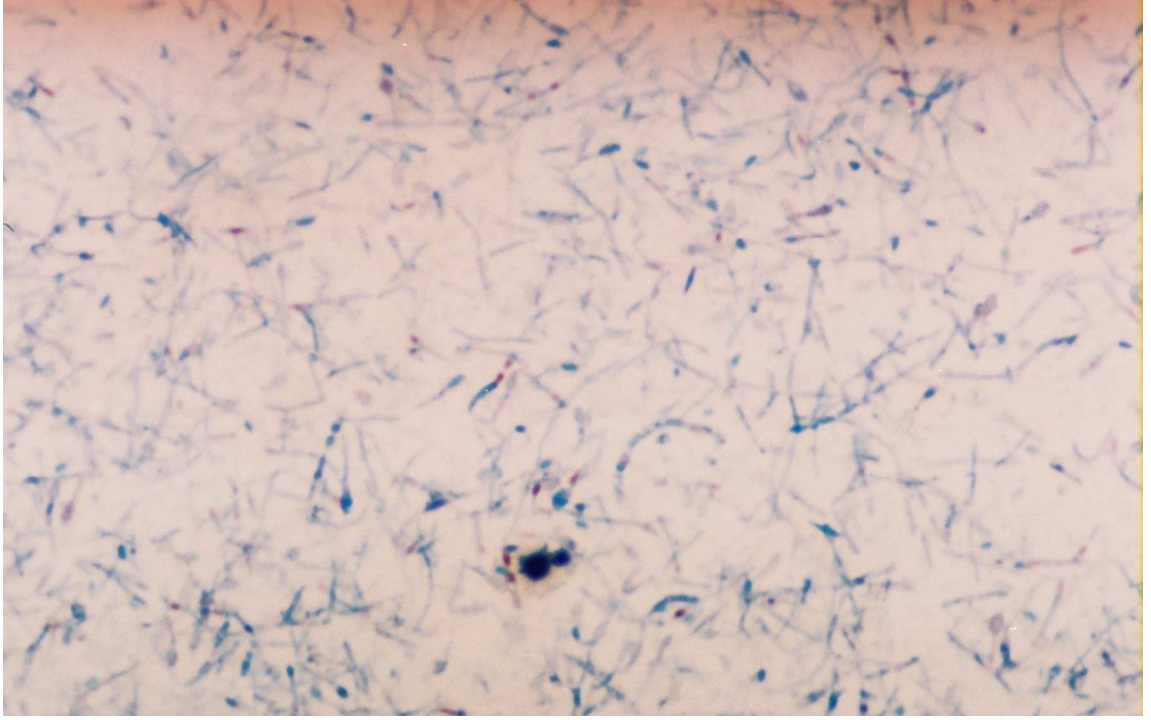
Resim 4. 2 : GE2'nin gram boyama özelliği



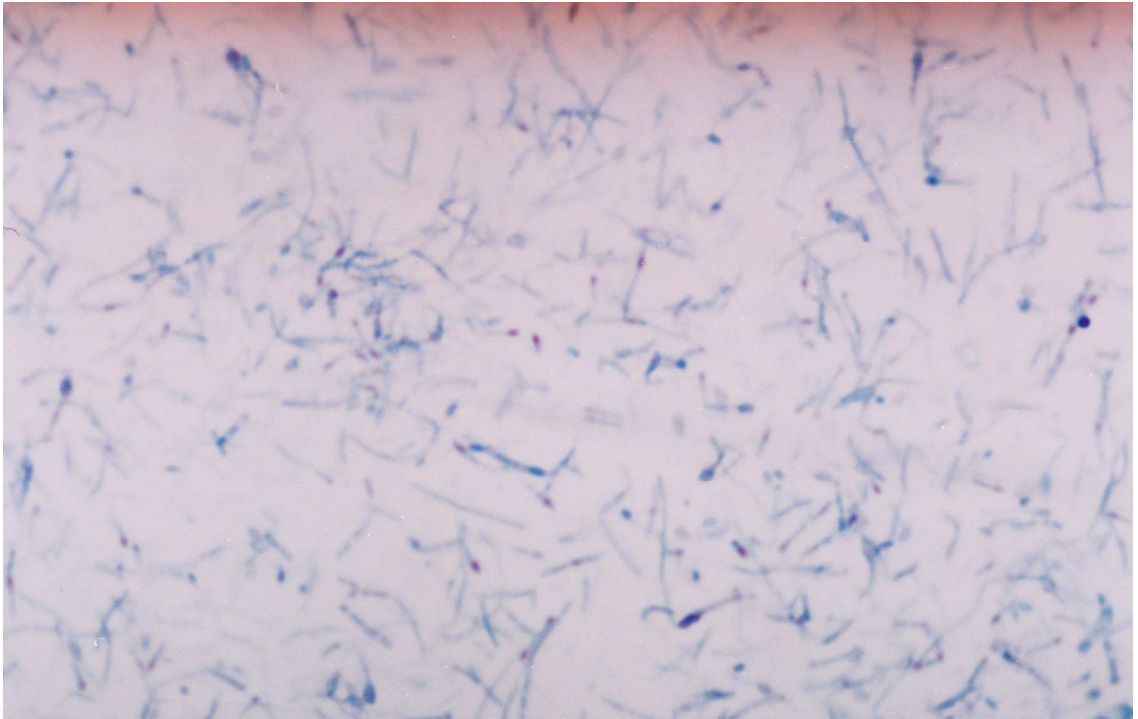
Resim 4.3 : AH1'in gram boyama özelliği



Resim 4.4 : AH2'nin gram boyama özelliği

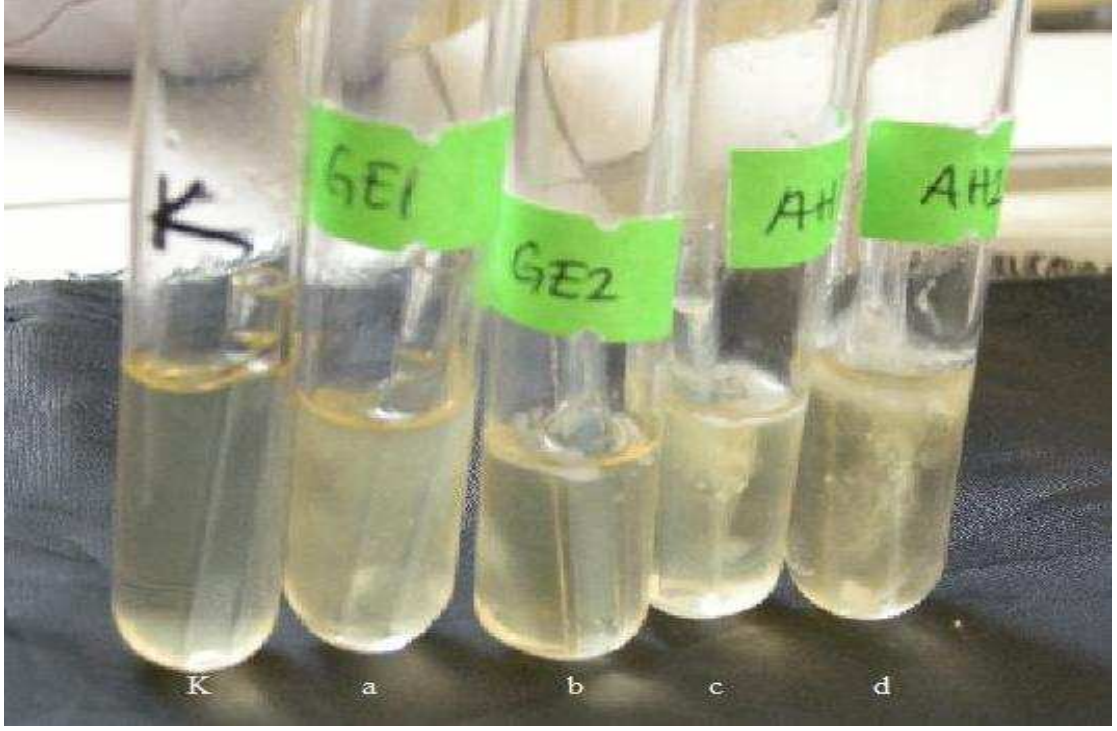


Resim 4.5 : AH1'in spor boyama özelliği

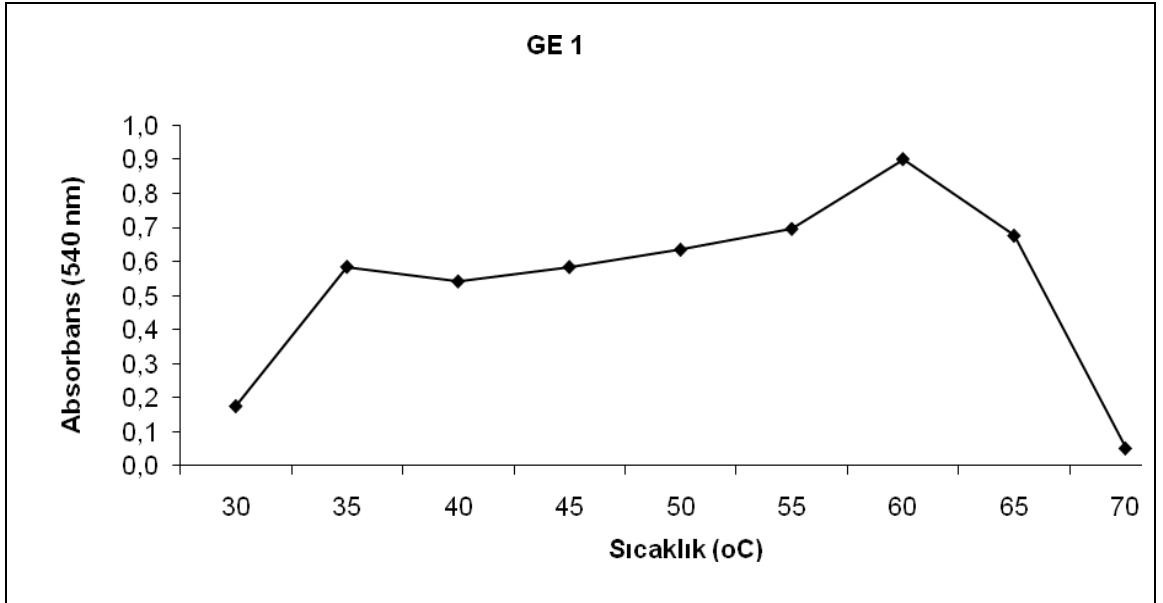


Resim 4.6 : AH2'nin spor boyama özelliği

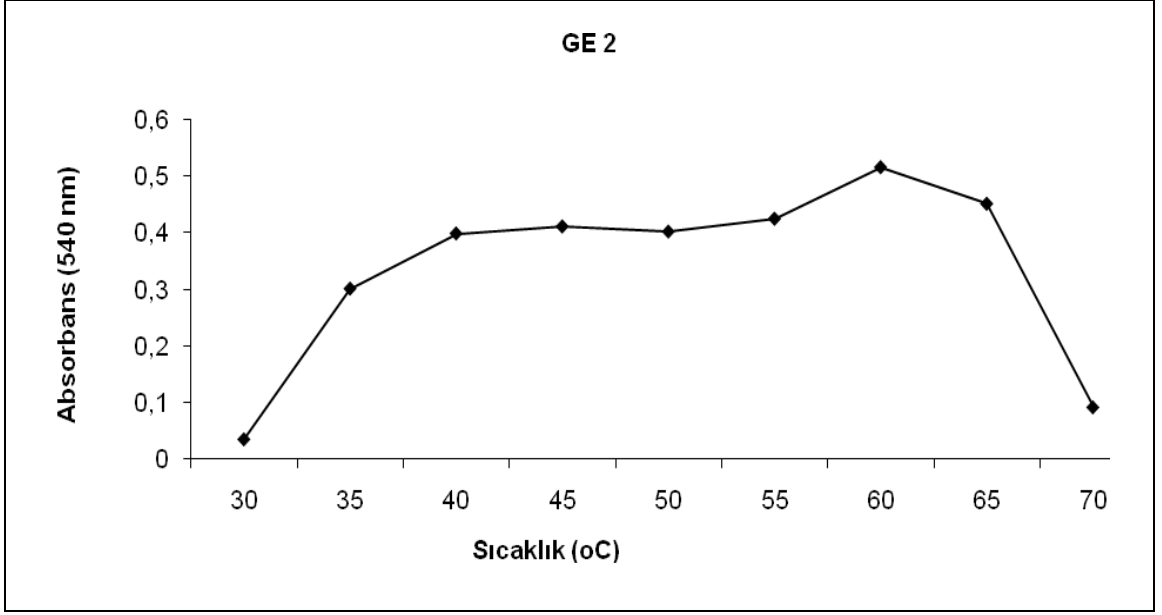
ŞEKİLLER



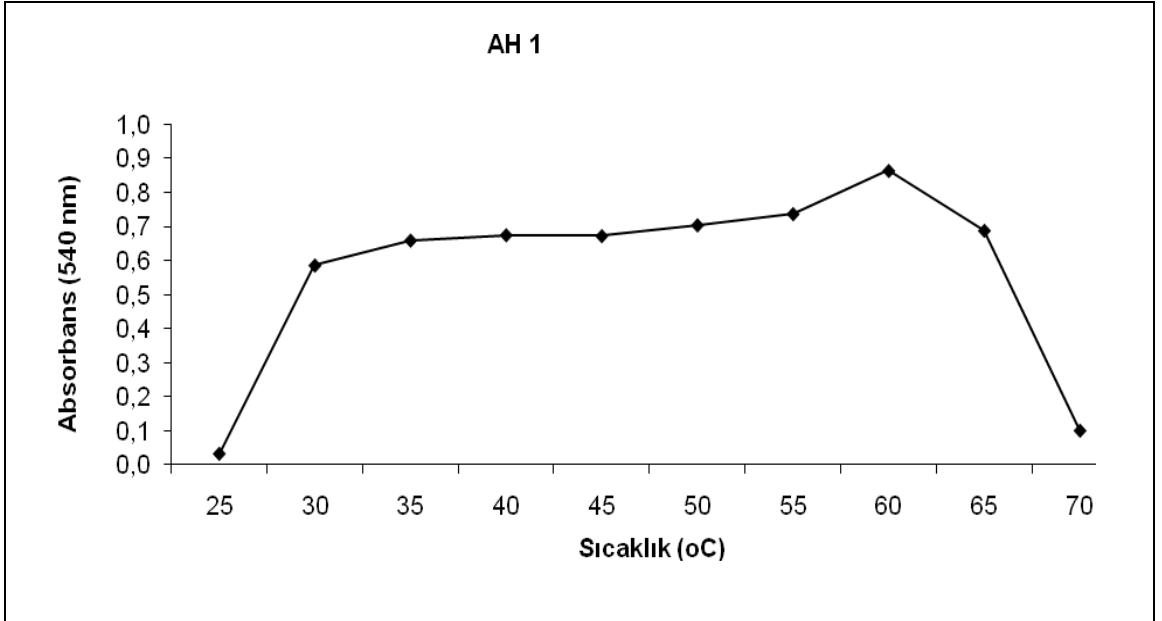
Şekil 4.1: Bakterilerin Hareket Testi



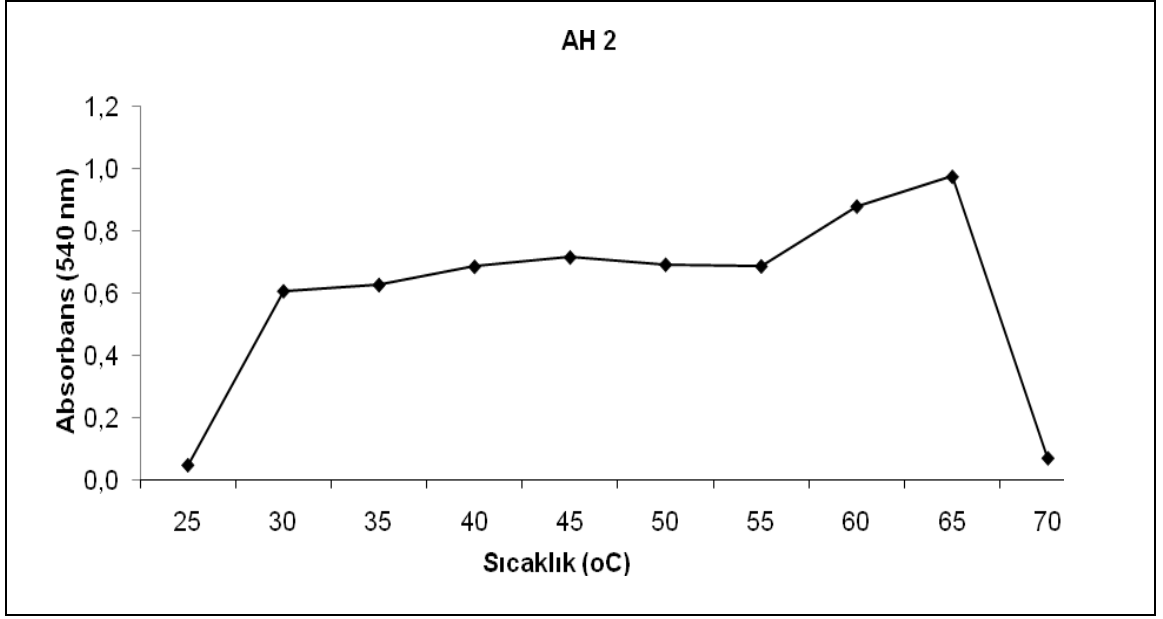
Şekil 4.2: Sıcaklığın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi



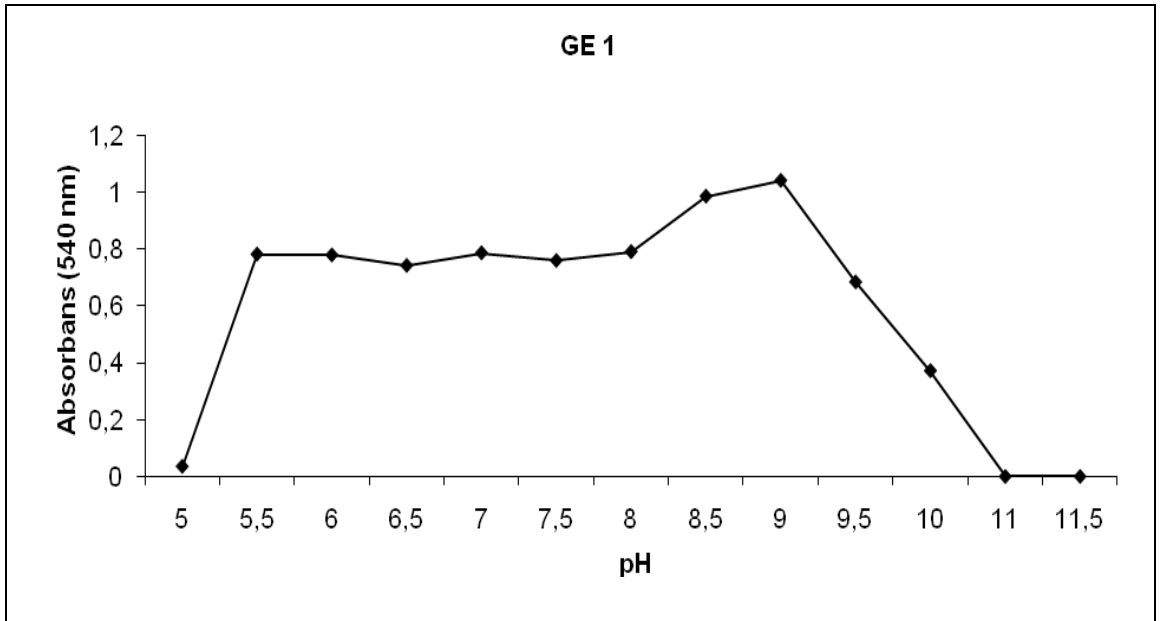
Şekil 4.3: Sıcaklığın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



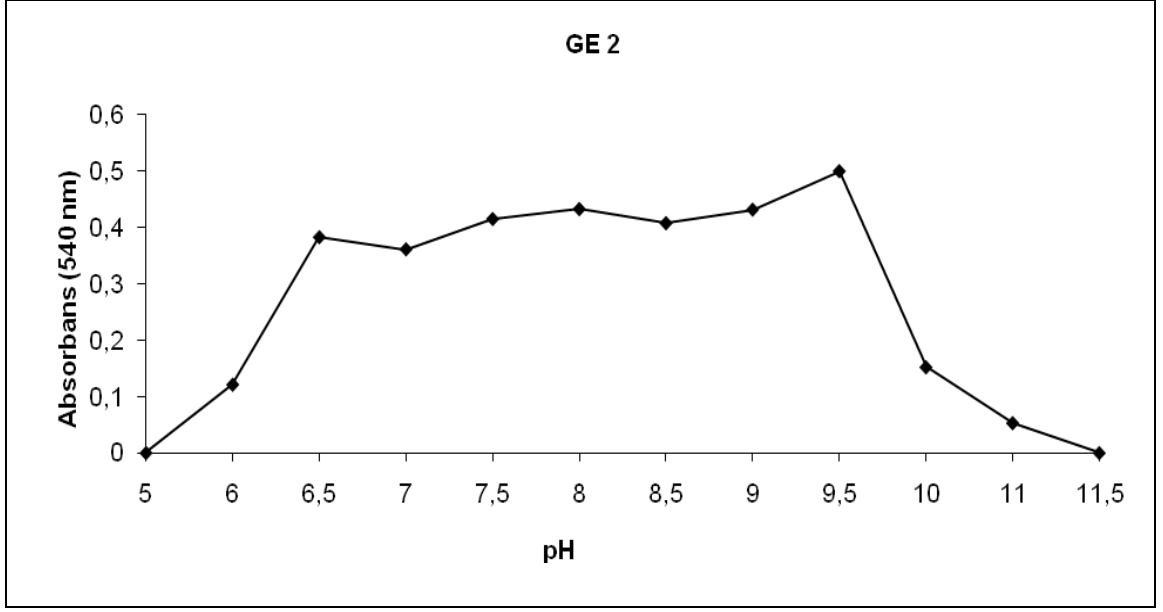
Şekil 4.4: Sıcaklığın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi



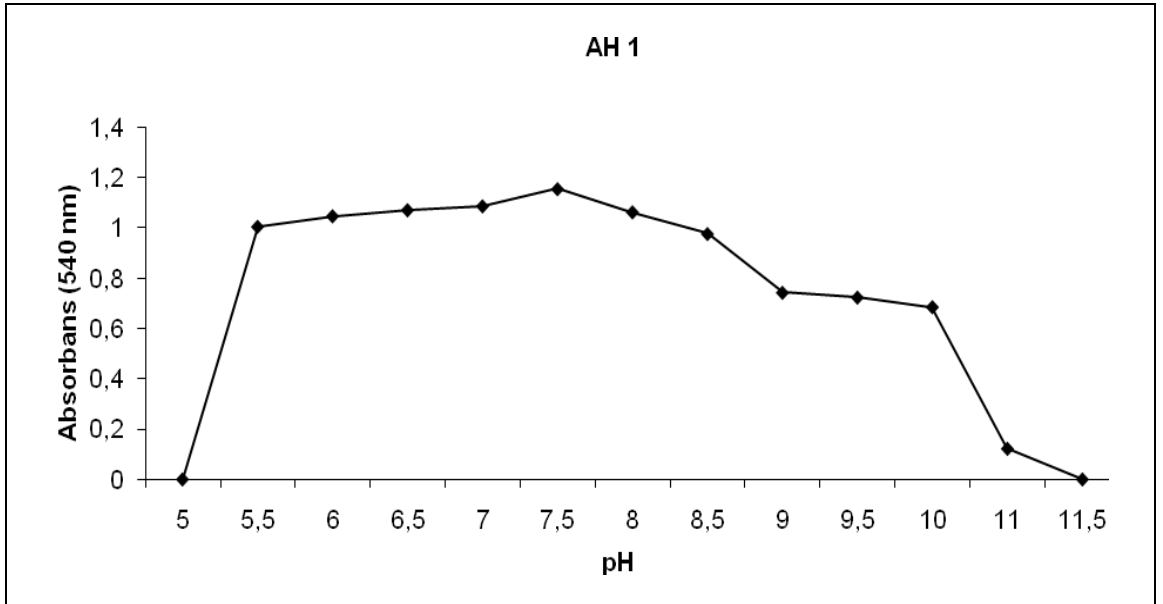
Şekil 4.5: Sıcaklığın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



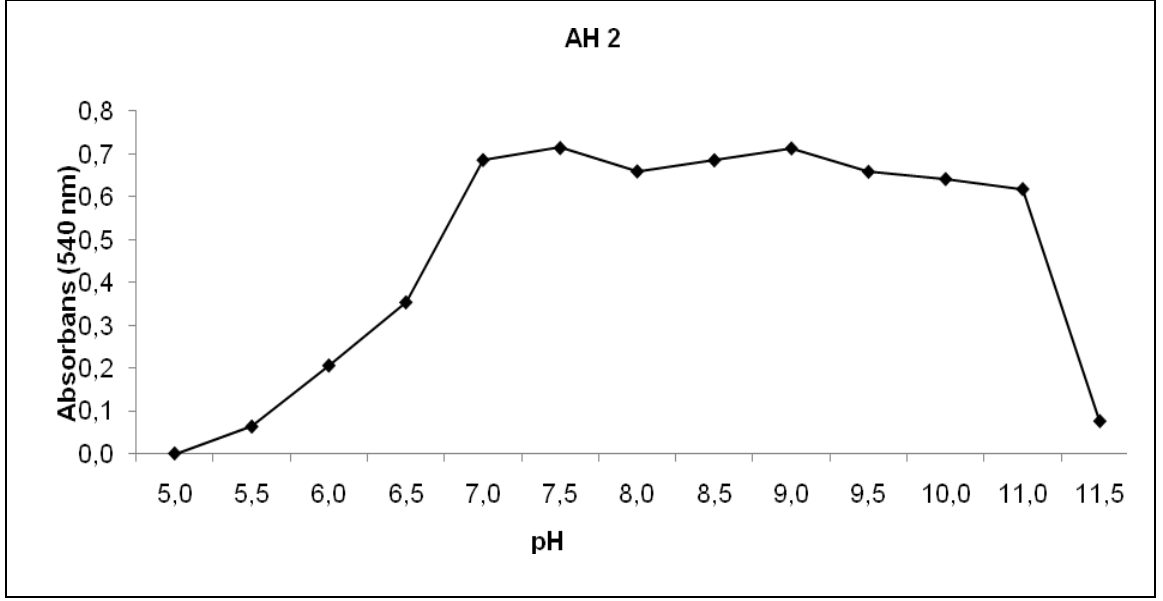
Şekil 4.6: pH'nın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi



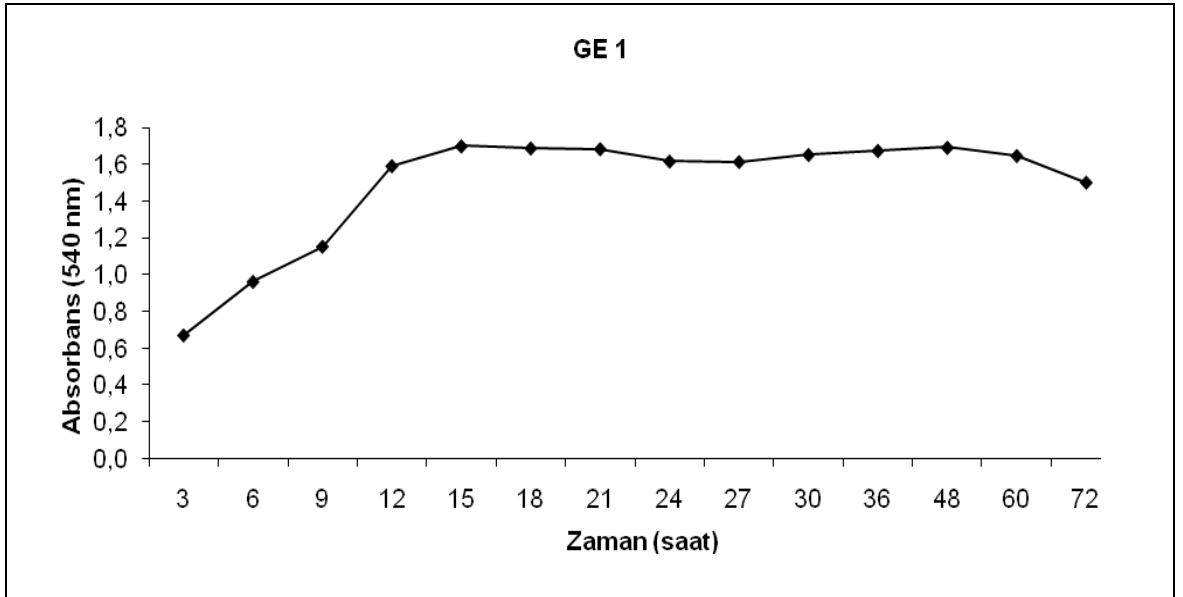
Şekil 4.7: pH'nın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



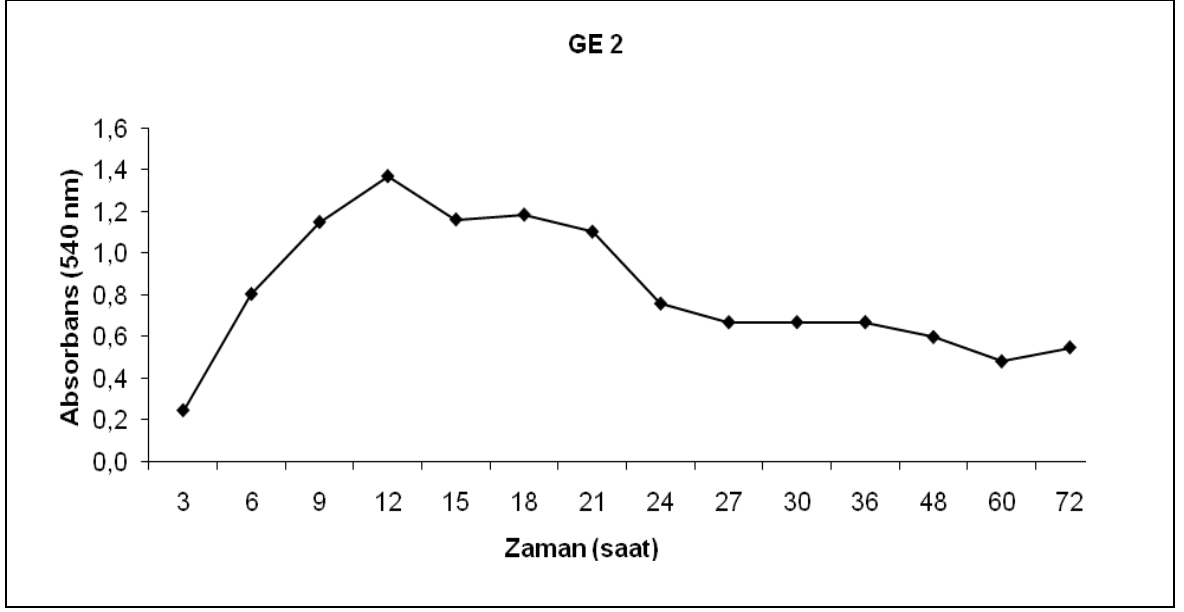
Şekil 4.8: pH'nın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi



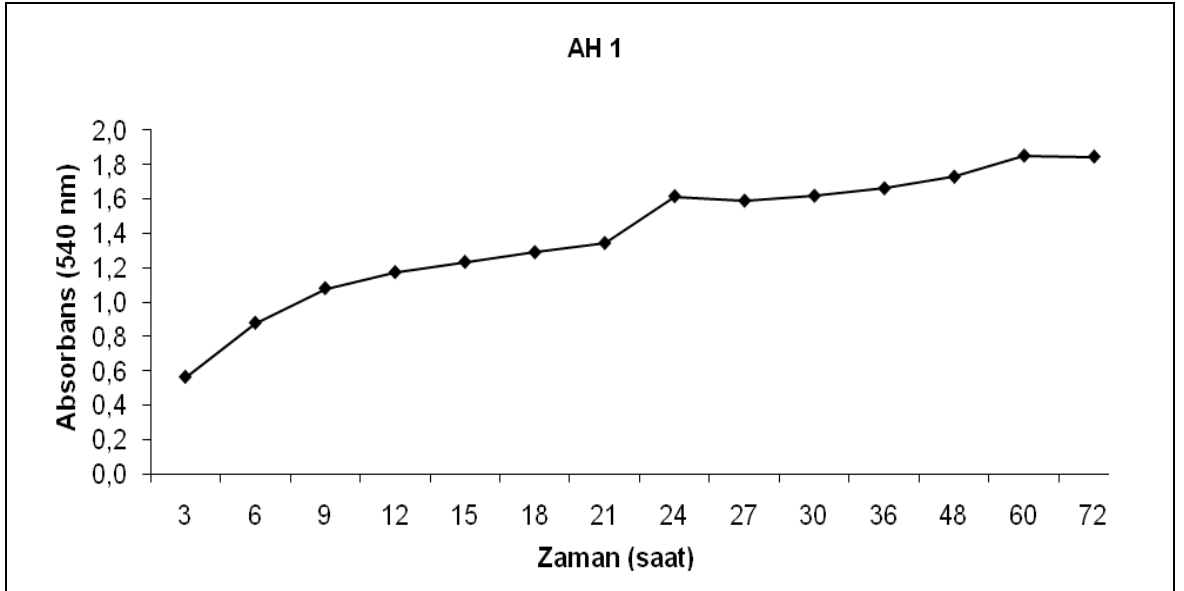
Şekil 4.9: pH'nın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



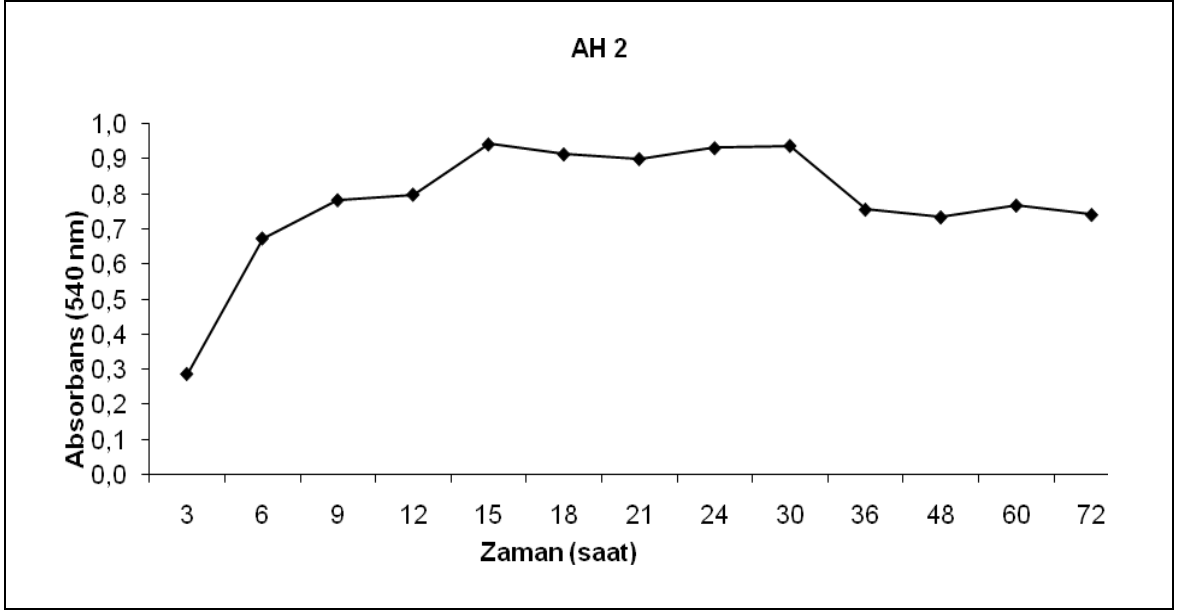
Şekil 4.10: Zamanın GE1'in Üremesi Üzerine Etkisi



Şekil 4.11: Zamanın GE2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



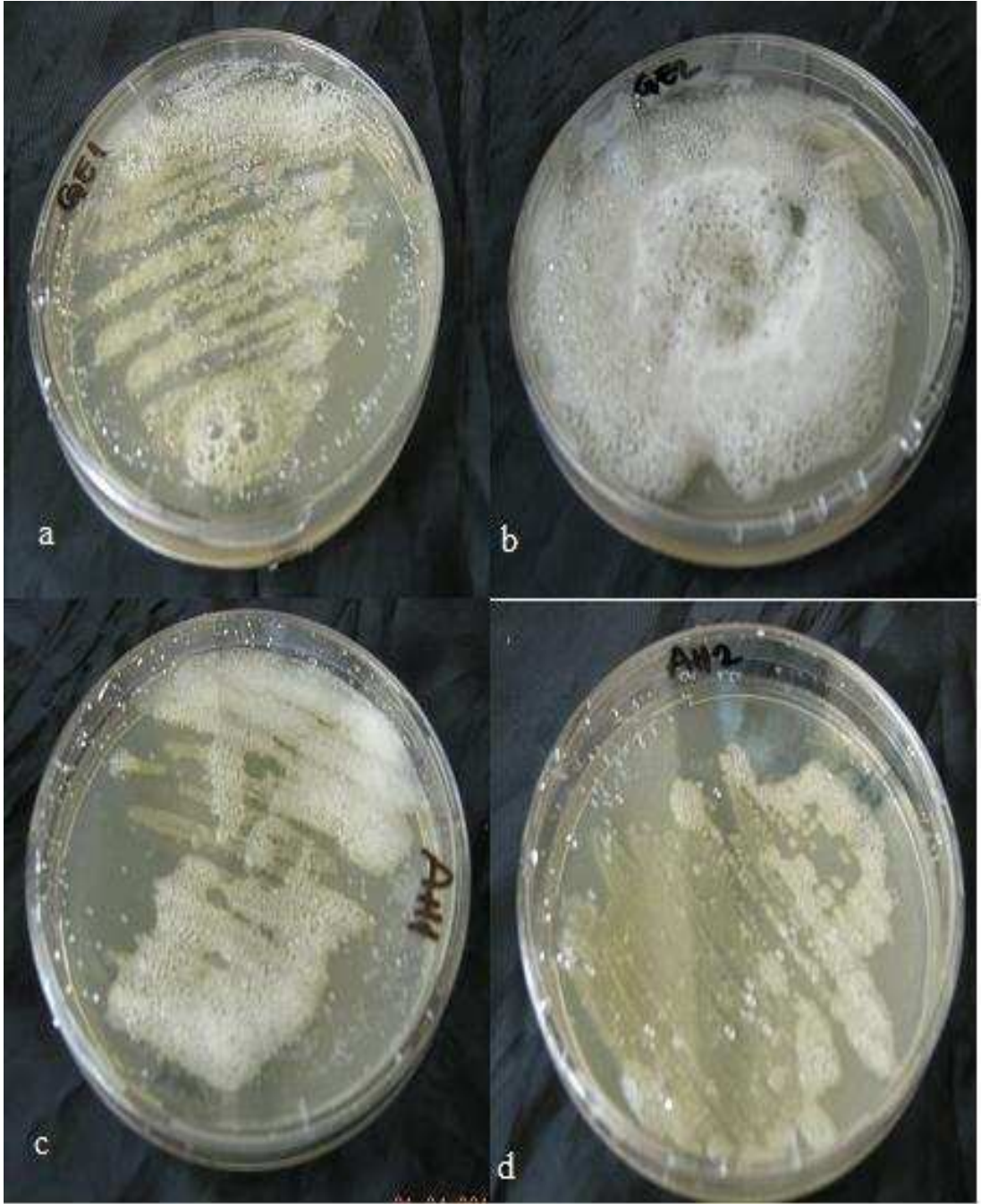
Şekil 4.12: Zamanın AH1'in Üremesi Üzerine Etkisi



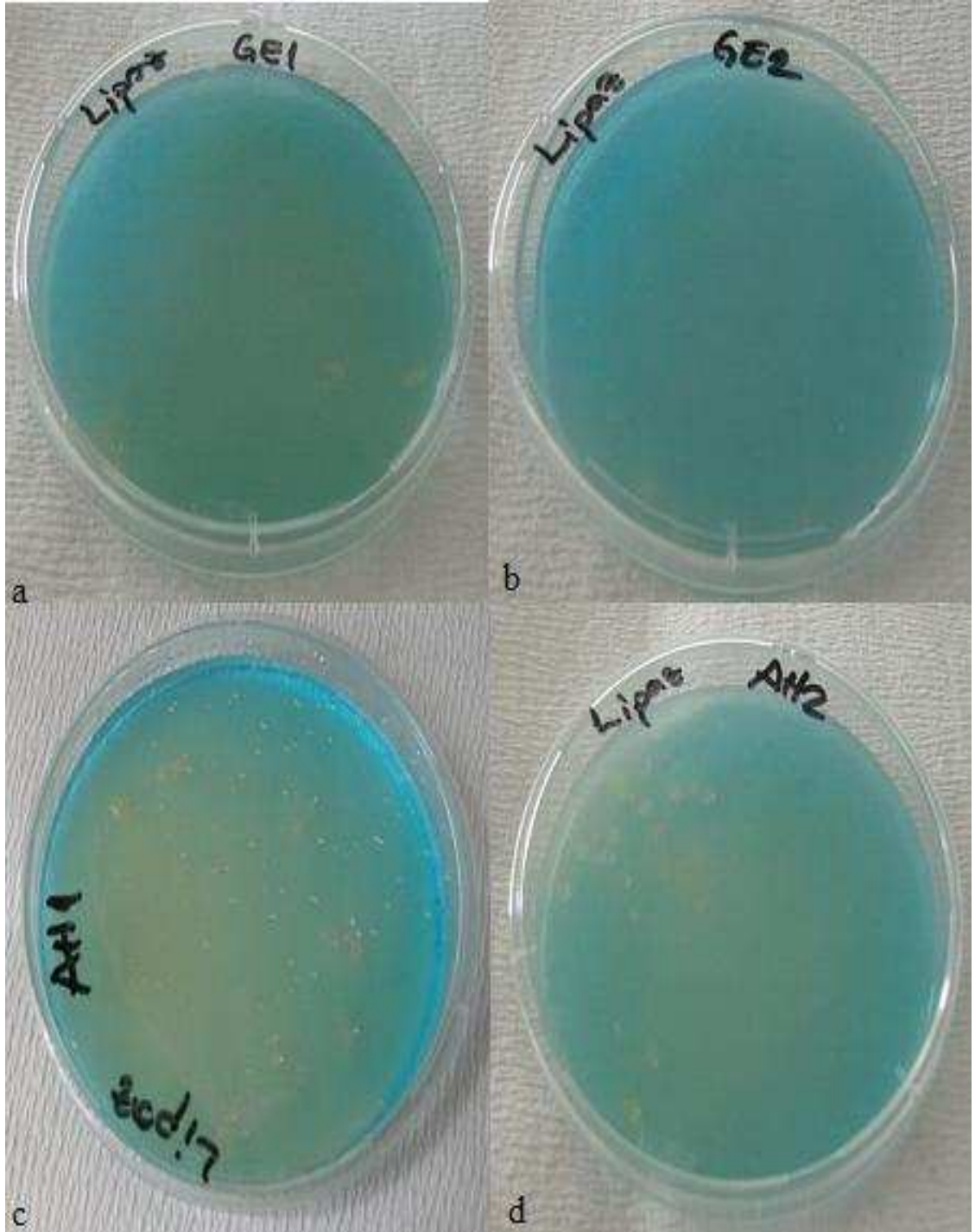
Şekil 4.13: Zamanın AH2'nin Üremesi Üzerine Etkisi



Şekil 4.14: Nişasta Hidroliz Testi
a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2



Şekil 4.15: Katalaz Testi
a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2



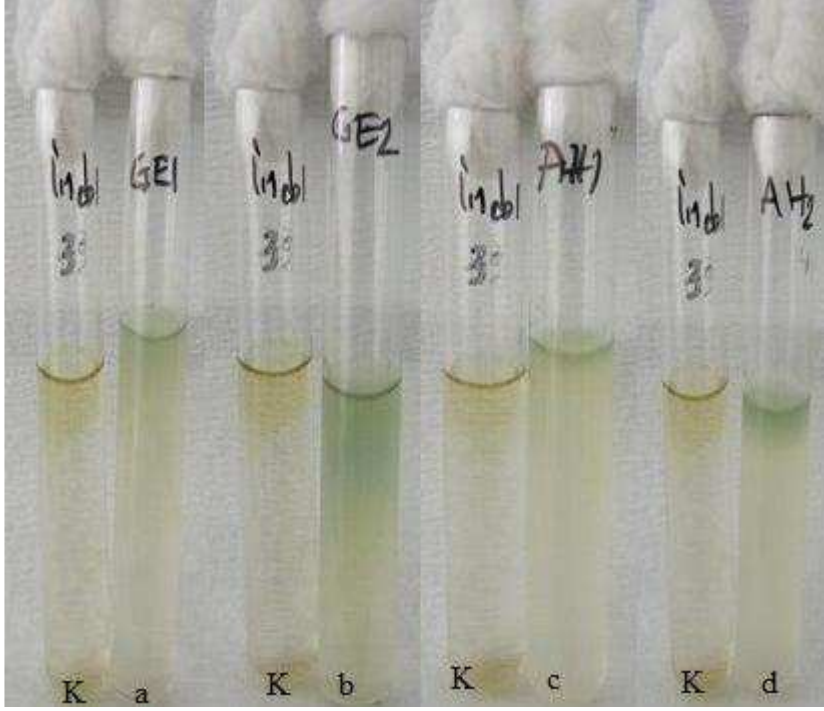
Şekil 4.16: Lipaz Testi
a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2



Şekil 4.17: Jelatin Hidroliz Testi
K:Kontrol, a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2



Şekil 4.16: Üreaz Testi
K:Kontrol, a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2



Şekil 4.19: İndol Testi

K:Kontrol, a: GE1, b: GE2, c: AH1, d: AH2

Tablo.4.1:Lizozim Duyarlılığı (OD 540nm)

	<i>Kontrol</i>	<i>%0,001 Lizozim</i>
GE1	1,527	0,003
GE2	0,321	0,032
AH1	0,413	0,523
AH2	0,585	0,371

Tablo 4.2: Sodyum Azid Duyarlılığı (OD 540 nm)

	<i>Kontrol</i>	<i>%0.02 Sodyum Azid</i>
GE1	1,527	1,355
GE2	0,205	0,186
AH1	1,116	0,293
AH2	0,585	0,141

Tablo 4.3: Değişik NaCl Konsantrasyonlarında Bakterilerin Üremeleri (OD 540)

	<i>Kontrol</i> (NB+Saf su)	<i>NBÇ</i> (NB+Çeşme suyu)	<i>%0.5 NaCl</i>	<i>%1 NaCl</i>	<i>%2 NaCl</i>	<i>%3 NaCl</i>	<i>%5 NaCl</i>
GE1	0,047	1,989	1,745	1,284	0,119	0,111	0,106
GE2	0,205	0,940	0,459	0,850	0,080	0,089	0,084
AH1	1,116		1,493	1,385	0,604	0,127	0,114
AH2	0,585			0,499	0,512	0,123	0,126

Tablo 4.4: GE1'in Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

	<i>1.gün</i>	<i>2. gün</i>	<i>3.gün</i>	<i>Sonuç</i>
Kontrol	0,225	0,157	0,206	
Glikoz	0,531	0,794 (T)	0,340	w
Galaktoz	0,554	0,923 (T)	0,652	++
Fruktoz	0,509	0,698 (T)	0,249	w
Sakkaroz	0,460	0,859 (T)	0,634	++
Maltoz	0,448	0,742 (T)	0,562	+
Laktoz	0,279	0,425	0,568	+
Gliserol	0,516	0,591 (T)	0,180	w
Sodyum sitrat	ND	ND	0,231	--

T: Taze besiyerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi, w: Üreme zayıf, +: Üreme yeterli, --: Üreme sağlanmadı

Tablo 4.5: GE2'nin Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

	<i>1.gün</i>	<i>2. gün</i>	<i>3.gün</i>	<i>Sonuç</i>
Kontrol	0,201	0,179	0,117	
Glikoz	0,285	0,297	0,338	w
Galaktoz	ND		0,154	--
Fruktoz	0,190	0,209	0,215	--
Sakkaroz	0,254	0,279	0,316	w
Maltoz	0,392	0,721 (T)	0,558	+
Laktoz	ND		0,112	--
Gliserol	ND		0,135	--
Sodyum sitrat	ND		0,095	--

T: Taze besiyerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi, w: Üreme zayıf, +: Üreme yeterli, --: Üreme sağlanmadı

Tablo 4.6: AH1'in Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

	<i>1.gün</i>	<i>2. gün</i>	<i>3.gün</i>	<i>Sonuç</i>
Kontrol	0,221	0,221	0,209	
Glikoz	ND	0,217	0,232	--
Galaktoz	0,607	0,571 (T)	0,091	w
Fruktoz	ND		0,182	--
Sakkaroz	0,214	0,220	0,222	--
Maltoz	0,233	0,245	0,208	--
Laktoz	0,238	0,241	0,269	--
Gliserol	0,592	0,578 (T)	0,197	w
Sodyum sitrat	ND		0,152	--

T: Taze besiyerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

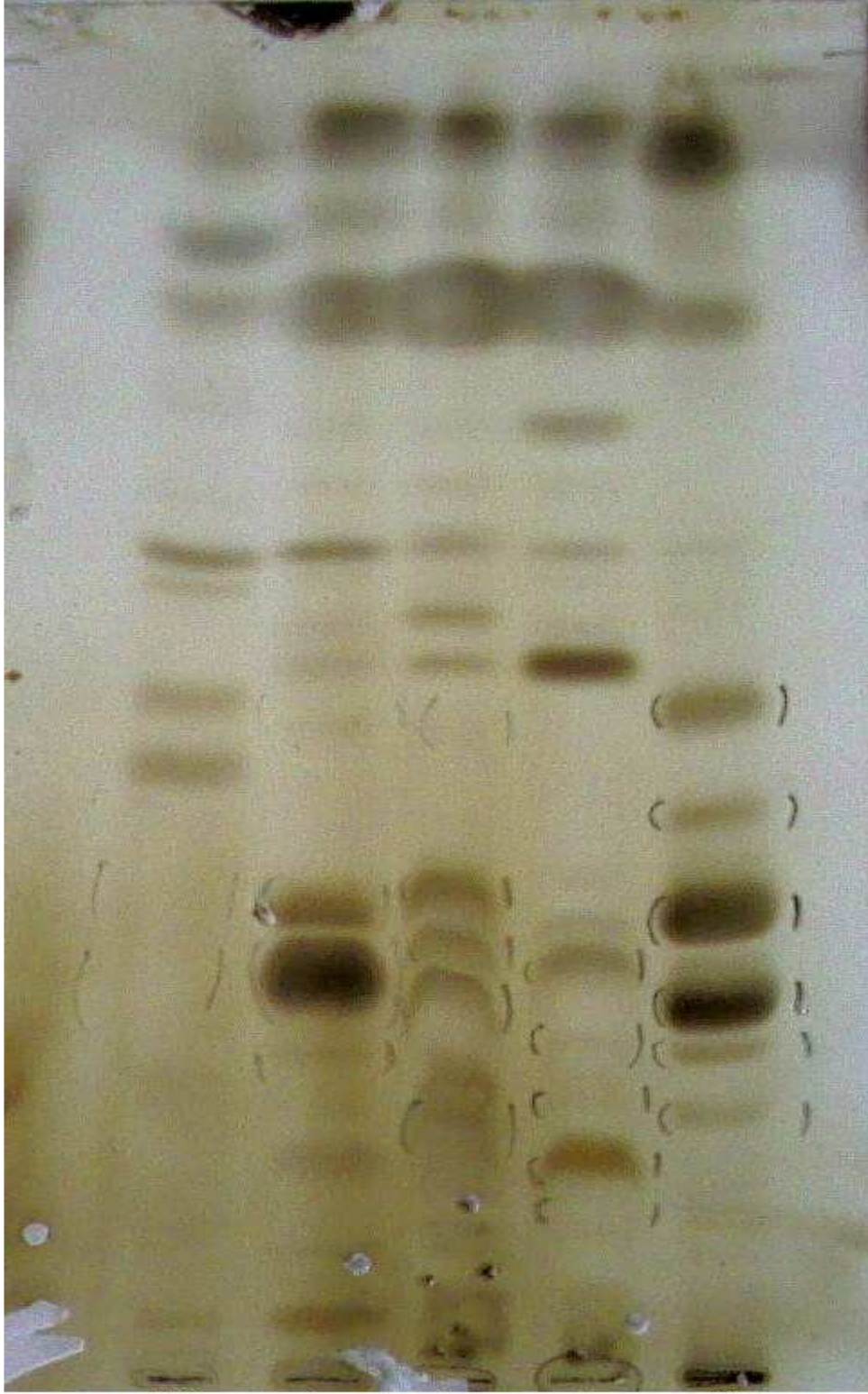
ND: Üreme tespit edilmedi, w: Üreme zayıf, +: Üreme yeterli, --: Üreme sağlanmadı

Tablo 4.7: AH2'nin Farklı Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 540 nm)

	<i>1.gün</i>	<i>2. gün</i>	<i>3.gün</i>	<i>Sonuç</i>
Kontrol	0,275	0,214	0,230	
Glikoz	0,273	0,304	0,324	--
Galaktoz	0,264	0,319	0,364	--
Fruktoz	0,274	0,272	0,257	--
Sakkaroz	0,564	0,366	0,392	w
Maltoz	0,241	0,269	0,296	--
Laktoz	0,429	0,464	0,507	w
Gliserol	0,432	0,500	0,168	w
Sodyum sitrat	ND		0,156	--

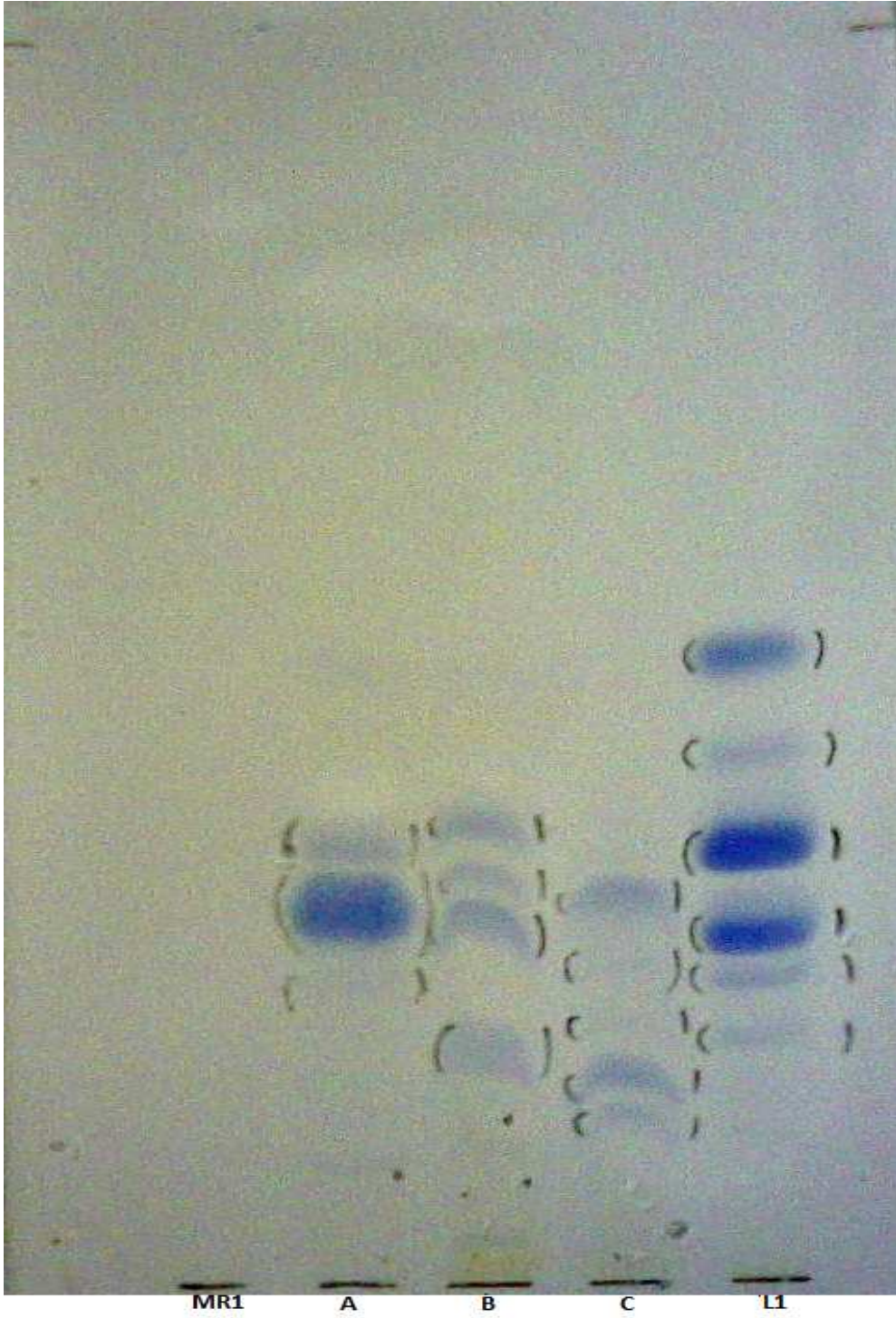
T: Taze besiyerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi, w: Üreme zayıf, +: Üreme yeterli, --: Üreme sağlanmadı



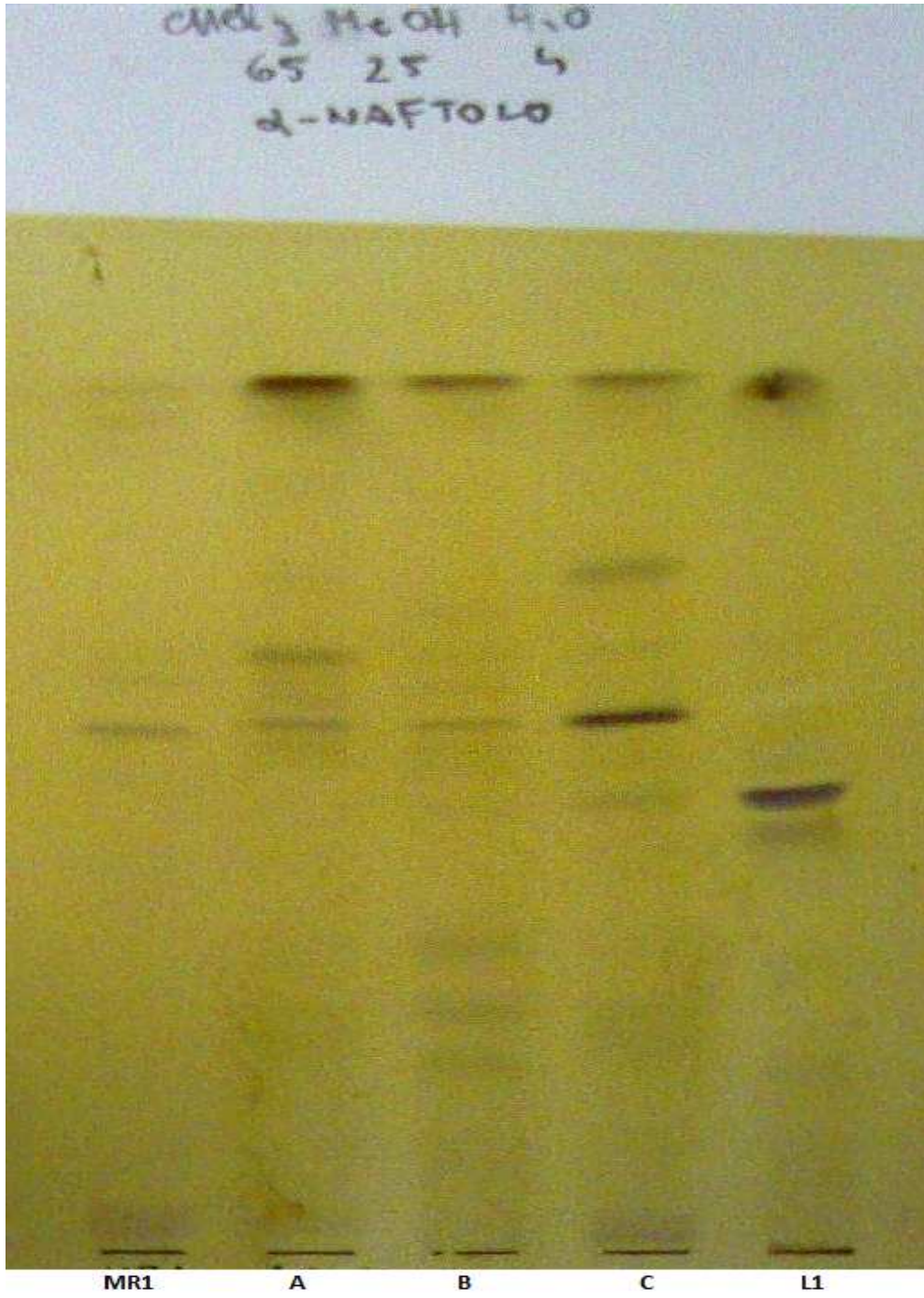
Şekil 4.20: İzolatlara ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin Standartların Fosfo-gliko-aminolipitleri ile Karşılaştırılması

A: AH1, B:GE1, C:GE2 Standartlar: MR1: *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, L1: *Geobacillus toebii*



Şekil 4.21: İzolatlara ait Fosfolipitlerin Standartların Fosfolipitleri ile Karşılaştırılması

A: AH1, B:GE1, C: GE2 Standartlar: MR1: *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, L1: *Geobacillus toebii*



Şekil 4.22: İzolatlara ait Glikolipitlerin Standartların Glikolipitleri ile Karşılaştırılması

A: AH1, B:GE1, C: GE2 Standartlar: MR1: *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, L1: *Geobacillus toebii*



Şekil 4.23: İzolatlara ait Aminolipitlerin Standartların Aminolipitleri ile Karşılaştırılması

A: AH1, B:GE1, C: GE2 Standartlar: MR1: *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, L1: *Geobacillus toebii*

Tablo 4.8: GE1'in 1000 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```
5'_CCGAAACCTGGCCGGCGTGCCTAATAATGCAAGTCGAGCGGACCGAA
TGAGAGCTTGCTCTTATTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATAC
CGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGC
TGTCACCTTGCGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAA
GAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCG
TTTGAACAAGGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACGAGAAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGGACTTGAG
TGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCACGCCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTCCACACCCTTTAA
TGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAAGTACGGCCGCAA
GGCTGAAACCCAAAGAAATTGACGGGGCCCGCACAAACCGGGGAACATGG
GGTTAATCCAGCACCGAAAAACCTAACGGTCTTGAATCCCTGAAACCAG
AAATGGCGTTCCCCCTCCGGGGACA-3'
```

Tablo 4.9: GE2'nin 680 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

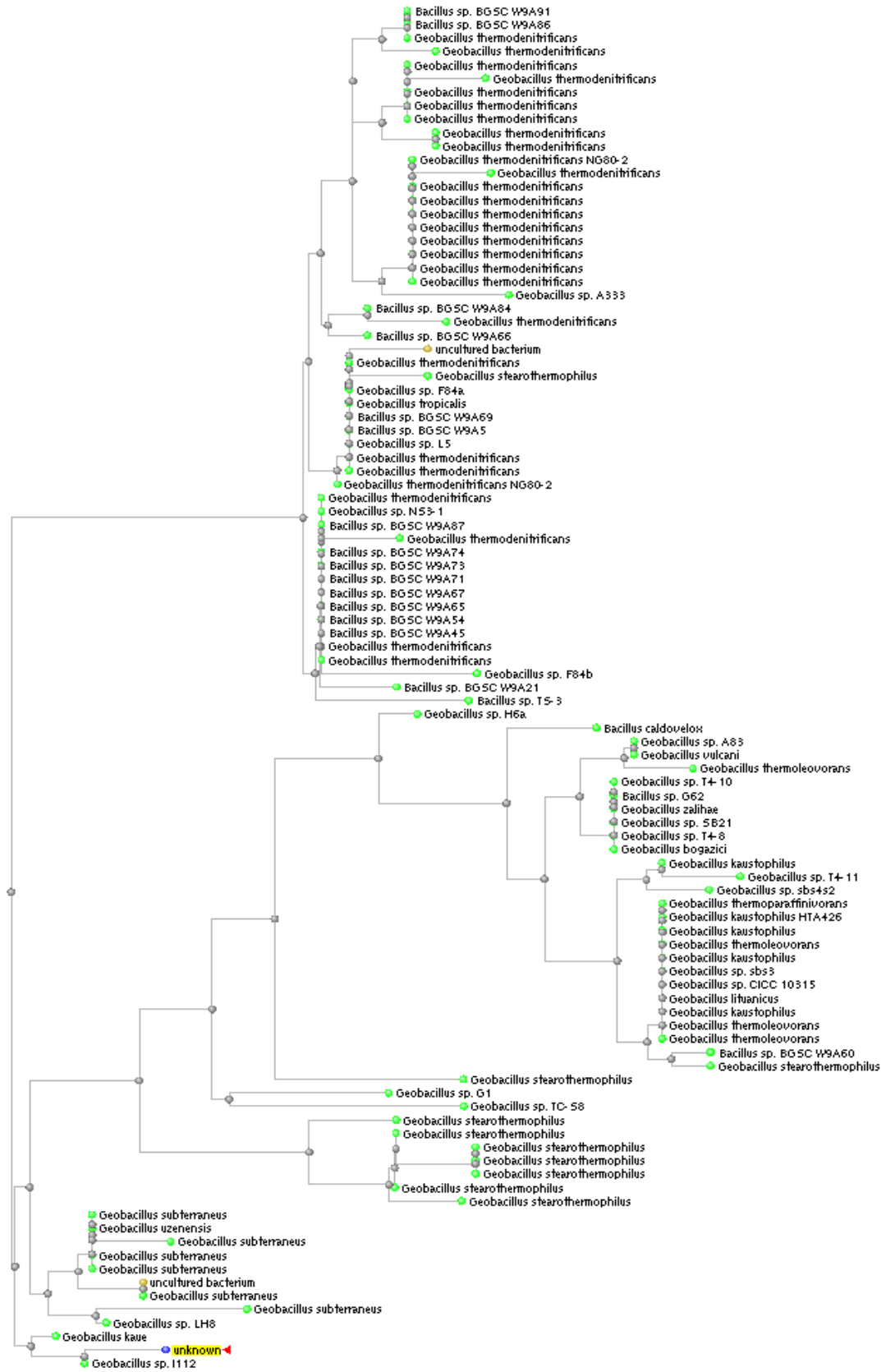
```
5'_GAGCAACTTGGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACCGAAT
GAGAGCTTGCTCTTATTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATAC
CGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGC
TGTCACCTTGCGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAA
GAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCG
TTTGAACAAGGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACGAGAAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCAGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGA
AAAGCCCACGGCTCAACCCGTGGAGGGGTCAATTGGGAAACTGGGGGGAC
TTGATTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCCGTGTACCGGTGAAATGC-3'
```

Tablo 4.10: AH1'in 1130 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

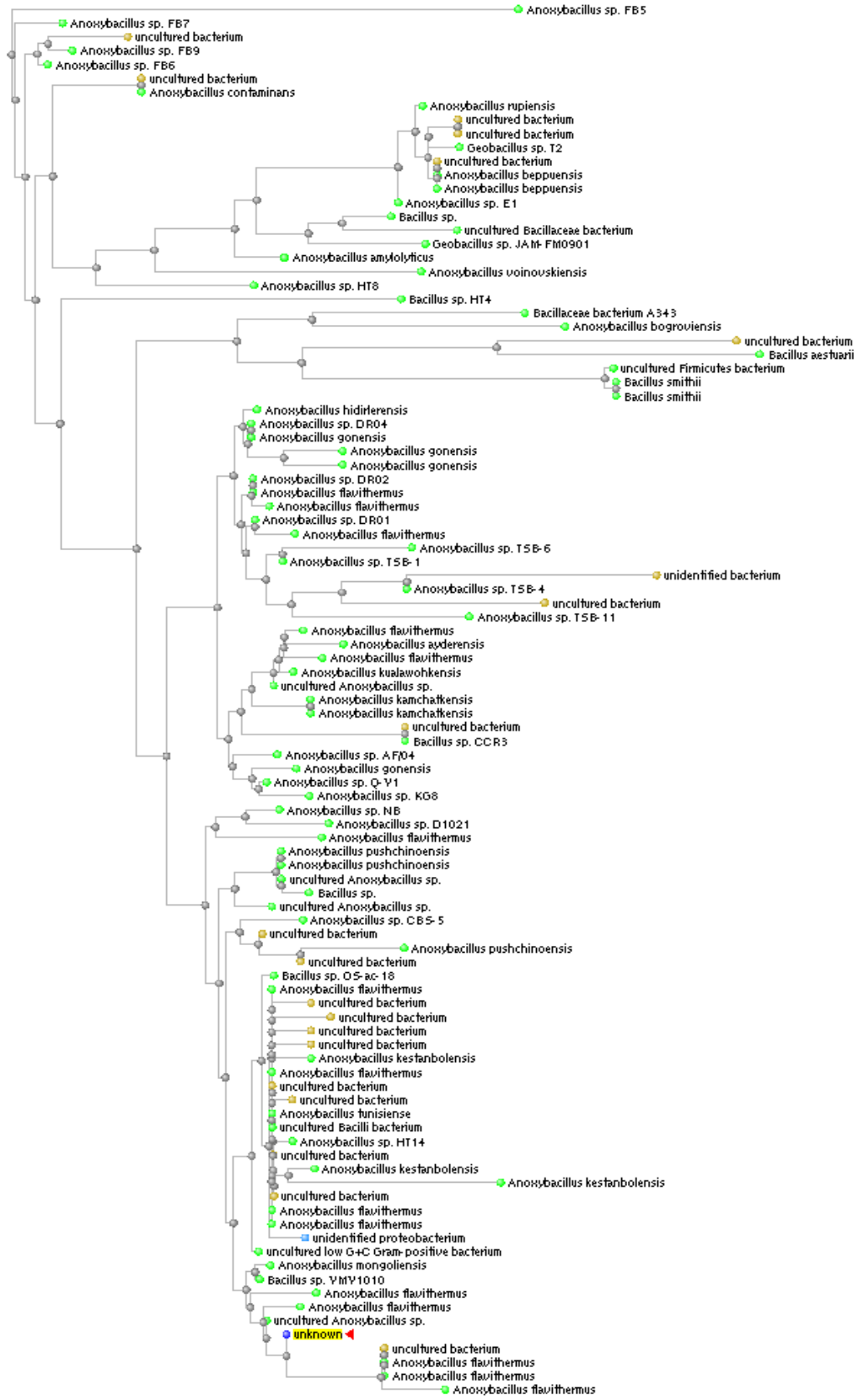
```
5'_GGAGCTGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACGAATCGAAA  
GCTTGCTTTTGATTTCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC  
CTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGAT  
AACACGGAATGTCGCATGACGTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCG  
CTACAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC  
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTG  
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAG  
GCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAGCGCAGT  
AACTGGCGTTACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGGACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGA  
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGATAGTCCAC  
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCT  
GTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGCTCGCAGAGTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGGACATCCCCTGA  
CAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCTCCTTCGGGGGGACAGAGTGACAGGT  
GGTGATGGTTGTTCGTCCGCTCGTGTGTCAGTGGATGGTTAGGTAAGTCCCG  
CAACGGAGCGCAACCCTCGAACTAGTGGCCAGCATTTCAGTTTGGGCACTC  
TTA-3'
```

Tablo 4.11: AH2'nin 1120 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

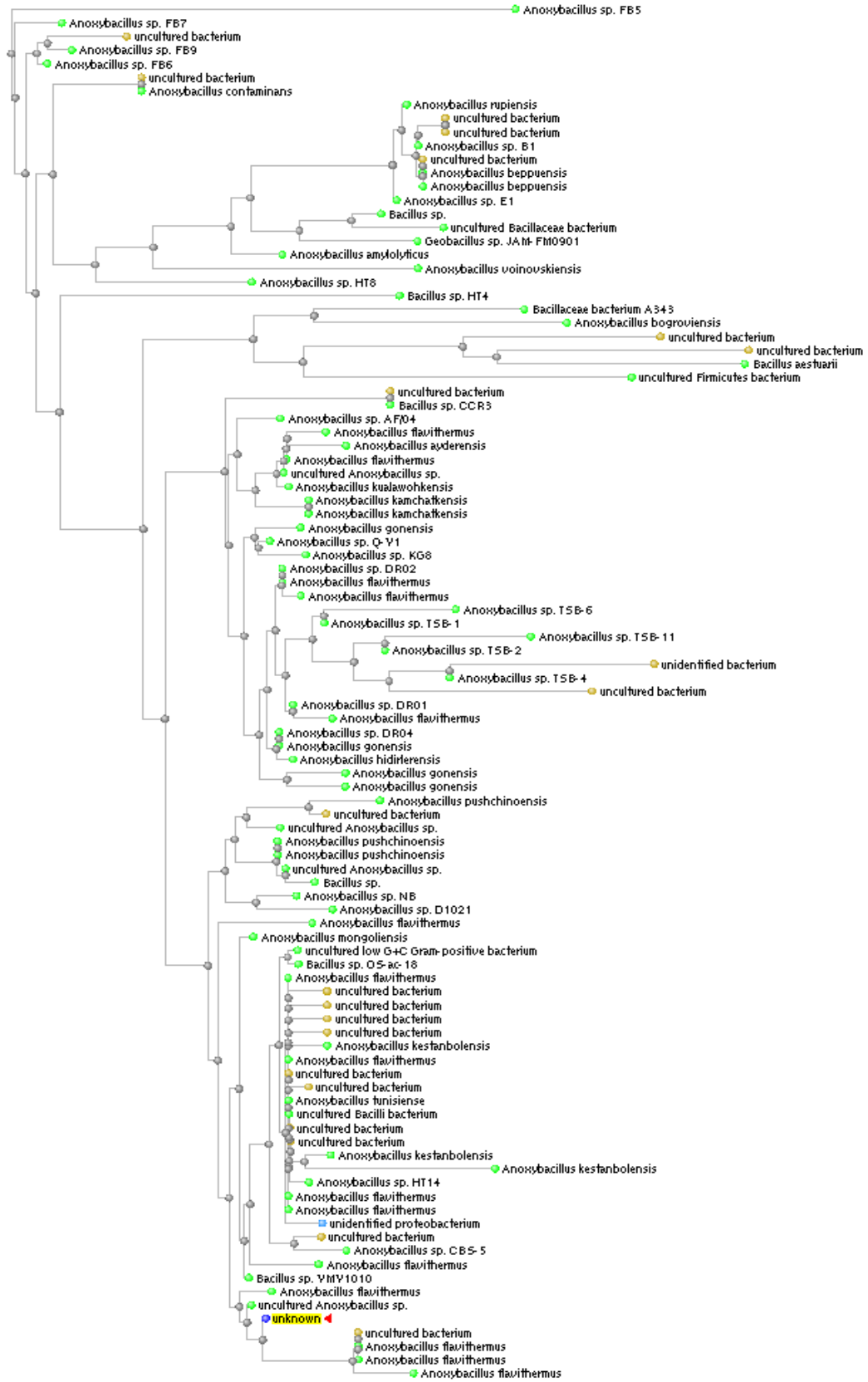
```
5'_GCGAAGCTGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACGAATCGA
AAGCTTGCTTTTGGATTCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGG
ATAACACGGAATGTCGCATGACGTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGT
CGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGA
AGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAGCGCA
GTAAGTGGCGTTACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGC
TGTAAGTAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAGAAGT
GAAACTCAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGCCAGCGGTGGAGCATGTGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAAACCTTACCAGTCTTGACAGCCCTGACAACC
CGAGAGATCGTGCGTTCCCCCTTCGGGGGGGAAAAGGGGAAAGGTGGGT
GCATGTTGTCTTCCCCCGGTTCGGGGAATGTAAGGGTTAGTCCCCCACCG
AGGCAACCTCACTTGATGACATCTTCCGTTGGGCCTCTTT-3'
```

Şekil 4.25: GE2'nin Filogenetik Durumu



Şekil 4.26: AH1'in Filogenetik Durumu



Şekil 4.27: AH2'nin Filogenetik Durumu

KAYNAKLAR

1. Yumoto, I.; Hirota, K.; Kawahara, T.; Nodasaka, Y.; Okuyama, H.; Matsuyama, H.; Yokota, Y.; Nakajima K.; Hoshino, T. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2004**, 54, 1239-1242.
2. Akhmaloka, A.; Suharto, S.; Nurbaiti, I.N.; Tika & F.M. Warganegara. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater, PROC. ITB Eng. Science, **2006**, 38, 1-10.
3. Nazina, T.N.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Novikova, E.V.; Grigoryan, A.A.; Ivanova, A.E.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Osipov, G.A.; Belyaev, S.S.; Ivanov, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearotherophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2001**, 51, 433-446.
4. Sung, M H.; Kim, H.; Bae, J.W.; Rhee, S.K.; Jeon, C.O.; Kim, K.; Kim, J.J.; Hong, S.P.; Lee, S.G.; Yoon, J.H.; Park, Y.H.; Baek, D.H. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2002**, 52, 2251-2255.

5. Nazina, T. N.; Lebedeva, E.V.; Poltarau, A.B.; Tourova, T.P.; Grigoryan, A.A.; Sokolova, D.Sh.; Lysenko, A.M.; Osipov, G.A. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 2019-2024.

6. Schaffer, C.; Franck, W.L.; Scheberl, A.; Kosma, P.; McDermott, T.R.; Messner, P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 2361-2368.

7. Rahman, R.N.Z.R.A.; Leow, T.C.; Salleh, A.B.; Basri, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov. strain T1^T, a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, *BMC Microbiology*, **2007**, 7, 77.

8. Pikuta, E.; Lysenko, A.; Chuvilskaya, N.; Mendrock, U.; Hippe, H.; Suzina, N.; Nikitin, D.; Osipov, G.; Laurinavichius, K. *Anoxybacillus pushchinensis* gen.nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* com. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2000**, 50, 2109-2117.

9. Kuisiene, N.; Raugalas, J.; Chitavichius, D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 1991-1995.

10. Savas, S.; Adıgüzel, A.; Inan, K.; Ozkan, H.; Gulluce, M.; Sahin, F. Molecular characterization of thermophilic bacteria isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal hot spring, *Biotechnological Letters*, **2009**, 14, 4445-4454.

11. DeFlaun, M.F.; Fredrickson, J.K.; Dongc,H.; Pfiffnerd,S.M.; Onstotte, T.C.; Balkwillf, D.L.; Stregerg, S.H.; Stackebrandth, E.; Knoesseni, S.; van Heerden, E. Isolation and characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* strain from an ultra-deep South African gold mine, *Systematic and Applied Microbiology*, **2007**, 30, 152–164.
12. Dulger, S.; Demirbag, Z.; Beldüz, O. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2004**, 54, 1499-1503.
13. Poli, A.; Esposito, E.; Lama, L.; Orlando, P.; Nicolaus, G.; Appolonia, F.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica), *Systematic and Applied Microbiology*, **2006**, 29, 300-307.
14. Kevbrin, V.K.; Zengler, K.; Lysenko, A.M.; Wiegel, J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka, *Extremophiles*, **2005**, 9, 391-398.
15. Derekova, A.; Sjöholm, C.; Mandeva, R.; Kambourova, M. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria), *Extermophiles*, **2007**, 11, 577-583.
16. Gul-Güven, R.; Güven, K.; Poli, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman, *J. Gen Appl.Micbiobol*, **2008**, 54, 327-334.
17. Poli, A.; Romano, I.; Cordella, P.; Orlando, P.; Nicolaus, B.; Berrini, C.C. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermofilic bacterium isolated from

thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy, *Extremophiles*, **2009**,
13,867-874.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dargeçit kaplıcasından iki ve Güçlükonak sıcak su kaynağından da iki tane en iyi üreme özelliği gösteren izolatlar izole edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipit analizi ve 16S rRNA gen dizi analizleri yapılarak tanımlanması yapılmıştır.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin (üreme aralıkları 30-65) termofilik karakterde olduğu tespit edilmiştir.

GE1'in nişasta hidrolizi pozitif, katalaz pozitif ve lipaz pozitif, GE2'nin nişasta hidrolizi pozitif, katalaz pozitif ve kazein hidrolizi pozitif, AH1'in nişasta hidrolizi pozitif, katalaz pozitif, lipaz pozitif ve kazein hidrolizi pozitif, AH2'nin nişasta hidrolizi pozitif, katalaz pozitif, lipaz pozitif ve kazein hidrolizi pozitif olması endüstriyel açıdan önemli enzimlerin kaynağı olmaları açısından önemli kılmaktadır.

GE1 ve GE2'nin morfolojik, fiziksel, biyokimyasal, lipit ve 16S rRNA gen dizi analizleri sonucunda bu türlerin *Geobacillus* cinsinin üyeleri olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde benzer testler sonucunda AH1 ve AH2'in *Anoxybacillus flavithermus*'a % 99 oranında yakınlık gösterdiği görülmüştür.

Bu bakterilerin yeni bir tür mü yoksa bu türlerin yeni bir varyetesi mi olduğu bu testle anlaşılmaz. Morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, lipit analizi ve 16S rRNA gen dizi analizinin yanında ayrıca DNA-DNA hibridizasyonunun da yapılması gerekir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hamşı PİRİNÇÇİOĞLU

Doğum Yeri: Derik

Doğum Tarihi: 23/09/1981

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Fatih Lisesi-2001

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-
2007

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı