

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SICAK SU KAYNAKLARINDAN BAKTERİ İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE *ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS*
SUBSP. *RITTMANI*'NİN β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI

REYHAN GÜL GÜVEN

DOKTORA TEZİ
[BİYOLOJİ ANABİLİM DALI]

DİYARBAKIR
TEMMUZ - 2007

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Reyhan GÜL GÜVEN tarafından yapılan “**Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof.Dr. Bahattin GÜMGÜM

Üye : Prof.Dr. Murat ÖZMEN

Üye : Prof.Dr. Abdunnasır YILBIZ

Üye : Prof.Dr. Birol OTLUDİL

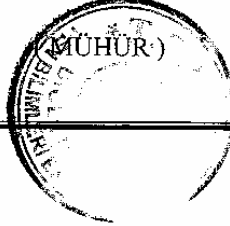
Üye : Prof.Dr. Erhan ÜNLÜ (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 23/07/2007

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

14.10.9/2007
N. Pirinççioğlu
Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇIOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



Değerli eşim Prof Dr. Kemal GÜVEN
ve oğlum Robin'e

TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenen ve tez çalışmam sırasında her türlü yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Erhan Ünlü'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca deneylerimi yaparken bana her konuda manevi destek olan, verilerin değerlendirilmesinde, tez yazımında her zaman desteğini gördüğüm, bilgisinden ve tecrübesinden yaralandığım, eşim Prof. Dr. Kemal Güven'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İtalyanın Napoli Kentindeki Ulusal Araştırma Merkezi (C.N.R.) Biyomoleküler Kimya Enstitüsün'de (ICB) bakterilerin tanımlanması ve enzim saflaştırılması çalışmasını gerçekleştirmem için imkan sağlayan, çalışmalar esnasında bilgi ve tecrübesinden yaralandığım, fikir alışverişinde bulunduğum, her türlü manevi desteğini esirgemeyen, Dr. Barbara NICOLAUS ve Dr. Annarita POLI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Kinon, lipit ve yağ asidi analizi çalışmasında desteğini gördüğüm, İtalyanın Napoli Kentindeki Ulusal Araştırma Merkezi Biyomoleküler Kimya Enstitüsün'de (CNR) Laboratuvar Teknisyeni, Eduardo Pagnotta' ya içtenlikle teşekkür ederim.

Doktora Tez İzleme Komitesi'nde bulunan ve yol gösterici fikirleri ile katkı sağlayan, Sayın Prof. Dr. Bahattin GÜMGÜM ve Sayın Prof. Dr. Birol OTLUDİL'e ayrıca teşekkür ederim.

Doktora çalışması süresince, yoğun çalışmama katlanmak zorunda kalan oğlum Barış Robin GÜVEN'e sabrından dolayı teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, DÜAPK-4-FF-42 ve İtalya C.N.R. Cluster P125 kodlu projeler ile desteklenmiştir. Çalışmanın projeler ile desteklenmesinde yardımlarını esirgemeyen hocam, DÜAPK Yürütücü Sekreteri ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu'na teşekkür ederim.

Reyhan GÜL GÜVEN

İÇİNDEKİLER

AMAÇ.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	v
1.GİRİŞ.....	1
1.2. Bakteri Sınıflandırılması.....	1
2.1.Bakteri Taksonomisinin Tarihçesi.....	1
1.2.1. Endospor Oluşturan Gram-Pozitif Basiller.....	4
1.2.1.1. <i>Bacillus</i> cinsi.....	6
1.2.1.2. <i>Anoxybacillus</i> cinsi.....	12
1.2.1.3. <i>Alicyclobacillus</i> cinsi.....	12
1.3. Bakteri İdentifikasyonu.....	13
1.3.1. Morfolojik özellikler.....	14
1.3.2. Fizyolojik Özellikler.....	14
1.3.3. Biyokimyasal Özellikler.....	14
1.3.4. Genetik Özellikler.....	17
1.3.5. Kinon Analizi	18
1.3.6. Lipit ve Yağ Asitleri Analizi.....	19
1.4. Termofiller ve Biyoteknolojik Açından Önemli Enzimleri.....	21
1.4.1. Termofiller.....	21
1.4.2. Termostabil Enzimler.....	23
1.4.2.1. β -Galaktozidaz.....	25
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	30
3. MATERYAL VE METOD.....	42
3.1.Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	42
3.1.1. İzole Edildikleri Sıcak Su Kaynakları ve Özellikleri.....	42
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimi.....	44
3.1.3. Cihazlar.....	44
3.1.4. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi.....	45

3.1.5. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler.....	46
3.1.6. Lipit Analizi.....	54
3.1.6.1.Fosfolipit Analizi.....	56
3.1.6.1.Fosfo-glikolipit Analizi.....	56
3.1.6.1.Yağ Asidi Analizi.....	56
3.1.7. Kinon Analizi.....	57
3.1.8. rRNA Dizi Analizi.....	58
3.2. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subspecies <i>rittmanii</i> ' nin İntrasellüler β-Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması.....	59
3.2. 1.Kimyasal Maddeler.....	59
3.2.2.Biyolojik Materyal.....	59
3.2.3.Enzim Saflaştırma Aşamaları.....	60
3.2.3.1.Bakterilerin Kültüre Alınması.....	60
3.2.3.2.Enzimin Saflaştırılması.....	61
3.2.3.3. Saflaştırılan Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	64
4.BULGULAR.....	67
4.1.Bakterilerin Optimum Üreme Sıcaklık ve Optimum Üreme PH Değerlerinin Tespiti	67
4.2.Morfolojik Analizler.....	69
4.3.Biyokimyasal ve Fizyolojik Analizler.....	77
4.3.1.Karbon Kaynağının Kullanımı.....	77
4.3.2.Katalaz Testi.....	80
4.3.3.Oksidaz Testi.....	80
4.3.4.Nişasta Hidrolizi.....	81
4.3.5.Kazein Hidrolizi.....	83
4.3.6. Jelatin Hidrolizi.....	85
4.3.7. L-Tirozin Degredasyonu.....	85
4.3.8. Nitrit Redüksiyonu.....	87
4.3.9. Nitrat Redüksiyonu.....	89
4.3.10. Hıppurat Hidrolizi.....	89
4.3.11. Sodyum Azid Duyarlılığı.....	90

4.3.12. Lizozim Duyarlılığı.....	90
4.3.13. NaCl Toleransları.....	91
4.3.14. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	92
4.4. Lipit ve Yağ Asidi Analizi.....	101
4.4.1. Lipit ,Analizi.....	101
4.4.2. Yağ Asidi Analizi.....	124
4.5. Kinon Analizi.....	130
4.6. 16S rRNA Gen Dizilerinden Yararlanarak Bakterilerin Flogenetik Pozisyonlarının Belirlenmesi.....	138
4.7. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subspecies <i>ritmannii</i> 'nin β -Galaktozidaz Enzim Saflaştırılması.....	145
4.7.1. Bakterilerin İntrasellüler β -Galaktozidaz Enzim Üretimi için Kültüre Alınması	145
4.7.2. Enzim Saflaştırma Aşamaları.....	145
4.7.3. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi.....	150
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	156
6. KAYNAKLAR.....	170
7. TABLO LİSTESİ.....	188
8. ŞEKİL LİSTESİ.....	190
9. RESİM LİSTESİ.....	194
10. ÖZGEÇMİŞ.....	196

AMAÇ

Son yıllarda ekstrem şartlarda yaşayan bakterilerin keşfi ve bunların biyoteknolojik açıdan önemli biyomateryalleri üzerinde çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Özellikle, termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler günümüzde gıda ve tekstil dahil bir çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Ülkemiz ve bölgemiz sıcak su kaynakları açısından oldukça zengindir. Bu çalışmanın amacı, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yer alan ve daha önce bakteri identifikasyonu amaçlı çalışmalar yapılmamış olan Kös-Bingöl ve Taşlıdere-Batman sıcak su kaynaklarından termofilik karaktere sahip bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonunu yapmaktır. İdentifikasyonları yapılmış olan bu termofilik bakterilerin yeni tür veya alt tür olup olmadıklarının tespit edilmeleri taksonomik açıdan önem arz etmektedir. Ayrıca Antartica'dan izole edilen ve termofilik bir bakteri olduğu tespit edilen *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin biyoteknolojik öneme sahip β -galaktozidaz enzimini saflaştırmak ve saflaştırılan bu enzimin bazı özelliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

ÖZET

Taşlıdere-Batman ve Köş-Bingöl sıcak su kaplıcalarından izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipid ve yağ asidi içerikleri, kinon tipleri ve 16S rRNA dizi analizleri yapılarak identifikasyonları yapılmıştır. Ayrıca Antartika'dan izole edilmiş diğer bir termofilik basil olan *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin biyoteknolojik öneme sahip olan β -galaktozidaz enzimi saflaştırılmış ve saf enzimin bazı özellikleri çalışılmıştır.

Köş-Bingöl kaplıcasından izole edilen ve KG5 olarak adlandırılan izolat, çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, hareketli ve endosporları oval şekilli sentral konumlu olduğu bulunmuştur. KG5 için üreme sıcaklık aralığı 15-45 °C (optimum 40 °C) olarak bulunduğundan mezofilik karakterde bir bakteri olarak tanımlanmıştır. KG5 birçok özellik bakımından *Bacillus cereus* türüne benzerlik göstermektedir. KG5'in sadece katalaz ve glukoz kullanımının negatif olmasından dolayı *Bacillus cereus*'un diğer varyetelerinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

KG5 ile *Bacillus cereus* türü arasında yağ asidi profili bakımından da benzerlik bulunmuştur. Her iki bakteride de nC16:0 majör yağ asidi, iC15:0 ise ikinci büyük yağ asididir. KG5'te nC18:0 yağ asidinin *B.cereus*'tan çok daha fazla oranlarda bulunmuştur. Ayrıca, KG5'in 16S rRNA dizisi % 100 oranına yakın *B. cereus*'a, % 99.9 oranında *Bacillus thuringiensis*'e ve % 99.8 oranında *Bacillus anthracis*'e benzediği bulunmuştur.

Taşlıdere-Batman kaplıcasından izole edilen ve KG9 olarak adlandırılan izolat çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob ve hareketli, endosporları oval şekilli subterminal konumlu olduğu bulunmuş ve üreme sıcaklık aralığı 30-55 °C (optimum 50 °C) olarak bulunduğundan ılımlı termofil karakterde bir bakteri olarak tanımlanmıştır. KG9 birçok özellik bakımından *Bacillus licheniformis* türüne

benzerlik gösterdiği bulunmuştur. % 15 Oranındaki NaCl' de üreyen KG9' un halotolerant olduğu tespit edilmiştir.Yağ asidi profiline göre KG9 ve *B.licheniformis*'te majör yağ asidi iC15:0'tir. Diğer türlerde tespit edilmeyen yağ asidi nC18:0, KG9'da bulunmuştur. KG9'un 16S rRNA dizisinin % 99 oranında *Bacillus licheniformis*'e benzediği tespit edilmiştir.

Taşlıdere-Batman kaplıcasından izole edilen ve KG8 olarak adlandırılan diğer izolatin çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, hareketli, endosporları oval şekilli subterminal konumlu olduğu bulunmuş ve üreme sıcaklık aralığı 35-65 °C (optimum 55 °C) olarak bulunduğundan ılımlı termofil karakterde bir bakteri olarak tanımlanmıştır.Yağ asidi profilinden KG8 izolatinin *Anoxybacillus* cinsinin üyesi olduğunu ve KG8'in 16S rRNA dizisinin *Anoxybacillus kamchatkensis*' e % 99, *A.flavithermus*, *A. ayderensis* ve *A. gonensis*' e % 98 ve *A. pushchiensis*' e ise % 97 oranında benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur.

KG8 izolatinin 16S rRNA dizi analizine göre %99 oranda benzerlik gösterdiği *A. kamchatkensis*, katalaz negatif, nişasta hidrolizi negatif, optimum üreme sıcaklığı 60 °C iken, KG8, katalaz (+), nişasta hidrolizi (+), ve optimum üreme sıcaklığı 55 °C olarak tespit edilmiştir. İki bakteri arasındaki yüksek oranda 16S rRNA dizi benzerliğine rağmen bu gibi farklılıkların görülmesi KG8'in ayrı bir tür olabileceğini göstermektedir. *A. kamchatkensis* türü ile DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatin yeni bir tür veya alt tür olup olmadığı ortaya çıkacaktır.

Çalışılan bakterilerin lipit analizi yapıldığında ise 3 bakterinin gliko ve fosfolipit ve aminolipitler bakımından basillere benzediği, KG5' in farklı olarak fosfo-gliko lipit içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca tür teşhisinde kullanılan kinon tipleri çalışılmış, tüm çalışılan izolatların menakinon içerdiği ve KG8 için yapılan ileri çalışmada da bu menakinon tipinin MK-7 olduğu bulunmuştur.

Ekstrem şartlara dayanıklı türlerin enzim kaynağı olarak kullanılma

potansiyelleri nedeniyle, Antartika'dan izole edilen ve tür teşhisi daha önce yapılan *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin endüstriyel açıdan öneme sahip intraselüler bir β -galaktozidaz enzimi saflaştırılmış ve enzimin bazı özellikleri çalışılmıştır.

Saf enzim 113 U/mg spesifik aktivite, 163 kat saflaştırma ve % 8'lik bir verimle elde edildi. Km değeri 8.9 mM olarak hesaplandı. Saf enzim için elde edilen optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6.0 ve 65 °C'dir.

FPLC sistemini kullanarak β -galaktozidazın nativ (non-denatüre) molekül ağırlığı 165 kD, denatüre şartlar altında ise 76 kD olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan β -galaktozidaz ın molekül ağırlığına, izole edildiği organizmaya ve afinite kromatografisine bağlanamama veya zayıf bağlanma yeteneğine bakıldığında GH-42 ailesinin bir üyesi olabileceği düşünülmektedir. Jel filtrasyon ve SDS-PAGE yöntemi ile enzimin benzer veya aynı alt ünitelerden (76 kD) oluşan oligomerik (dimer veya trimer; non-denatüre moleküler ağırlık 165 kD) bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada saflaştırılan *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* β -galaktozidazının optimum pH ve sıcaklığının uygunluğu, hem kendiliğinden sentezlenen hem de sentezi artırılabilen (indüklenebilen) özelliklerinden dolayı süt ve peynir altı suyu laktozunun hidrolizinde uygun bir kullanım alanına sahip olabileceğini göstermektedir. Bu enzimin endüstride kullanılabilirliği ileri seviyede test edilmesi gerekmektedir.

KG9'un nişasta ve kazein hidrolizi pozitif, katalaz pozitif, KG5'in kazein ve jelatin pozitif, KG8' in ise nişasta hidrolizi pozitif olması bu bakterilerin endüstriyel açıdan önemli olan enzimlerin (amilaz, proteaz vs.) kaynağı olabileceklerini göstermektedir. Termofilik olmalarından dolayı KG8 ve KG9'un önemi daha da artmaktadır .

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, Bakteri tanımlanması, 16S rRNA, β -Galaktozidaz saflaştırılması

SUMMARY

The morphological, physiological, biochemical characteristics, as well as lipid and fatty acid composition, quinone types and 16S rRNA sequence analyses of bacteria isolated from Taşlıdere (Batman) and Kös (Bingöl) hot springs were carried out in order to identify the isolates. Moreover, β -galactosidase enzyme, which has biotechnological importance, of a thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanni* isolated from Antarctica was purified and some properties of this enzyme were studied.

The isolate named as KG5 isolated from Kös hot spring was rod-shaped, Gram-positive, facultatively anaerobic, motile and endospores are oval and centrally located. KG5 grows at a temperature of 15-45 °C (optimum 40 °C), which has been considered as mesophilic strain. KG5 for its catalase and glucose utilisation being negative was found to be different from other *Bacillus cereus* strains.

The fatty acid profiles of KG5 and *B. cereus* were also found to be similar. In both bacteria, nC16:0 is major fatty acid, while iC15:0 is the second most abundant fatty acid. However, KG5 was found to possess nC18:0 much more than *B.cereus*. Moreover, 16S rRNA sequence of KG5 was similar to *B. cereus* at a ratio of 100 %, *Bacillus thuringiensis* at 99.9 % and *Bacillus anthracis* at 99.8 %.

The isolate named as KG9 isolated from Taşlıdere hot spring was rod-shaped, Gram-positive, facultatively anaerobic, motile and endospores are oval at subterminal location. KG9 grows at a temperature of 30-55 °C (optimum 50 °C), which has been considered as moderately thermophilic strain. KG9 was found to be very similar to *Bacillus licheniformis*. KG9 is a halotolerant strain which grows in 15 % salt. The fatty acid profiles of KG9 and *B. licheniformis* showed that major fatty acid is iC15:0. However, nC18:0 was found in KG9, but not in other *B. licheniformis* strains. 16S rRNA sequence of KG9 was 99 % similar to *B.licheniformis*.

The isolate named as KG8 also isolated from Taşlıdere hot spring was rod-shaped, Gram-positive, facultatively anaerobic, motile and endospores are oval at subterminal location. KG9 grows at a temperature of 35-65 °C (optimum 55 °C) which has been considered as moderately thermophilic strain. The fatty acid profile of KG8 indicated that this strain was a member of *Anoxybacillus* and 16S rDNA sequence of KG8 was found to be similar to *Anoxybacillus kamchatkensis* at a ratio of 99 %, *A. flavithermus*, *A. ayderensis* and *A. gonensi* at 98 % and *A. pushchiensis* at 97 %.

A. kamchatkensis, of which 16S rDNA sequence is 99 % similar to KG8, is catalase-negative, starch hydrolysis-negative and grows at an optimum temperature of 60 °C, while KG8 is catalase (+), starch hydrolysis (+) and grows at an optimum temperature of 55 °C. Although the similarity of 16S rRNA sequence is high for both strains, KG8 is probably different species due to the differences mentioned above. The homology obtained by DNA-DNA hybridisation with *A. kamchatkensis* will reveal whether this isolate is a new species or a subspecies.

The lipid analysis showed that three strains resemble bacilli for their glycolipid, phospholipid and aminolipid content. KG5 possessed phospho-glycolipid, compared to other two strains. In addition, quinone types were studied for identification, which all had MK types. Further investigation showed quinone type for KG8 to be MK-7.

Because of the potential use of extremophile species as enzyme sources, the industrially important, intracellular β -galactosidase of *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* previously isolated from Antarctica was purified and some properties of this enzyme were studied.

The homogenous enzyme had a specific activity of 113 U/mg protein, with a fold purification of 163 and a yield of 8%. The K_m value for ONPG were determined as 8.9mM in the purified β -galactosidase from *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*.

The pH and temperature optima for the purified enzyme are 6.0 and 65 °C, respectively.

The molecular mass of the purified enzyme determined by gel filtration on FPLC (native) and SDS-PAGE (under denatured conditions) was 165 and 76 kDa, respectively. It is clear that the β -galactosidase from *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* is very likely to belong to GH-42, according to its molecular weight, the organism isolated from, and its weak or no binding ability to an affinity column. The results of gel filtration and SDS-PAGE demonstrate that *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* β -galactosidase is oligomeric (dimeric or trimeric; native mass 165 kDa), composed of similar or identical subunits (mass 76 kDa).

The optima of pH and temperature, both constitutive synthesis and inducibility of *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* β -galactosidase indicate that this enzyme may be suitable for hydrolysis of lactose in milk and sweet whey. Further study is needed in order to evaluate *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* β -galactosidase for use in milk and whey processing.

The starch and casein hydrolysis-positive, catalase-positive characteristics of KG9, casein and gelatine hydrolysis positive characteristics of KG5 and starch hydrolysis-positive characteristics of KG8 showed that these strains can be used as sources of industrially important enzymes (amylase, protease etc.). Particularly the thermophilic species, KG8 and KG9 deserve more attention in this regard.

Key Words: *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, Identification, 16S rRNA, β -Galactosidase purification.

1.GİRİŞ

1.1.BAKTERİ TAKSONOMİSİNİN TARİHÇESİ

Mikroorganizmaları ilk mikroskopta gözlemleyen ve şekillerini çizen ve hareketlerini izleyen A. Van Leeuwenhoek'dan sonra, İsveçli bir botanist olan Carl Von Linne bakterileri kendisinin yaptığı bir sınıflamaya dahil etmiş ve ilk defa binominal sistem içinde bunları tanımlamaya çalışmıştır. Bunlardan biri cins diğeri tür ismidir. Danimarkalı bir doğa bilimcisi olan Otto Frederich Müller, 1773' te mikroorganizmaları sınıflandırmaya çalışmış ve kendi sistematüğinde bakteri içeren iki cinse yer vermiştir. 1-Monas:oval ve yuvarlak bakteri türlerini ve 2-Vibrio:uzun formulu olanları içine almaktadır. Mikroorganizmaların morfolojik karakterlerini esas alan bir klasifikasyon F.Cohn tarafından 1872'de yapılmıştır. Bu sınıflamada birçok sporlu bakteriye de yer verilmiştir. Migula, 1897'de, mikropları sadece morfolojilerine göre değil, aynı zamanda koloni rengi ve bazı fizyolojik karakterlerini dikkate alan (nitrojen 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 yayımlamış ve bu eser, "Society of American Bacteriologists" in kurulmasına önderlik etmiştir. Bakterileri modern anlamda ilk olarak sistematize etmek, 1917 yılında Buchanan ile başlamıştır. Başta Buchanan olmak üzere kendinden önce yüzden fazla mikrobiyologun teşviki ve yardımı ile, ilk defa, 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 geliştirilerek 1974'de 8. baskısını yapmıştır. 1984-1986 yıllarında "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" adı altında ve 4 ciltlik bir kitap yayımlanmıştır. Determinative Bacteriology'nin 1994 de 9. baskısı yapılmıştır (ARDA, 2000).

Tarihsel gelişim içinde bakterilere ait bazı kriterler ele alınmış ve bunlara göre bir sınıflandırma çeşitleri ortaya çıkmıştır. Bunlardan bazıları şunlardır:

1-Doğal (filojenik) klasifikasyon: Birbirine benzeyen mikroorganizmaları morfolojik, kültürel, fizyolojik, biyokimyasal, kimyasal, patolojik vs. özelliklere göre bir araya toplayarak sistematize eder.

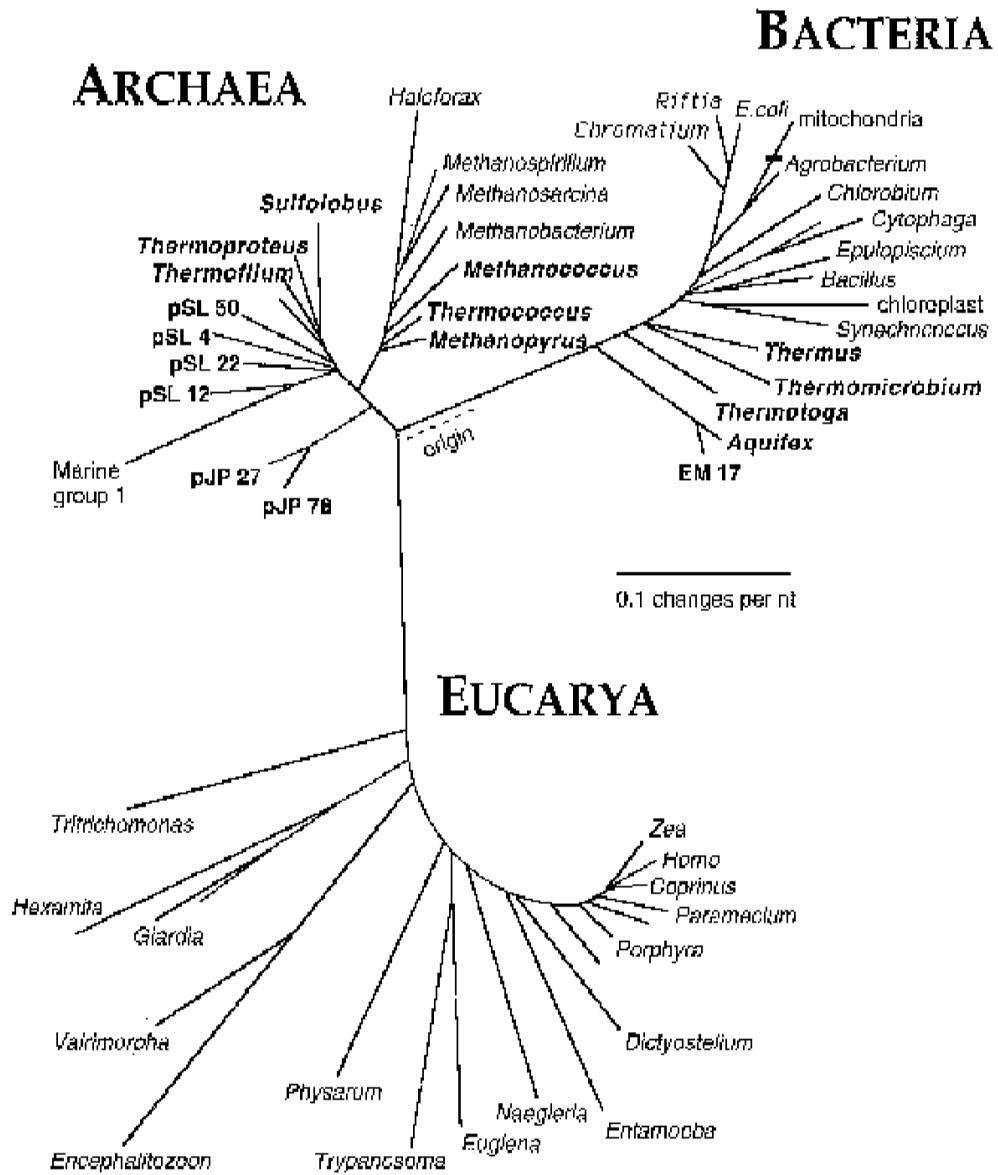
2-Numerik klasifikasyon: Bu sistemde mikroorganizmaların benzeyen ve benzemeyen yönleri değerlendirmeye tabi tutulur, böylece taksonomik uzaklık ortak olan karakterlerin toplam karakterlere oranından hesaplanır.

3-Genetik klasifikasyon: Bakterilerin nükleik asit analizlerini gerektirmekte ve bu işlem için DNA dizi analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu ve G+C oranları dikkate alınarak sınıflandırma yapılır.

4-Kemotaksonomi: Bakterilerin kimyasal yapısını esas alan bu sınıflamada incelenen kimyasal karakterler arasında hücre duvar kompozisyonu, lipit ve yağ asidi kompozisyonu, enzim karakterleri vs. yer alır.

1.2. BAKTERİ SINIFLANDIRMASI

Canlılar 16S rRNA ve 18S rRNA analizlerine göre filogenetik olarak Archaea, Bacteria ve Eukarya olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1.1). Bakterilerin sınıflandırılması, bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi Alem, Bölüm, Sınıf, Takım, Familya, Cins ve Tür esasına göre yapılmaktadır (ÖZÇELİK, 1998).



Şekil 1.1. 16S ve 18S rRNA Tabanlı Canlıların Filogenetik Analizi (FUJIWARA, 2002)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabında bakteriler fenotipik özelliklerine göre 4 büyük kategoriye ayrılmışlardır (HOLT ve ark. 1994).

I. Hücre duvarına sahip Gram-negatif Eubacteria

II.Hücre duvarına sahip Gram-pozitif Eubacteria

1.Grup: Gram-pozitif koklar

2.Grup: Endospor oluşturan Gram-pozitif basiller (çubuklar) ve koklar

3.Grup: Düzenli, sporsuz, Gram-pozitif çubuklar

4.Grup: Muntazam olmayan, sporsuz, Gram-pozitif çubuklar

5.Grup: Mycobacteria

6.Grup: Actinomycetes

III.Hücre duvarına sahip olmayan Eubacteria

IV.Archaeobacteria

Bu çalışmada izole edilen, tanımlanan ve enzimi çalışılan bakteriler, 2. Kategorinin endospor oluşturan Gram-pozitif basiller içeren 2. grubuna dahil olduğundan bu kategori üzerinde durulacaktır.

1.2.1. Endospor Oluşturan Gram-pozitif Basiller

Önemli Özellikleri: Sıcaklığa dirençli endospor üretirler. Hareketli çubuklar veya filamentlidirler. Genellikle gram-pozitiflerdir. Zorunlu aerob, fakültatif anaerob veya zorunlu anaeroblardır.

Tablo 1.1. Gram-pozitif aerob endospor oluşturan bakterilerin (AEOB), cins içerisindeki tür sayısına ve 16S rRNA/DNA dizilerine göre sistematik pozisyonu (FRITZE, 2004)

<u>Sistematik Pozisyon</u>	<u>Tür/Alttür sayısı</u>
Domain <i>Bacteria</i>	
Filum BXIII. <i>Firmicutes</i> phy. nov.	
Sınıf III. <i>Bacilli</i>	
Ordo I. <i>Bacillales</i> AL	
Familya I. <i>Bacillaceae</i> AL	
Cins I. <i>Bacillus</i> AL	88/2
Cins II. <i>Amphibacillus</i> VP	3
Cins III. <i>Anoxybacillus</i> VP	3
Cins IV. <i>Exiguobacterium</i> VP	
Cins V. <i>Filobacillus</i> VP	1
Cins VI. <i>Geobacillus</i> VP	10
Cins VII. <i>Gracilibacillus</i> VP	2
Cins VIII. <i>Halobacillus</i> VP	5
Cins IX. <i>Jeotgalibacillus</i> VP	1
Cins X. <i>Lentibacillus</i> VP	1
Cins XI. <i>Marinibacillus</i> VP	1
Cins XII. <i>Oceanobacillus</i> VP	1
Cins XIII. <i>Paraliobacillus</i> VP	1
Cins XIV. <i>Saccharococcus</i> VP	
Cins XV. <i>Salibacillus</i> VP	–
Cins XVI. <i>Ureibacillus</i> VP	2
Cins XVII. <i>Virgibacillus</i> VP	7
Familya II. <i>Alicyclobacillaceae</i>	
Cins I. <i>Alicyclobacillus</i> VP	8/2
Cins II. <i>Pasteuria</i> AL	3
Cins III. <i>Sulfobacillus</i> VP	3
Familya III. <i>Caryophanaceae</i> AL	
Cins I. <i>Caryophanon</i> AL	
Familya IV. <i>Listeriaceae</i>	
Cins I. <i>Listeria</i> AL	
Cins II. <i>Brochothrix</i> AL	
Familya V. <i>Paenibacillaceae</i>	
Cins I. <i>Paenibacillus</i> VP	45/2
Cins II. <i>Ammoniphilus</i> VP	2
Cins III. <i>Aneurinibacillus</i> VP	3
Cins IV. <i>Brevibacillus</i> VP	11
Cins V. <i>Oxalophagus</i> VP	
Cins VI. <i>Thermicanus</i> VP	
Cins VII. <i>Thermobacillus</i> VP	1
Familya VI. <i>Planococcaceae</i> AL	
Cins I. <i>Planococcus</i> AL	
Cins II. <i>Filibacter</i> VP	

Cins III. <i>Kurthia</i> AL	
Cins IV. <i>Planomicrobium</i> VP	
Cins V. <i>Sporosarcina</i> AL	3
Familya VII. <i>Sporolactobacillaceae</i>	
Cins I. <i>Sporolactobacillus</i> AL	5/2
Cins II. <i>Marinococcus</i> VP	
Familya VIII. <i>Staphylococcaceae</i>	
Cins I. <i>Staphylococcus</i> AL	
Cins II. <i>Gemella</i> AL	
Cins III. <i>Jeotgalicoccus</i> VP	
Cins IV. <i>Macrococcus</i> VP	
Cins V. <i>Salinicoccus</i> VP	
Familya IX. <i>Thermoactinomycetaceae</i>	
Cins I. <i>Thermoactinomyces</i> AL	6
Famillya X. <i>Turicibacteraceae</i>	
Cins I. <i>Turicibacter</i> AL	.

Nükleik asit dizileri “Taxonomic Outline of Bergey’s Manual”den alınmıştır.

AL kabul edilen listelerde yer alan isimlerdir.

VP yayınlanan kabul gören isimlerdir. Kalın harflerle gösterilenler spor oluşturan cinslerdir.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed. 2001)'de “Basiller” Ordo *Bacillales*, Familya *Bacillaceae* ve buna bağlı *Bacillus* ve birkaç yeni cins şeklinde sınıflandırılmıştır. Tablo 1.1’ de görüldüğü gibi 16S rRNA dizi analizleri baz alınarak yapılan en son sınıflandırmada endospor oluşturan basiller *Bacillaceae* ve *Alycyclobacillaceae* familyaları dahil 10 familyaya ayrılmıştır. *Bacillus* ve *Anoxybacillus* gibi çok sayıda cins *Bacillaceae* familyası içerisinde yer alırken *Alycyclobacillus* cinsi ise *Alycyclobacillaceae* familyasına dahil edilmiştir (FRITZE, 2004). Tablo 1.1’ de altı çizili olan cinslerden *Bacillus*, *Anoxybacillus* ve *Alycyclobacillus* bu çalışmada izole edilen veya enzim saflaştırma amacıyla kullanılan varyeteleri kapsadığından özellikleri burada detaylı olarak açıklanacaktır.

1.2.1.1. *BACILLUS* CİNSİ

Cohn tarafından 1872’de belirlenen *Bacillus* cinsi çok büyük taksonomik değişikliklere uğramıştır. İlk önce endospor oluşturan *Bacillus anthracis* ve *Bacillus subtilis* başta olmak üzere bu cinse yerleştirilen tür sayısı Bergey's Manual of Determinative Bacteriology’ nin 5. baskısında (1939) 146’ ya ulaşmıştır. 1974’ te

yayınlanan 8. baskıda ise bu sayı 22 iyi tanımlanmış türe indirgenmiştir. İlk önceleri *Bacillus* cinsinin sınıflandırması aerobik çoğalma ve endospor oluşturma gibi iki özelliğe dayanıyordu. Son yıllarda fizyolojik biyokimyasal ve genetik özelliklerin ortaya çıkarılmasında daha yeni ve daha gelişmiş metodların karakterizasyon ve teşhis amaçlı kullanılması gündeme gelmiş, özellikle 16S rRNA dizi analizlerinden yararlanılmaktadır. Dizi analizi özellikle birçok türü *Bacillus* cinsinden ayırarak yeni cinslerin oluşumuna yol açmıştır. Günümüzde *Bacillus* cinsi aerobik endospor oluşturan birçok cinsten birisini teşkil etmektedir. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' nin 2. baskısında (2003), 16S rRNA/DNA dizi benzerliklerine göre *Bacillus* cinsinin en yakın komşuları gösterilmiştir (Tablo 1.1). Tablo 1.1' de spor oluşturan cinsler koyu renkle belirtilmiştir. Aerobik ve spor oluşturan bakterilerin 25 cinsi ve 200 ü aşkın türü 2003' te yayınlarla tespit edilmiştir (FRITZE, 2004).

Bacillus türlerinin doğadaki eşsizliği, kimyasal ve fiziksel ajanlara endosporlarının anormal derecede dirençliliği, antibiyotik üretimi, protein yapısındaki toksinlerin böcekler için toksik etki yapması ve patojen olmalarından kaynaklanmaktadır. *Bacillus* türleri laboratuarda kolayca çoğaltılabilir. En basit teknik, aerobik spor oluşturan türleri 80 °C'de 15 dakika muamele ettikten sonra nutrient broth ve agar üzerinde (24 saat inkübasyon) elde etmektir. *Bacillus* türleri genelde katalaz-pozitif, Gram-pozitif, endospor oluşturan basillerdir. Toprakta izole edilen birçok bakteri *Bacillus* cinsi üyeleridir ve bunların toksik bileşiklerin parçalanması ve uzaklaştırılmasında kullanılabilirliği de araştırılmıştır (CHAO ve HSU, 2004)

Termofilik basiller, sıcaklıkla muamele edilmiş besin ürünlerinin kontaminantları olarak düşünülse de esas potansiyelleri proteaz, amilaz, lipaz ve DNA restriksiyon enzimleri gibi termostabil enzimlerin kaynağı olarak öneme sahiptirler. Termofilik basiller 1994 yılında iki cins halinde (*Bacillus* ve *Alicyclobacillus*) sınıflandırılmaktaydı ve türlerin çoğu *Bacillus* cinsi içerisinde yer almaktaydı (RAINEY ve ark. 1994).

Bacillus cinsi aerobik fakültatif anaerobik çubuk şekilli gram pozitif endospor oluşturan bakterileri içine alan büyük ve çeşitlik arz eden bir koleksiyonu kapsar.

Bacillus cinsi, termofilik, psikrofilik asidofilik, alkalofilik tatlı su ve halofilik türleri kapsadığı gibi, hetetrofik büyüme için değişik karbon kaynaklarını kullanabilen bakterileri de kapsar.

2001 yılında 7 filogenetik grup *Bacillus* cinsinden ayrı olarak tekrar sınıflandırılmıştır: *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus* ve *Gracilibacillus*. Tespit edilen termofilik türlerin 16S rRNA dan yola çıkarak gruplandırılmış, *Bacillus* cinsi genetik olarak 1. ve 5. gruba dahil edilmiştir (NAZINA ve ark., 2001).

Son yıllarda *Bacillus* cinsinin endospor oluşturan termofilik üyeleri üzerinde ilgi artmıştır. Bu ilginin sebebi sıcak yiyeceklerde kontaminasyonlara sebep olmaları, termostabil enzimlerin kaynağı olmaları ve endüstride biyoteknolojik ürün üretiminde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır. İzolatların fenotipik ve genotipik çeşitliliklerinden dolayı karakterizasyonları ve tanımlanmalarında büyük zorluklarla karşılaşmaktadır (MORA ve ark. 1998).

Çok sayıda farklı metod, *Bacillus* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır. Antibiyogram, plazmid tiplendirilmesi, hücresel yağ içeriği analizi, küçük alt ünite 16S rRNA dizisinin karşılaştırılması ve genom analizi teşhis için kullanılan metotlardandır (BERBER, 2004).

Bacillus cinsinin mezofilik ve termofilik üyelerinin tanımlanması analizler sonunda ortaya çıkan benzerliklerden dolayı oldukça güç olmuştur. Örneğin *Bacillus cereus* grubunu ayırt etmede fizyolojik, morfolojik, yağ asidi ve 16S rRNA analizi yeterli olmamıştır. Tam bir teşhis için DNA-DNA homolojisi ve GC içeriğinin belirlenmesi gerekir (KRIEG, 1970; SHARP ve ark., 1980; PRIEST ve ark., 1988; SHINAGAWA, 1990).

Bacillus cinsinin iki seçilmiş grubu taksonomik açıdan dikkati çekmiştir. Bu gruplar *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* grubudur. Bu bakteri türlerinin bazılarının toksin ürettikleri bulunmuştur. *B.licheniformis* ve *B.cereus* endüstride işlenen gıdaların ve kliniklerin en iyi bilinen kontaminantlarıdır (DE CLERCK ve DE VOS, 2002).

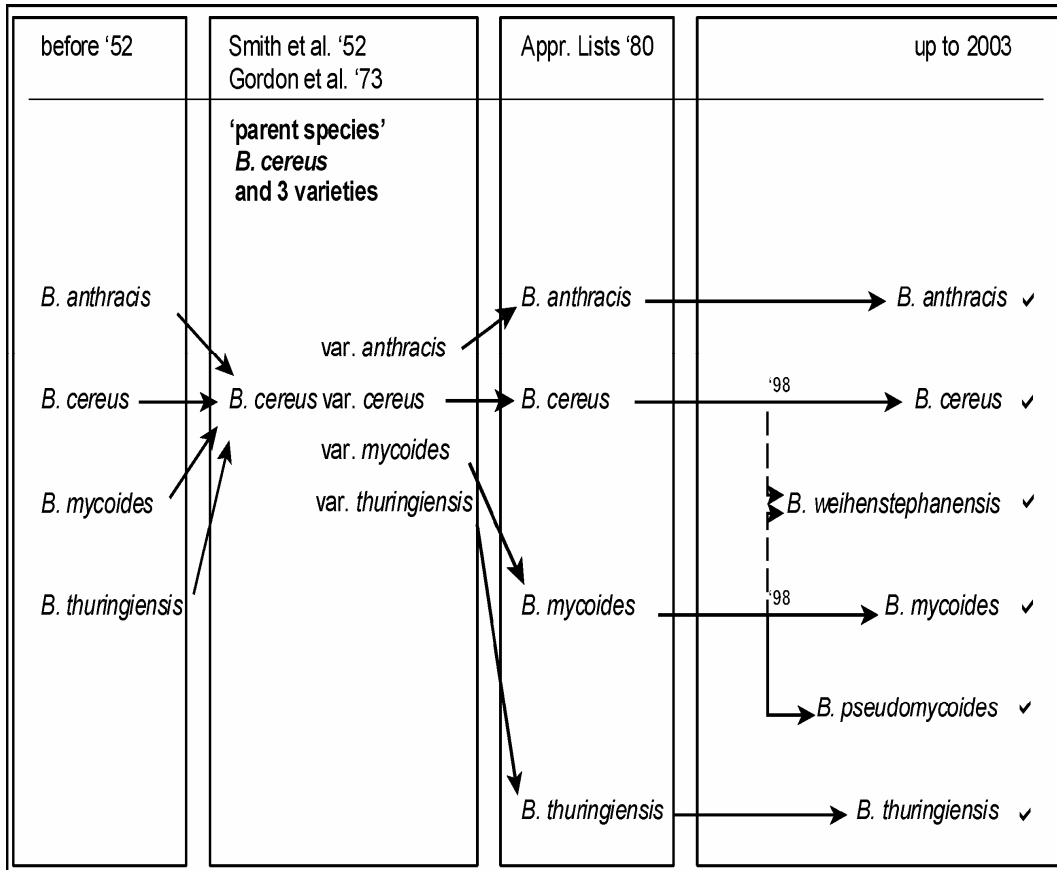
Bacillus cereus: *Bacillus cereus*, spor oluşturan vejetatif formlardır. Çevrede fazla miktarda bulunmaktadırlar (toprak, toz, sebze, süt ve süt ürünlerinde, ette, işlenmiş yiyeceklerde ve mineral içme sularında). Üreme sıcaklıklarına göre, *B. cereus* 'u iki gruba ayırmak mümkündür; psikrofilik ve mezofilik. *B. cereus*'un bazı varyeteleri 5 °C gibi düşük sıcaklıklarda ürerken, diğerlerinin ise 15-50 °C arasında üredikleri görülmüştür (HAQUE ve RUSSELL, 2005) .

B. cereus grubu üyeleri aerobik endospor oluşturan bakterilerin diğer üyelerinden kolayca ayırt edilmesine rağmen kendi aralarında fenotipik ve genotipik olarak yakın akraba olduklarından kolayca ayırt edilememektedirler (MANZANO ve ark. 2003). Bu bakteriler mezofilik ve nötrofiliktirler. *B. cereus* ve *Bacillus thuringiensis* genelde hareketli, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus mycoides* ise penisiline dirençlidir. Bu türlerin tip varyeteleri arasında DNA-DNA hibridizasyonları % 50-60 gibi tatmin etmeyen benzerlikler göstermiştir ve 16S rRNA dizilerinin bazıları hemen hemen aynıdır. Şekil 1.2' de bu grubun taksonomik gelişimi görülmektedir. Bu grup içerisinde patojenik risk oluşturan *B. anthracis* ve *B. cereus* yanında zararsız toprak bakterisi olan *B. mycoides* ve bitki zararlılarını kontrol etmek için toksinleri kullanılan *B. thuringiensis* de vardır. Bazı *B. cereus* varyeteleri hayvan yemlerine katılarak büyümeyi artırıcı olarak kullanılmaktadır. *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* bir türün alttürleri olarak ele alınması gerektiğini savunanların yanında, bunların ayrı ayrı ele alınması gerektiğini savunanlar da vardır (FRITZE, 2004; PIRTTIJARVI ve ark. 2000; MANZANO ve ark. 2003).

B. thuringiensis ve *B. cereus*'un diyare toksinlerini ürettiği ve besin zehirlenmesinde etken oldukları tespit edilmiştir. Dolayısıyla besin endüstrisinde öneme sahiptirler. *B. anthracis* ile *B. cereus* grubunun basilleri fenotipik özelliklerine dayalı ticari veri bankalarını kullanan araştırmacılar *B. cereus*'un yanlışlıkla *B. anthracis* olarak tanımlanabileceğini ifade etmişlerdir (PIRTTIJARVI ve ark., 2000). Son zamanlarda farklı tekniklerle bu iki türü ayırt etmek kolaylaşmıştır (WANG ve ark. 2004).

Gram pozitif bakterilerde, örneğin basillerde, esas fosfolipitler genelde fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol ve difosfatidilgliserol bulunur, ancak oranları

aynı cinsin farklı türleri arasında değişebilmektedir. Fosfolipitler, *B. cereus*'un esas elemanları olduğu bulunmuştur. Ayrıca fosfatidilkolin, fosfatidilserin fosfatidil asit, fosfatidilinositol vb. yağları eser miktarlarda içerdikleri bulunmuştur. Esas yağlar tüm *B. cereus* varyetelerinde bulunmasına rağmen eser miktarlarda olanlar değişiklik göstermektedir. Bu da yağların ayırt edilmede kullanılmasını güçleştirmektedir. Yağ asidi analizi *Bacillus* dahil yeni bakteri tanımlamada faydalı bir yöntemdir. Birçok araştırmacı dallı iso ve anteiso 12-17 karbonlu yağ asidinin dominantlığını tüm *Bacillus* türlerinin genel karakteristiği olduğunu gözlemişlerdir. *B. cereus*'un yağ asidi içeriği n14:00, i14:00, a15:00, i15:00, n16:00, i16:00, a17:00 ve i17:00 (i15:00, a15:00' e göre daha fazla bulunmaktadır (Kaneda, 1977). Dallı zincirli yağ asitlerin toplam yağ asitlerinin % 60'ını oluşturduğu bulunmuştur (HAQUE VE RUSSELL, 2005).



Şekil 1.2. *Bacillus cereus* grubunda taksonomik gelişme (FRITZE, 2004)

vallismortis fenotipik olarak birbirinden ayırt edilemiyor ve aynı zamanda *B. licheniformis* ve *B. sonorensis* de birbirinden ayırt edilememektedir. *B. subtilis* grubunun taksonomik gelişimi Şekil 1.3' te sunulmuştur (MANZANO ve ark. 2003; FRITZE, 2004).

Bütün *B. licheniformis* varyeteleri genelde 55 °C de ve %12 ye kadar olan NaCl konsantrasyonlarında ürerler (YAKIMOV ve ark., 1997). *B. licheniformis*'in anaerobik büyüme kabiliyetinde olduğu ve kinon olarak yalnız menakinon ihtiva ettiği iyi bilinmektedir (GOODMAN ve ark. 1976) .

1.2.1.2. ANOXYBACILLUS CİNSİ

Bu cins ilk kez 2000 yılında Pikuta ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. *A. pushchinoensis* DSM12423T cinsin ilk tanımlanan türüdür. *Anoxybacillus* cinsinin üyeleri daha önce *Bacillus* cinsi içerisinde yer almaktaydı. Tablo 1.1' de görüldüğü gibi *Anoxybacillus* aerobik endospor oluşturan bakteri olarak *Bacillus*'tan farklı bir cins olarak tanımlanmıştır. Cins, *A. gonensis*, *A. flavithermus*, *A. contaminans*, *A. voinovskiensis*, *A. ayderensis*, *A. kestanbolensis*, *A. pushchinoensis* adında yedi tür içermektedir (POLI ve ark., 2006). Tanımlanan tüm *Anoxybacillus* türleri genellikle termofilik, Gram-pozitif, spor oluşturan basil şekilli bakterilerdir.

1.2.1.3. ALICYCLOBACILLUS CİNSİ

1992 yılına kadar bu cinsin üyeleri *Bacillus* cinsi adı altında yer almaktaydı. 16S rRNA analizi ve *Alicyclobacillus*'lara özgü aromatik halkalı yağ asidi bulunuşu yeni bir cinsin ortaya çıkmasına neden olmuştur (PETTIFER ve ark., 1997). Son çalışmalara göre *Alicyclobacillus* cinsi üyelerinin sistematikteki yeri Tablo 1.1' de verilmiştir.

Alicyclobacillus; patojen olmayan, spor oluşturan ve meyve sularının bozulmasına yol açtıkları tespit edilen bakterilerdir. Bu spor oluşturan toprak

mikroorganizması, meyve suyu endüstrisinde özellikle elma, armut, portakal, şeftali, domates suyu ve beyaz üzüm sularında bozulmalara yol açtığı gözlenmiştir. Sporlar pastörizasyona dayanarak bozulmalara yol açmaktadır. Termoasidofilik bakteriler özellikle *Alicyclobacillus terrestris* İngiltere ve Almanya'da son yıllarda meyve suyu bozulma olaylarında rol aldıkları bilinmektedir. *A. acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus pomorum*, *Alicyclobacillus sendaiensis*. *Alicyclobacillus* cinsine ait türlerdir. (NICOLAUS ve ark. 1998)

***Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*:**

A. acidocaldarius

subsp. *rittmannii*, ilk kez BROCK (1971) tarafından tanımlanan ve daha sonra WISOTZKEY ve ark. (1992) tarafından tekrar isimlendirilen ve *Alicyclobacillus* cinsi içerisine yerleştirilen *A. acidocaldarius* türüne ait bir alt türdür. *Alicyclobacillus* cinsine ait bu alt tür Antartika'da ayak basılmamış bir bölgedeki toprak numunelerinden izole edilerek MR1 varyetesi olarak isimlendirilmiştir. Bu izolat, terminal bir sikloheksan ihtiva eden yağ asitleri içeren lipitler ihtiva etmektedir. Ayrıca bu varyetenin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genotipik özellikleri detaylı olarak çalışılmıştır (NICOLAUS ve ark. 1998; GÜVEN, 2004).

1.3. BAKTERİ İDENTİFİKASYONU

Mikrobiyolojide identifikasyon, izole edilmiş bir mikroorganizmanın cins ve türünün belirlenmesidir. Bakteri identifikasyonu için morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, genetik analizler, kinon, lipit ve yağ asidi analizleri yapılmaktadır.

1.3.1. Morfolojik özellikler

Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının küçük olmaları nedeniyle mikroskopik olarak incelenirler. Uygun sıvı ve katı besi yerlerinde üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar faz kontrast mikroskopuyla direkt veya özel boyalarla boyanarak incelenirler. Bakteri hücrelerinin şekil (kok, çubuk, spiral ve virgül), büyüklük, diziliş (küme, zincir vs.), spor durumu (var veya yok, terminal, santral vs.) ve boyama özellikleri (Gram boyama) onların morfolojik özelliklerini oluşturmaktadır. Hücrenin dış görünüşüne ait olan bu özellikler yanında mikroskop altında hareket muayenesi de yapılabilmektedir (HOLT ve ark., 1994).

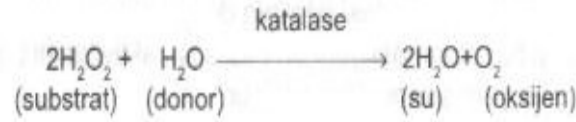
1.3.2. Fizyolojik Özellikler

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

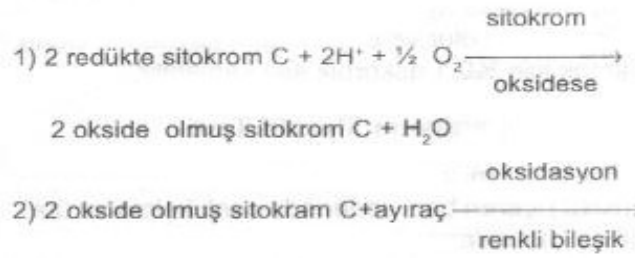
1.3.3. Biyokimyasal Özellikler

Mikroorganizmaların identifikasyonlarında biyokimyasal aktivitenin belirlenmesinin önemi çok fazladır. Bu amaçla, çok değişik testler kullanılır. Bunlar arasında, nişasta, jelatin, katalaz, üre, oksidaz, nitrat ve nitrit redüksiyonu, karbonhidrat kullanımı gibi testler, mikroorganizmaların türüne göre seçilerek kullanılır (Arda, 2000). Örneğin *Bacillus* cinsi için hareketlilik, katalaz, oksidaz, nitratın nitrite redüksiyonu, %3-12 NaCl konsantrasyonlarında üreme identifikasyonda kullanılan önemli testlerdir (HOLT ve ark., 1994; ALEXANDER ve STRETE, 2001) .

KATALAZ TESTİ: Bakteri hücreleri aerobik solunum esnasında hidrojen peroksit üretirler. Hidrojen peroksit hücrede biriktiğinde toksik etki yapar. Bu nedenle aerobik ve fakültatif bakteriler hidrojen peroksidi parçalayan katalaz enzimine sahiptirler (ALEXANDER ve STRETE, 2001). Katalaz testi aşağıdaki reaksiyona dayanmaktadır.

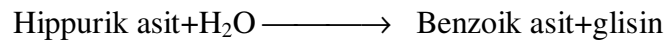


OKSİDAZ TESTİ: Elektron taşıma zinciri bakteriyel hücre solunumunun son aşamasını temsil eden reaksiyon dizisidir. Son reaksiyon sitokrom oksidaz enzimi tarafından katalizlenir (ALEXANDER ve STRETE, 2001). Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidaz enziminin varlığını ortaya koymada kullanılmaktadır. Kullanılan ayırıcın oksitlenmesiyle renkli bileşik oluşur. Oksidaz reaksiyonu sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade etmektedir. Anaerobik mikroorganizmalarda oksidaz sistemi yoktur (ARDA, 2000). Oksidaz testi aşağıda verilen reaksiyonlara dayanır.



HİPPURAT TESTİ: Bakterilerce sentezlenen hippurat hidrolaz enzimi yardımıyla sodyum hippuratı aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi hidrolize ederek benzoik asit ve glisine ayrıştırır. Bazı bakteri tiplendirmesinde kullanılmaktadır.

Hippurat hidrolaz

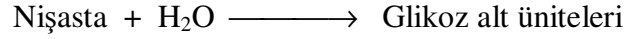


Hidrolizasyon

NİŞASTA HİDROLİZİ: Nişasta α - D-glikoz ünitelerinin tekrarından oluşmuş bir polisakkarittir. Bu test, bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrasellüler bir enzim olan amilazın hidrolizasyon işlemini ortaya koymak amacı ile

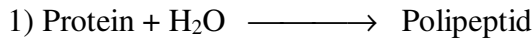
yapılmaktadır (ALEXANDER ve STRETE, 2001; ARDA, 2000).

α -amilaz



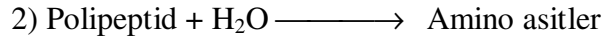
JELATİN HİDROLİZİ: Bu test mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Jelatin, jelatinaz olarak adlandırılan ekstraselüler enzim tarafından parçalanan bir proteindir. Proteinler aminoasitlere parçalandıktan sonra hücre içerisine alınırlar (ALEXANDER ve STRETE, 2001; ARDA, 2000).

Jelatinaz



Proteinaz

Jelatinaz



Peptidaz

KAZEİN HİDROLİZİ: Bu test, süt proteini olan kazeinin bakterilerce sentezlenen (örneğin *B. cereus*'ta), proteolitik ve ekstraselüler bir enzim olan kazeinaz tarafından hidrolize edebilme durumunu saptamak için kullanılmaktadır (ALEXANDER ve STRETE, 2001; ARDA, 2000).

Kazeinaz

Kazein \longrightarrow Aminoasitler (petri üzerindeki kolonilerin etrafında oluşan şeffaf alan) (Beyaz)

NİTRAT REDÜKSİYON TESTİ: Bu test bakterilerin nitratı indirgeme yeteneğini belirlemede kullanılan bir testtir. Olay anaerobik koşullarda ve redüktaz enzimlerinin katalitik etkisiyle sürdürülür. Bakteriler nitratları nitritlere hatta daha ileri amonyak ve azot gazına kadar ayrıştırabilmektedir.

1.3.4. Genetik Özellikler

Tam bir tür teşhisi için morfolojik ve fizyolojik testler tek başına yeterli değildir. Bakteri klasifikasyonunda kullanılan metotlar (fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik) çok zahmetli olduğundan bir çok yeni metotlar geliştirilmeye çalışılmıştır. Doğru teşhis için genetik analizlerin de yapılması gerekmektedir (FOLMSBEE ve ark., 2006).

Bakterilerin genetik materyalleri, kompozisyon bakımından farklar gösterir. 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 ayırımında kullanılmaktadır. Genetik yönden yakınlıkları saptamada, genelde 16S rRNA dizi tespiti, bu dizilerin veri bankasındaki mevcut dizilerle karşılaştırılması ve DNA homolojisinin belirlenmesi (DNA/DNA hibridizasyonu) önem taşımaktadır (ARDA, 2000).

Bacillus cinsi çok değişik besinsel ihtiyaçlara, fizyolojik ve metabolik çeşitliliğe ve DNA baz kompozisyonuna sahip fenotipik olarak heterojen türleri kapsar. 1988 yılında bir çok karakterin değerlendirildiği nümerik sınıflandırmayla 368 *Bacillus* varyetesi 79 gruba dahil edilmiştir. Bu tarihlerde rRNA dizileri, tüm organizmalarda mevcut olması nedeniyle ve nükleotid değişikliklerin evrimsel süreçte gerçekleştiğinden, filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmak için en faydalı moleküler kronometre olarak kullanılmaya başlanmıştır (XU ve COTE, 2003).

16S rRNA dizi analizine göre % 97'den daha düşük dizi benzerliğine sahip olan iki organizmanın büyük bir olasılıkla % 70'den daha az DNA-DNA homolojisi gösterir ve bu iki organizma birbirinden farklı türler olarak değerlendirilir

(STACKEBRANDT ve GOEBEL, 1994; DE CLERCK ve DE VOS, 2002). Buna rağmen, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis* % 100 16S rRNA dizi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bundan dolayı, 16S rRNA dizi analizinin tek başına bu türleri tanımlamak için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (ASH ve ark, 1991).

Bakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA dizi benzerliği analizinin yanı sıra, PCR yardımıyla bakterilerin özel plazmidlerinde bulunan genlerin belirlenmesi, Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), toplam hücresel protein profili metotları da kullanılır. Bu yöntemlerle aynı zamanda *Bacillus* cinsi ve yakın cinslerde tür ve alt tür seviyelerinde prokaryotik çeşitliliği araştırılmıştır (XU ve COTE, 2003; RUDI ve ark. 2007; WANG ve ark. 2004; HAQUE ve RUSSELL, 2005; LOPEZ ve ALIPPI, 2007)

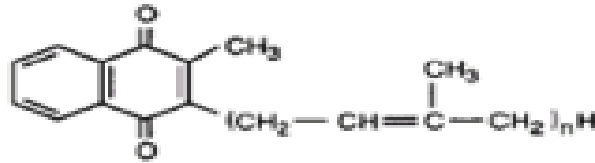
1.3.5. Kinon analizi

İzoprenoid kinonlar bakterilerin plazma membranlarında yer alırlar ve elektron taşıma sisteminde önemli bir rol oynarlar (oksidatif fosforilasyon ve aktif transportta). İzoprenoid kinonlar tarafından sergilenen yapısal farklılıklar mikrobiyal sistemlerde önemli kullanım alanına sahiptir. Bakteriyel izoprenoid kinonların iki büyük yapısal grubu naftokinon ve benzokinondur. Naftokinon da fillokinon ve menakinon olmak üzere 2 gruba ayrılır. Fillokinon veya vitamin K1 ilk kez Alfalfa'dan 1939 yılında izole edilmiş, MacCorquodale ve arkadaşları tarafından 2-methyl-3-phytyl-1,4 naftokinon olduğu gösterilmiştir. Normalde fillokinon bitkilerde bulunur ve bakterilerde daha az bulunur. Menakinon ailesinin ilk temsilcisi (önceleri vitamin K2 olarak adlandırılmaktaydı) McKee ve arkadaşları tarafından balık yeminden saflaştırılmış ve 2-methyl-3- farnesyl - farnesyl-1,4 naftokinon olduğu zannedilmişti. Menakinon (MK) ilk kez toprak bakterisi *Bacillus brevis*' de bulunmuş daha sonraları bir çok bakterinin farklı MK tiplerini ihtiva ettiği bulunmuştur (Şekil 1.4). Menakinonlar ihtiva ettikleri izopren unitelerine göre MK-7, MK-8, MK-9 vs. olarak adlandırılırlar. Bakteriyel izoprenoid kinonların ikinci majör sınıfı benzokinonlardır. Benzokinonların başlıca iki tipi vardır; plastokinon ve ubikinon (KoenzimQ). Plastokinon bitkilerin fotosentetik dokularında, kırmızı, kahverengi ve

yeşil alglerde, mavi-yeşil alglerde bulunur. Fotosentetik bakterilerde yoktur. Bu kinon tipleri içerisinde ubikinon ve menakinonlar doğada geniş bir dağılım gösteriler (COOLINS ve JONES, 1981; SHIMIDA ve ark., 2001)

Bakteriyel kinon profilleri mikrobiyal taksonomide kullanılır ki bu yaygın bir kemotaksonomik metottur. Bu yöntem, kinon molekül tiplerine göre bakteri profillerini kantitatif olarak ortaya çıkarmak için kinonların direkt analizini kapsar. Kinon molekül tipleri filogenetik grupları tanımlamada kullanılabilir, ancak kinon profilleri daha çok filum seviyesindeki yapıları ortaya çıkarmada kullanılmasına rağmen, filogenetik olarak daha alt gruplardaki bakterileri, farklı kinon tiplerine sahip olabildiklerinden, tanımlamada kullanılabilir (SHIMIDA ve ark. 2001; KURISU ve ark., 2002).

Bacillus'larda genelde MK-7 tipi kinon bulunur. Bakterilerde solunuma ait kinonlar sadece kemotaksonomik amaçlı değil aynı zamanda son yıllarda çevredeki mikrobiyal popülasyon yapısını ortaya çıkarmada kullanılmaktadır (HIRAISHI ve ark., 1989).



Şekil 1.4. Menakinon

1.3.6. Lipit ve Yağ asitleri analizi

Yağ asitleri lipitlerin esas maddesidir. Basit lipitler trigliseritler olarak adlandırılırlar. Kompleks lipitler, fosfat, azot, kükürt, şeker vb. maddeler bulunduran lipitlerdir. Fosfolipitler ve glikolipitler kompleks lipitlerdir. 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. Sfgolipitler ise uzun zincirli alifatik aminler ihtiva eden lipitler sınıfını oluşturur (CHRISTIE, 1989).

Yağ asitleri hücre materyallerinin en önemli yapı birimlerinden biridir. Bakteri hücrelerinde yağ asitleri fosfolipitlerin açıl bileşenleri olarak hücre membranlarında oluşurlar. Membran yağ asitleri biyosentetik ilişkileri temel alınarak iki temel familyaya ayrılabilir. Birincisi; düz zincirli yağ asidi ailesidir (palmitik, stearik, hegzadekanoik, oktadekanoik vb.). Bu yağ asitleri bakterilerde yaygın bir şekilde bulunur. İkincisi; dallı zincirli yağ asitleri ailesidir (iso, anteiso, w-alicylic yağ asitleri). Bakterilerde bu yağ asitlerinin oluşumu düz zincirli yağ asitleri kadar yaygın değildir. Bakterilerde esas bileşen olarak dallı zincirli yağ asitlerinin oluşumu ilk kez *Bacillus subtilis*' te rapor edilmiştir. *Bacillus* cinsi psikrofil, mezofil, termofil ve endüstriyel enzim üreticileri gibi fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip bakteri türlerini kapsar. Bu cins, yağ asitleri bakımından en yoğun çalışılmış cinstir. Bakteriyel lipitlerdeki yağ asitleri rutin olarak gaz kromatografisi ile analiz edilmesinin yanında NMR spektrometresi, infrared kromatografisi, mass kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi gibi metotlar da yağ asitlerinin tanımlamasında gaz-sıvı kromatografisine yardımcı olarak kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi ile düz zincirli doymuş ve doymamış yağ asitlerinin pikleri belirgin bir şekilde analiz edilir. Bununla beraber dallı zincirli yağ asitleri daha zor şartlarda analiz edilir. Gaz-sıvı kromatografisi, tutunma karakteristikleri temel alınarak yağ asitlerini tanımlamada kullanılır (KANEDA, 1991).

Bakterilerdeki yağ asidi kompozisyonu bakterilerin tanımlanmasında yardımcı olmuştur. Bakterilerin çoğunluğu düz zincirli yağ asitlerinden oluşan basit yağ asidi kompozisyonuna sahiptir. Fakat bu basit yapı bakteriler arasındaki farklılıkları yeterince ortaya çıkaramamaktadır. Tam tersine iso ve anteiso serilerinden oluşan dallı zincirli yağ asitleri bakterilerde yaygın bir şekilde bulunur. Kompleks bir yapı ortaya çıkarır. Bu nedenle bakteri sistematigi açısından çok daha büyük bir değere sahiptir. Dallı zincirli lipit tipine sahip bir bakterinin yağ asidi profili büyüme şartlarına (sıcaklık, pH, karbon kaynağı) bağlı olduğu bulunmuştur (KANEDA, 1991).

Membran lipitlerinin akışkanlığı, yağ asitlerinin ortalama erime sıcaklığına bağlıdır. *Bacillus* cinsi bakterilerde sıcaklıkla birlikte membran akışkanlığını değiştirmek için membran yağ asidi içeriğinde de değişiklikler gözlenebilir. Bu durumda iso yağ asitlerinin miktarında artış, anteiso yağ asitlerinin miktarında azalış, uzun zincirli yağ asitlerinde artış ve kısa zincirli yağ asitlerinde azalış görülmektedir. *B. cereus*' un benzer bir eğilim gösterdiği gözlenmiştir (KANEDA, 1991).

Bakteri teşhisinde, yağ asidi metil esterleri (FAME) analizi benzerlik indeksi kullanılır. İzolatların yağ asitleri içerikleri veri bankasına girilerek tür tanımlanmasında kullanılır (CHAO ve HSU, 2004). *Bacillus* cinsi bakterilerin tanımlanmasında yağ asidi analizinden oldukça çok faydalanılmıştır (DE CLERCK ve DE VOS, 2002).

1.4. TERMOFİLLER VE BİYOTEKNOLOJİK AÇIDAN ÖNEMLİ ENZİMLERİ

Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin en önemli özelliği ekstrem şartlara dayanıklı enzimlere sahip olmasıdır ve bu da onları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır.

1.4.1. Termofiller

Bu organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olmuşlardır. Bunlar kendi aralarında ılımlı termofiller (45-65 °C), hipertermofiller (85 °C), mezofiller (35-50 °C) şeklinde ayrılırlar (Tablo 1.2). Denizin hidrotermal kısımlarında, sıcak su kaynakları ve sülfatarik alanlar gibi ekolojik alanlarda yaşamaya adapte olmuşlar. Bu özellikler endüstriyel amaçlı kullanılmalarında kolaylıklar sağlar (DEMIRJIAN ve ark. 2001; HAKI ve RAKSHIT, 2003).

Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmek zorundadır. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden yapılıdır. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince sıkı ve sert tutar.

Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85 °C). Ayrıca ekstrem derecede asidik ve alkali şartlar gibi denatüranlara ve de proteolize dayanıklıdır (KRISTJANSSON ve ASGEIRSSON, 2002; HAKI ve RAKSHIT, 2003).

Termofillerin DNA'sı, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü (reversible) sağlayan bir DNA Giraz ihtiva eder. Bu da DNA' nın erime noktasını en azından organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına kadar yükseltir. Termofiller ayrıca non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimler gibi artan etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara tolerans göstermektedirler (FUJIWARA, 2002; HAKI VE RAKSHIT, 2003). Yüksek sıcaklıklarda polimerik substratların çözünürlüklerinin artması ve istenmeyen komplikasyonlara yol açan kontaminasyon riskinin yüksek sıcaklıklarda azalması gibi nedenler termofilik organizmaların biyoteknolojik olarak endüstride kullanımını arttırmıştır (GÜVEN, 2004).

Tablo 1.2. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması (ARDA, 2000).

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C
Psikrofiller	-5- 5	15-30	19-35
Mezofiller	10-15	30-45	35-47
Fakültatif termofiller	37	45-55	70
Zorunlu Termofiller	40-45	55-75	60-80
Ekstrem Termofiller	60	75-80	85-110

1.4. 2. Termostabil Enzimler

Yüksek sıcaklıklara dayanıklılık bir çok endüstriyel enzimlerde fazla istenen bir özelliktir, çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde yüksek sıcaklıklarda (>50 °C) gerçekleştirilir (KRISTJANSSON VE ASGEIRSSON, 2002). Bu nedenle, ekstremofilik organizmalardan yeni enzimlerin keşfinde artış olmuştur. Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde en fazla pratik ticari kullanım alanı bulmuştur (Tablo 1.3) (NIEHAUS ve ark.,1998; DEMIRJIAN ve ark., 2001).

Ağırlıklı olarak çalışılan ekstrem termofilik ve hipertermofilik Archaea ve bacteria'dan elde edilen biyoteknolojik açıdan öneme sahip termostabil enzimler şunlardır; galaktozidaz, amilaz, pullulanaz, selüloz, kitinaz, ksilanaz ve pektinaz. Bu enzimler besin, kimyasal ve farmasötik endüstrileri ile çevre biyoteknolojisinde potansiyel kullanım alanına sahiptir (NIEHAUS ve ark.1999; EICHLER, 2001; HAKI ve RAKSHIT, 2003).

Tablo 1.3. Ekstremofiller ve enzimlerinin endüstriyel uygulamaları

Ekstremofil	Habitat	Enzimler	Uygulama alanları
Termofil	Yüksek sıcaklık	Amilazlar	tatlandırıcılar için glukoz, fruktoz hidrolizi
	Ilımlı termofiller (45—65°C)	Ksilanaz	Kağıt beyazlatmada
	Termofiller (65—85 °C)	Beta-galaktozidaz	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi
		Proteazlar	Ekmekçilikte, deterjanlar
Psikrofil	Hipertermofiller (<85 °C)	DNA polimerazlar	Genetik mühendisliği
	Düşük sıcaklık (<15 °C)	Proteazlar	Peynirin mayalanmasında,
		Dehidrojenazlar	Biyosensörler
		Amilazlar	Deterjanlarda polimer parçanmasında
Asidofil	Düşük pH (<4)	Sülfür oksidasyonu	Kömürün desülfürizasyonunda
Alkalofil	Yüksek pH (>9)	Selülazlar	Deterjanlarda polimer parçalanmasında
Halofil	Yüksek tuz konsantrasyonu (2-5 M NaCl)		
Piezofil	Yüksek basınç	Tüm mikroorganizma	Nişasta granülleri
oluşumunda			
Metalofil	Yüksek metal konsantrasyon	Tüm mikroorganizma	Mineral işlemeciliğinde
Radyofil	Yüksek radyasyon seviyeleri	Tüm mikroorganizma	Radyoaktif maddelerin temizlenmesinde
Mikroaerofil	<21% O ₂ ortamda çoğalma		
(*DEMIRJIAN, 2001'den modifiye edilmiştir)			

Ekstremofilik enzimlerin endüstriyel işlemlerde sıkça kullanılmalarının sebebi, yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riskinin olmasıdır. Termotabil proteinler değişik denatüre şartlara yüksek tolerans göstermektedirler. Bu proteinler mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek α heliks ve β tabakası içeriğine sahiptirler. Ayrıca bu proteinler çok yavaş katlanma hızı gösteriyorlar. Bu özelliğin değişik denatüre şartlarında doğal yapıyı korumada önemli olduğu sanılmaktadır (FUJIWARA, 2002; HAKI ve RAKSHIT, 2003; VAN DEN BURG, 2003).

Termotabil proteinlerin sıcaklığa dayanıklılık stratejileri mevcuttur. Termotabil proteinler ve mezofilik olanları benzer sekonder ve tersiyer yapılarına sahiptir. Termotabil ve mezofilik proteinler arasındaki bir çok karşılaştırmalı analizleri, amino asit içeriğinin ve yan zincir etkileşimlerinin az oranda fakat açık bir şekilde farklı olduğunu göstermektedir. Termotabil proteinler çok sayıda yüklü ve hidrofobik amino asitleri ihtiva eder (FUJIWARA, 2002). Çok farklı termotabilite özelliklerine rağmen termofilik enzimler ve onların mezofilik homologları aynı katalitik mekanizmayı, yüksek dizi benzerliği ve üç boyutlu yapı benzerliği gösterirler. Farklı termozimlerde termotabilite, genel bir evrensel strateji şeklinde değil, daha çok bireysel stratejilerin bir kombinasyonu ile başarıldığı görülmektedir. Örneğin; artan hidrojen sayısı ve tuz köprüleri, hidrofobik merkezin optimize olan paketlenmesi, artan prolin amino asit sayısı ve gömülü olan amino asitlerde artış. Protein esnekliği aynı zamanda termal adaptasyonun anahtar elamanlarından biri olarak görülmektedir (FITTER ve ark 2001).

Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı iki zıt faktör arasındaki dengenin sonucudur. Bunlar fleksibilite ve sertliktir. Termozimler mezofilik olanlara nazaran oda sıcaklığında daha fazla sert yapıdadırlar. Bu sertlik onları bozulmadan korur ve katalitik olarak aktif yapıyı korumalarını sağlar. Bundan dolayı daha denatüre şartlar altında optimal olarak daha aktiftirler (BRUINS ve ark. 2001).

Termostabil enzimlerin endüstride kullanılma nedenleri;

- Yüksek dayanıklılık.
- Detarjanlara, organik çözücülere ve proteazlara dayanıklılık
- Yüksek sıcaklıkta kullanılma avantajı, azalan kontaminasyon riskidir. Yüksek sıcaklıkta patojenik bakteriler öldüğünden besin endüstrisinde kontaminasyon sorununu azaltır (SCHIRALDI ve DE ROSA, 2002).
- Termostabil enzimler biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerinin oluşumunu engeller (NIEHAUS ve ark.1999).

Yüksek sıcaklıkta enzimatik işlemlerin önemli bir dezavantajı seçicilik kaybı ve ara ürün oluşumu, ve ayrıca bazı işlemler ilave ısıtma gerektirdiğinden dolayı yüksek bir maliyete sebep olmaktadır (BRUINS ve ark. 2001).

1.4.2.1. β -Galaktozidaz

β -galaktozidaz termofillerde en çok çalışılmış enzimlerden birisidir.

β -Galaktozidazın kullanım yerleri ve önemi;

- β -galaktozidaz üreten termofiller non-patojenik ve 37 °C' de çoğalamaması (insan vücut sıcaklığı) nedeniyle potansiyel bir uygulama alanı bulmaktadır (TANRISEVER ve DOĞAN, 2002).
- Memeli sütü % 3.8 (w/v) laktoz ihtiva etmektedir. Bazı popülasyonlarda laktoz intoleransı görülmekte ve bundan dolayı düşük laktozlu süt ve sütlü ürünlerin hazırlanması için β -galaktozidaz besin endüstrisinde kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda artan substrat (laktoz) ve ürün çözünürlüğü ve bu sıcaklıklarda azalan mikrobiyal çoğalma riski de avantaj sağlar.
- Bu enzim kullanılarak besin değeri yüksek olan peynir suyunun laktozdan kaynaklanan kristalizasyonu engellenmekte ve çok yüksek oranlardaki laktoz (% 70-80 kuru ağırlık), glikoz ve galaktoza hidrolizlenerek daha tatlı ve

sindirilebilir hale getirilmektedir (PISANI ve ark.1990).

- β -galaktozidaz β -1,4-D-glikozidik bağların hidrolizini katalizler. Laktozla birlikte ONPG (o-nitrophenyl-galactopyranoside) ve BNG (6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside) gibi substratlar hem enzim aktivitesinin kalitatif hem de kantitatif olarak saptanmasına kolay bir şekilde izin vermektedir.

1951 yılında özellikleri tanımlanan β -galaktozidaz enzim üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu enzim çok değişik mikroorganizma tiplerinde, hayvanlarda ve bitkilerde bulunmuştur; yani bu enzim doğada yaygın dağılışı göstermektedir (COHN VE MONOD, 1951; APPELL ve ark.1965; KURZ ve WALLENFELS, 1974). Sadece mikroorganizmalardan elde edilen enzimler endüstride kullanılır. Fungal orijinli enzimler asidik peynir suyunda, mayalar ve bakteriler tarafından üretilen enzimler ise süt içindeki laktoz hidrolizi için kullanılmaktadır.

E. coli β -galaktozidazı en çok çalışılan enzim olup indüklenebilir bir karakterdedir. Termotabil β -galaktozidaz termofillerde en çok çalışılmış enzimlerden birisidir. β -galaktozidazlar laktoz ihtiva eden sıvıların endüstriyel işlenmesinde muhtemel kullanımlarından dolayı büyük bir dikkat çekmiştir. Şu ana kadar detaylı çalışılan termoasidofilik β -galaktozidaz 87 °C'de pH 3 te aerobik olarak çoğalan bir Archaea olan *Sulfolobus solfataricus* 'dan izole edilmiş ve bu enzimin konstitutif (sentezi kendiliğinden sürekli olan) ve sitozolde lokalize olan bir aktivite sergilediği bulunmuştur (PISANI ve ark. 1990).

β -Galaktozidaz iki veya daha fazla karbonhidrat arasında veya bir karbonhidrat ile diğer bir bileşik arasındaki glikozidik bağlarını kıran enzim olarak bilinen glikozil hidrolazların (EC 3.2.1-3.2.3) bir üyesidir. Bu enzim grubu, fonksiyonel benzerlik baz alınarak son yıllara kadar geleneksel olarak sınıflandırılmıştır. Bununla beraber, son gelişmeler ışığında aminoasit dizi benzerlikleri temel alınarak 106 glikozil hidrolaz ailesi şeklinde sınıflandırılmıştır (GH'lar; <http://afmb.cnrs.mrs.fr/CAZY/>; HENRISSAT, 1991; HENRISSAT ve BAIROCH, 1996). Bu sistem aynı zamanda GH'lar için evrimsel bağlantıları

açıklayan veriler sunmakta ve reaksiyon mekanizmalarını açıklamaktadır (COKER ve ark. 2003). Bu kriterler göz önüne alındığında β -galaktozidaz aktivitesi gösteren enzimler (E.C. 3.2.1.23) şu an 4 farklı familyaya ayrılmıştır: GH-1, GH-2, GH-35 ve GH-42. Bunlardan GH-2 en iyi çalışılanı olup, *E.coli*, *Aspergillus*, *Bacillus megatherium* ve *S. solfataricus* β -galaktozidazları içine alır, oysa termofilik basiller dahil termofilik bakteriler, psikrofilik ve halofilik mikroorganizmalar GH-42'ye aittir (OHTSU ve ark.1998; HOLMES ve DYALL-SMITH, 2000; SHERIDAN ve BRENCHLEY, 2000; HIDAKA ve ark. 2002; <http://afmb.cnrs.mrs.fr/CAZY/>).

β -Galaktozidaz, laktozun ve o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONGP), p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (PNGP) ve 6-bromo-2-naphthyl-galactopyranoside (BNG) gibi ilgili kromojenlerin β -1,4-D-galaktozidik bağlantıları hidrolize eder. Bu enzim, bitki ve hayvan dokuları ile çok çeşitli mikroorganizmada bulunarak doğada yaygın bir şekilde dağılım gösterir (KURZ ve WALLENFELS, 1974). Bu enzim, gıda endüstrisinde iki biyoteknolojik kullanıma sahiptir; örneğin, laktoz intolerasına sahip kişiler için süttten laktozun uzaklaştırılması ve probiyotik yiyeceklerde kullanım için galakto-oligosakkarit üretimi (KARASOV'A-LIPOVOV'A ve ark. 2003). Özellikle, süt ve peynir altı suyu gibi gıda ürünlerinde β -galaktozidazın laktoz hidrolizi uygulaması çok önem kazanmıştır. Ticari olarak mevcut galaktozidaz tabletler düşük laktozlu süt üretimi endüstrisinde kullanılmaktadır (BISWAS ve ark. 2003). Bu alanda termostabil β -galaktozidazlar da önem kazanmıştır (OHTSU ve ark.1998).

Bakteri ve Archaea (HIDAKA ve ark. 2002; MORACCI ve ark.1995; LADERO ve ark. 2002) dahil, özellikle de Antarktika 'dan izole edilen bakteriler daha çok dikkat çekmiştir (KARASOV'A-LIPOVOV'A ve ark. 2003; CIESLINKI ve ark.2005). Sayısız mikroorganizmadaki ekstremofil β -galaktozidazlar üzerinde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Sıcak su kaynakları ve jeotermal topraklar gibi ekstrem şartlarda üreyen termofilik basiller aerobik, endospor oluşturan organizmalar olup, optimum üreme sıcaklık aralığı $>45^{\circ}\text{C}$ - $<75^{\circ}\text{C}$ arasında yer alır. Termofilik basiller en iyi bilinen iki cinsi *Bacillus* ve *Alicyclobacillus*'tur (RAINEY ve ark. 1994; GOTO ve ark.,

2003). Bu termofilik basillerin hem ısı ile muamele edilmiş yiyeceklerde kontaminasyona yol açmaları, hem de β -galaktozidaz, amilaz, protez, lipaz ve DNA restriksiyon enzimleri dahil termostabil enzim kaynağı olmaları açısından önem kazanmışlardır (RAINEY ve ark. 1994).

Alicyclobacillus cinsi *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus*, *A. acidophilus*, *A. pomorum* ve *A. sendaiensis* gibi birkaç termoasidofilik ve heterotrofik bakterileri kapsar (GOTO ve ark. 2003; MATSUBARA ve ark. 2002; TSURUOKA ve ark. 2003). Termoasidofilik *Alicyclobacillus* cinsinin üyeleri, özellikle *A. acidoterrestris* İngiltere ve Almanya'da son dönemlerde meyve suyu bozulma vakalarında rol aldıkları bulunmuştur. Bu organizma pastörizasyon işlemine dirençli olup guaiacol ve diğer zararlı maddeleri üretir (MACIUNSKA ve ark. 1998).

Alicyclobacillus cinsinin birkaç enzimi çalışılmıştır. Bunlar arasında proteaz (TSURUOKA ve ark. 2003), α -amilaz (MATZKE ve ark 1997), amilopullulanaz, cyclodekstrinaz ve tip 2 alfa-glukozidaz (MATZKE ve ark. 2000-a), neopullulanaz (MATZKE ve ark. 2000-b) ve bir maltoz-bağlayan protein (HULSMANN ve ark. 2000) yer almaktadır. Termoasidofilik *Alicyclobacillus* cinsinin üyelerinde β -galaktozidaz enzimi üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son zamanlarda biyoteknolojik işlemlerde kullanılan enzimler, özellikle de Antartika' da yaşayan ekstremofillerden elde edilenler dikkat çekmiştir (KARASOV'A-LIPOVOV'A ve ark. 2003; CIESLINKI ve ark.2005; POLI ve ark. 2006). NICOLAUS ve ark. (1998) Antartika' daki Rittmann dağından toprak numunelerinden MR1 varyetesi izole etmiş ve *Alicyclobacillus* cinsi için tipik olan halkalı yağ asitlerine sahip lipit içerdiklerini tespit etmişlerdir. Bu varyetenin fenotopik özellikleri ve genotipik analizleri sonucunda karakterize edilerek termoasidofilik karakterde 63 °C optimum sıcaklık (45-70 °C) ve 3.5-4.0 optimum pH'ye sahip olduğu bulunmuştur. DNA'nın G+C yüzdesi, 16S rDNA ve DNA-DNA homolojisi *A. acidocaldarius* varyeteleri ile karşılaştırıldığında, MR1 varyetesi *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* olarak tanımlanmıştır (NICOLAUS ve ark. 1998).

Bu çalışmanın konusu olan *Alicyclobacillus acidocaldarius*'un alt türü

üzerinde farklı çoğalma şartları altında daha önce yapılan çalışmada bu bakterinin β -galaktozidaz aktivitesi gösteremediği rapor edilmesine rağmen (NICOLAUS ve ark. 1998), β -galaktozidaz aktivitesinin varlığını daha önceki çalışmada tespit edilmiştir (GÜVEN, 2004). Yapılan taramalarda *Alicyclobacillus* cinsi üyeleri içerisinde β -galaktozidaz enzimi ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

FITZ-JAMES ve YOUNG (1959), *Bacillus* cinsinin varyete ve türlerini spor yapılarına göre karşılaştırmışlardır. Çalışmada *B. cereus* (strain alesti) ve *Bacillus sotto* 'nun RNA miktarı ile spor büyüklüğü arasında bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir.

HUANG ve ark.(2005), topraktan izole ettikleri bakteriyi *Bacillus nemotocida* olarak tanımlamışlardır.

VALERO ve ark. (2002), taze sebze ve buzdolabındaki işlem görmüş yiyeceklerden (domates püresi) izole ettikleri izolatların, fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanarak *B. licheniformis* ve *B. cereus* olduklarını tespit etmişlerdir.

SUIHKO ve STACKEBRANDT (2003), kağıt endüstrisinde geri dönüşümler esnasında izole edilen bakterilerin çoğunun *Bacillus* cinsine ait *B. licheniformis* ve *B. cereus* türler olduğunu tespit etmişlerdir.

BATRAKOV ve ark. (2003), sıcak sulardan termofilik ve halotolerant *B. licheniformis* st. 603'ü izole etmişler ve bu türün ekstraselüler lipopeptid sentezlediğini bulmuşlardır.

LEMMA ve ark. (1991), *B. subtilis*'in suksinat solunumunda menakinonların yer aldığını tespit etmişlerdir.

PANDYA ve KING (1996), *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus lysodeikticus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da menakinon veya ubikinonun varlığını test etmişlerdir. Test sonucunda çalıştıkları organizmaların tümünde menakinon bulunduğunu, menakinon ve ubikinon'un yaklaşık olarak eşit miktarlarda olduğunu tespit etmişlerdir.

MINNIKIN ve ark.(1984), *Bacillus subtilis*'in polar lipitlerini ve isoprenoid

kinonlarını analiz etmişlerdir.

GOODMAN ve ark. (1976), *B. licheniformis*'in anaerobik büyüme kabiliyetinde olduğunu ve kinon olarak yalnız menakinon ihtiva ettiklerini belirtmişlerdir.

COLINS ve JONES (1981), bakterilerde izoprenoid kinonların dağılımını ve onların taksonomik uygulamalarını çalışmışlardır. Gram-pozitif bakterilerin ya menakinon ya da dimetil menakinon içerdiğini veya isoprenoid kinonları içermediklerini tespit etmişlerdir. Solunum kinonlarının yapısal tiplerinin dağılımının bir çok bakteri grupları arasındaki taksonomik ilişkiyi belirlemede kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

SHIMADA ve ark. (2001), *Thermoplasma acidophilum* HO-62'nin kinon profillerini HPLC, Mass spektrometresi ve NMR ile analiz etmişler ve bu bakterinin aerobik şartlarda menakinonlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir.

KURISU ve ark.(2002), kinon profil metodu kullanılarak bakterilerin analizinin yapılabileceğini ve MK-7 yi ihtiva eden bakterilerin düşük GC içeriğine sahip bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

TANG ve ark. (2004), termofilik popülasyondaki değişiklikleri tanımlamak için kinon profil metodunu kullanmışlar ve bu bakteri popülasyonunda *Bacillus* türlerinin baskın hale gelmesini MK-7 nin artmasıyla belirlemişlerdir.

ROSA ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus*'un hücre membranlarının lipit içeriklerini standartlar kullanarak TLC yöntemiyle 4 majör 2 minör bant içerdiğini bu majör yağ asitlerinin fosfatidiletanolamin (PE), difosfstidil gliserol (DPG), fosfoglikolipit (PGL) olduğunu ve 2 tane fosfolipidin ise tanımlanamadığını tespit etmişlerdir.

KANEDA (1968), *Bacillus* cinsinin yağ asitleri üzerine yaptığı çalışmada *B. thuringiensis*, *B. anthracis* ve *B. cereus*'un yağ asidi içeriği benzerlikleri dikkat çekmiş ve bu yağ asitlerinin çoğunlukla yağ asitlerinin toplamının % 70'inin dallı yağ asitleri olduğunu tespit etmiştir.

SHEN ve ark. (1970), *Bacillus* cinsinin mezofilik ve termofilik varyetelerinde yağ asidi dağılımını incelemişler. Hem mezofillerde (% 51) hem de termofillerde (% 41) i- C15:0 yağ asidinin en yaygın olduğunu ve ikinci en yaygın olan yağ asidin mezofillerde (% 22) a-C15:0, termofillerde (% 27) i-C17:0 olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca hem mezofillerde (%61) hem de termofillerde (% 66) oranıyla i-C15:0 ve i-C17:0 yağ asidi çiftlerinin en fazla oranlarda olduğunu tespit etmişlerdir. Yağ asidi çiftlerinden a-C15:0 ve a-C17:0, mezofillerde (%30) termofillerden (% 15) daha yüksektir.

LAWRENCE ve ark. (1991), Gaz kromatografisi yöntemiyle yaptığı bütün hücre yağ asidi analizi ile birbirine benzeyen *B. anthracis*' in *B. cereus*' tan farklılığını bilgisayar programı ile bulunabileceğini bildirmişlerdir. İso/anteiso yağ asidi oranları *B. anthracis* varyetelerinde hemen hemen eşit olmasına rağmen *B. cereus* varyetelerinde ise iso yağ asitlerinin fraksiyonlarının anteiso yağ asidi fraksiyonlarından en az iki kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

KANEDA (1991), hücresel total yağ asitlerinin dallı zincirli yağ asitlerine sahip olan bakteri türlerini karşılaştırmış ve sistematikte kullanılabileceğini tartışmıştır. Yeni bir türün bir cins içerisinde sınıflandırılabilmesi organizmaların lipitlerindeki dallı zincirli yağ asitlerinin çoğunlukla bulunuşu temel olarak incelenebileceğini söylemiştir. *Bacillus* türlerinde dallı zincirli yağ asitleri esas hücresel yağ asitleri olarak bulunduğunu ve *B. cereus*' un dallı zincirli yağ asitlerinin oranının % 80, *B. subtilis*' in % 95 *B. mycoides*'in %75 *B. anthracis*' in %83 olarak bulunduğunu tespit etmiştir. *Bacillus* türleri çok az oranlarda düz zincirli yağ asitlerini (%0-10), geri kalan ise dallı zincirli yağ asitleri olduğunu ifade etmiştir.

KAMFER (1994), *Bacillus* 313 varyetesinin yağ asitleri içerikleri ile yaptığı

nümerik çalışmada, tüm varyetelerin dallanmış zincirli yağ asitlerini baskın bir şekilde içermesiyle karakterize edildiklerini bulmuştur. Esas grup olarak i-C15:0 ve a-C15:0, sık sık i-C17:0 ve a-C17:0 ve ender olarak diğer dallı yağ asitleri ihtiva ettikleri, total yağ asitlerinin % 40 ile % 90'ını teşkil ettiklerini tespit etmiştir ve bu yağ asitlerinin oranlarını kullanarak varyeteleri değişik gruplara ayırmıştır. Kantitatif olarak baskın olan yağ asitlerinden i-C15:0 ve a-C15:0 oranlarına bağlı olarak *Bacillus* türlerini iki esas gruba ayırmışlardır.

WHITAKER ve ark. 2003, hücrel yağ asidi metil esterlerini infrared spektroskopi yöntemi ile besinlerde bulunabilen bakterilerin tanımlamasını tür veya varyete seviyesinde yapmışlardır.

CHAO ve HSU (2004), topraktan izole ettikleri *Bacillus* türlerini kategorize etmek için yağ asidi benzerlik oranını kullanmışlardır.

NAZINA ve ark.(2001), aerobik, termofilik basillerin taksonomisini çalışmışlar. Bu çalışmada bakterilerin hareketli, ılımlı termofil, spor oluşturan, aerobik veya fakültatif anaerobik olduklarını bulmuşlardır. Ayrıca majör izoprenoid kinonun menakinon 7, hücrel yağ asidi profillerinin de büyük miktarlarda (% 61.7- % 86.89) iso-C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0 yağ asitlerinden oluştuğunu, 16S rRNA analizi yapılarak bu varyetelerin termofilik basillerin 5. grubuna dahil olduklarını filogenetik olarak tespit etmişlerdir.

CASTANHA ve ark. (2006), *B. anthracis*' i kütle spektrometresi yardımıyla asitte çözümlü küçük proteinlerin amino asit dizisi yardımı ile cereus grubunun diğer üyelerinden ayırt etmişlerdir.

Bacillus varyeteleri SDS-PAGE kullanılarak elde edilen toplam hücrel proteinlere göre karakterize edilmiş, protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik sınıflandırmada % 47 benzerlik düzeyinde iki ayrı grup bulunmuştur (BERBER, 2004).

MORA ve ark. 1998, farklı bölgelerde aldıkları topraktan izole ettikleri 85 termofilik *Bacillus* izolatının genotipik karakterizasyonunu referans termofilik *Bacillus* türlerini kullanarak yapmışlardır.

DE SOUZA ve MARTINS (2001), topraktan izole ettikleri termofilik bakterileri morfolojik fizyolojik, biyokimyasal testler ve 16S rRNA dizi analizinden yararlanarak izolatın *Bacillus*'un 5. grubuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. İzole ettikleri bakterilerin gram-pozitif, termofilik, zorunlu aerobik, katalaz-pozitif, nitratı redükte edebilen özelliklere sahip olduğunu bulmuşlardır.

MATSUMOTO ve ark.(2002), izole ettikleri Toluene toleranslı gram pozitif bakteriyi fizyolojik testler, yağ asidi profili analizi ve 16S rRNA analizini kullanarak tanımlamış ve bakteriyi *Bacillus cereus* olarak adlandırmışlardır.

PIRTTIJARVI ve ark. (2000), izole ettikleri bakterilerin fenotipik özelliklerinden ve yağ asitleri içeriğinden yola çıkarak *Bacillus cereus* grubunun diğer basil gruplarından ayırt edilemediğini ve 16S rRNA analizinin de gerekli olduğunu tespit etmişlerdir.

DE CLERK ve DE VOS (2002), jelatin üretiminde kontaminasyona yol açan ve endospor oluşturan bakterilerin *Bacillus* ve yakın cinslerin üyeleri üzerinde yapılan çalışmada yağ asidi ve 16S rRNA dizi analizi sonucunda bunların *B.licheniformis*, *B. cereus* grubunun üyeleri, *B. subtilis* ve *Alicylobacillus acidocaldarius*' a ait izolatlar olduğunu tespit etmişlerdir.

HEYRMAN ve SWINGS (2001), ağırlıklı olarak izole ettikleri *Bacillus* cinsine ait izolatların rDNA dizi analizi ile yağ asidi profillerini kullanarak tanımlamaya gitmişlerdir.

HAQUE ve RUSSELL (2005), piriñten izole ettikleri *Bacillus cereus*'un fenotipik ve genotipik karakterizasyonu çalışmışlar. Ayrıca kapiler GC/MS analizi ile yağların yağ asitleri içeriği sayesinde izolatları gruplandırmada ilk kez

kullanmışlardır. Ayrıca RFLP ve 16S rRNA dizi analiz teknikleri ile ileri aşamada *B.cereus* varyeteleri analiz etmişlerdir.

NIELSEN ve ark. (1994), 14 tane alkalifilik veya alkali tolerant, aerobik ve endospor oluşturan *Bacillus* cinsine ait bakterilerin karşılaştırmalı 16S rRNA dizi analizlerini yapmışlardır.

NICOLAUS ve ark.(1996), Antartika'dan bakteri izole edip morfolojik - fizyolojik testler, lipid analizleri ve 16S rRNA analizinden yararlanarak izolatın *Bacillus thermoantarcticus* olduğunu tespit etmişlerdir.

YAKIMOV ve ark.(1997), petrol rezervlerinden izole edilen bakterilerin çoğunun *Bacillus licheniformis* varyeteleri olduklarını yağ asidi analizi 16S rRNA dizi analizi gibi taksonomik ve fizyolojik testlerle tespit etmişlerdir

GIFFEL ve ark. (1997), besin zehirlenmesinde etkili olan *Bacillus cereus* ve *B. thuringiensis'* i hızlı ve duyarlı bir metot geliştirerek ilk kez kolayca ayırt etmişlerdir. Bunun için spesifik DNA problemleri kullanarak 16S rRNA'nın değişken dizilerden faydalanarak spesifik DNA problemleri kullanılarak PCR ile gerçekleştirilmiştir

WINTZINGERODE ve ark (1997), izole ettikleri aerobik, gram pozitif, spor oluşturan 131 tane bakterinin yağ asidi analizi ve 16S rDNA oligonükleotit probu kullanarak bunlardan 34'ünün *Bacillus mycoides* türleri olduğunu tespit ettiler. Daha önce *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis* yakın benzerlik gösterdiklerinden ayırt edilmeleri güç olmuştur. Ancak 16S rDNA probu kullanılarak açık bir şekilde *B. mycoides* diğer 3 türden ayırt etmişlerdir.

FRITZE (2004), *Bacillus*, *Anoxybacillus* ve *Alicyclobacillus*'un da yer aldığı bir çok yakın akraba cinslerin aerobik, endospor oluşturan bakterilerin taksonomisini 16S rRNA dizi analizi ile yapmıştır.

Bir bakterinin 16S rRNA'nın hızlı dizi analizi filogenetik pozisyonunun belirlenmesinde yeterli olmadığı, bu korunmuş genin ve ürününün dizi analizinde bazı sınırlamalar mevcut olduğunu ve bu yüzden % 97 ve daha yüksek rRNA dizi benzerliklerinde bile DNA-DNA hibridizasyonunun yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır (STACKEBRANDT ve GOEBEL, 1994; DE CLERCK ve DE VOS, 2002).

Multiplex PCR kullanarak *B. anthracis*'te bulunan diğer yakın türlerde bulunmayan plazmidleri üzerindeki virülans genler baz alınarak bu türün karakterizasyonu ve tanımlanması mümkün hale gelmiştir (WANG ve ark. 2004)

16S-23S ITS (internal transcribed spacer) nükleotid bölgesi çok değişken olup, korunmuş 16S rRNA kodlama bölgesi ile birlikte tür teşhisinde daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Bu yöntemle aynı zamanda *Bacillus* cinsi ve yakın cinslerde tür ve alt tür seviyelerinde prokaryotik çeşitliliği araştırılmıştır (XU ve COTE, 2003).

MANZANO ve ark. 2003, yiyeceklerden izole ettikleri *B. cereus*, *B. mycoides* ve *B.thuringiensis* arasındaki farklılıkları tespit etmede PCR-RFLP tekniğini kullanmışlardır.

LOPEZ ve ALIPPI (2007), Arjantin'den toplanan bal numunelerinden izole ettikleri *Bacillus* türleri ve özellikle *B. cereus* izolatlarının karakterizasyonunu 16S rRNA gen fragmentinin RFLP'si, morfolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla yapmışlardır.

DE CLERCK ve DE VOS (2002), jelatine kontamine olmuş ve zarar veren birçok bakteri izole edip bu bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterlerini çalışmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda izolatların *Anoxybacillus* türleri olduğunu tespit edip bu izolatlardan bir tanesini aerobik, endospor oluşturan *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. olarak tanımlamışlardır.

PIKUTA ve ark. (2000), izole ettikleri spor oluşturan ılımlı termofilik (37-66 °C) ve zorunlu anaerobik bakteriyi *A. pushchinensis* gen.nov., sp. olarak

isimlendirmişler, fakat daha sonra bu bakterilerin aerobik çoğalma yeteneğine de sahip aerotolerant karakterde olduklarını bulmuşlardır (PIKUTA ve ark. 2003).

BELDUZ ve ark.(2003), Gönen ve Diyardin kaplıcalarından aldıkları su ve çamur numunelerinden izole ettikleri endospor oluşturan termofilik basiller içerisinde *Anoxybacillus gonensis* sp.yi tanımlamışlardır.

DULGER ve ark. (2004), Ayder ve Kestanbol sıcak su kaplıcalarından aldıkları su ve çamur numunelerinden izole ettikleri bakterileri 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA homolojisinden faydalanarak tanımlamış ve termofilik basilleri *Anoxybacillus ayderensis* ve *Anoxybacillus kestanbolensis* olarak adlandırmışlardır.

YUMOTO ve ark. (2004), sıcak su kaynağından ılımlı termofilik mikroorganizma izole etmişlerdir. Fenotipik karakterizasyon, 16S rRNA dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonunu içeren filogenetik analizler, izole edilen bakterinin yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu göstermiştir. Bu bakteri *Anoxybacillus voinovskiensis* olarak adlandırılmıştır.

KEVBRIN ve ark. (2005), yeni bir termofilik fakültatif aerobik bakteri izole etmişler ve *Anoxybacillus kamchatkensis* olarak adlandırmışlardır. İzole ettikleri bakterinin gram-pozitif, hareketli, katalaz ve oksidaz negatif, alkalitolerant olduğunu ve 16S rRNA dizi analizine göre *A. ayderensis*'e %99.2 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

ÇOLAK ve ark. (2005), yeni bir termofilik bakteri olan *A. gonensis* G2'den termoalkalofilik esteraz enzimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır.

POLI ve ark (2006), Antarktika'nın jeotermal toprağından termofilik ve amilaz üreten *Anoxybacillus amylolyticus* izole edip tanımlamışlardır. Bu bakterinin üreme sıcaklık aralığını 45-65 °C optimum üreme sıcaklığını 61 °C , pH üreme aralığını 5.0-6.5 optimum pH yı 5.6 olarak tespit etmişlerdir. Kemotaksonomik verilere göre kinon tipini MK-7 ve bakterinin major yağ asitlerinin iso-C15:0 ve iso-C17:0 olduğunu

tespit etmişlerdir. Bu veriler izole edilen bakterinin *Bacillus* cinsine ait olduğunu desteklemiş ayrıca genotipik ve fenotipik analizler de bu bakterinin yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu kanıtlamıştır.

RAINEY ve ark. (1994), *Bacillus* cinsi içerisinde yer alan termofilik basillerin 16S rRNA analizleri sonucunda, bu cinste filogenetik olarak bazı farklı türlerin yer aldığını bulmuş ve bunları *Alicyclobacillus* adlı yeni bir cins altında sınıflandırmışlardır.

Alicyclobacillus cinsi *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus*, *A. acidophilus*, *A. pomorum* ve *A. sendaiensis* gibi birkaç termoasidofilik ve heterotrofik bakterileri kapsar (GOTO ve ark. 2003; MATSUBARA ve ark. 2002; TSURUOKA ve ark. 2003). Termoasidofilik *Alicyclobacillus* cinsinin üyeleri, özellikle *A. acidoterrestris* İngiltere ve Almanya'da son dönemlerde meyve suyu bozulma vakalarında rol aldıkları bulunmuştur (MATSUBARA ve ark. 2002).

NICOLAUS ve ark. (1998), *Alicyclobacillus* cinsine ait 3 farklı varyeteyi Antartica'nın Rittmann dağındaki jeotermal topraktan izole etmişler ve bu varyetelerden birisinin (MR1) genetik analizleri yapılarak bunu alt tür *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *rittmannii* olarak sınıflandırmışlardır (Bu bakteri enzim saflaştırma çalışmasında kullanılan varyetedir). *Alicyclobacillus* cinsi için tipik olan aromatik halkalı yağ asitlerine sahip lipit içerdiklerini, bu varyetenin termoasidofilik karakterde 63 °C optimum sıcaklık (45-70 °C) ve 3.5-4.0 optimum pH'ya sahip olduğunu buldular.

GOTO ve ark (2003), yeni bir termoasidofilik endospor oluşturan bakteri *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov.'u karışık meyve suyundan izole ederek tanımlamışlardır. Ayrıca, bu bakterinin *Alicyclobacillus*'a özgü ω-alicyclic yağ asitleri istisnai olarak ihtiva etmediklerini tespit etmişlerdir. Ribozomal RNA tabanlı filogenetik analiz ve DNA-DNA hibridizasyon değerleri (% 74.4) bu türün *Alicyclobacillus* cinsine ait olduğunu bulmuşlardır.

Termofilik basillerin hem ısı ile muamele edilmiş yiyeceklerde kontaminasyona yol açmaları, hem de β -galaktozidaz, amilaz, protez, lipaz ve DNA restriksiyon enzimleri dahil termostabil enzim kaynağı olmaları açısından önem kazanmışlardır (RAINEY ve ark. 1994).

Son zamanlarda biyoteknolojik işlemlerde kullanıma sahip enzimler, özellikle de Antartika' dan yaşayan ekstremofillerden elde edilenler dikkat çekmiştir KARASOV'A-LİPOVOV'A ve ark. 2003; SHERIDAN ve BRENCHLEY, 2000; POLI ve ark. 2006).

Alicyclobacillus cinsinin birkaç enzimi çalışılmıştır. Bunlar arasında proteaz (TSORUOKA ve ark. 2003), α -amilaz (MATZKE ve ark. 1997), amilopullulanaz, cyclodekstrinaz ve tip 2 alfa-glukozidaz (MATZKE ve ark. 2000a), neopullulanaz (MATZKE ve ark. 2000-b) ve bir maltoz-bağlayan protein (HULSMANN ve ark. 2000) yer alır.

TSURUKA ve ark (2003, *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1'den yeni bir kollajenolitik serin-karboksil proteinaz enzimi saflaştırmışlar, karakterize etmişler ve bu enzimin genini klonlamışlardır. Bu ekstrasellüler enzimin optimum pH'sını 3.9 olarak bulmuşlardır.

Termoasidofilik *A. acidocaldarius*'dan elde edilen α -amilaz enzimi asidofilik ve asidostabil enzimlerin özelliklerini ortaya çıkarılması amacıyla en çok çalışılan enzim olmuştur (SCHWERMANN ve ark. 1994; MATZKE ve ark. 1997).

MATZKE ve ark. (2000-b), *A. acidocaldarius* hücre ekstraktlarında neopullulanase aktivitesinin sitoplazmik olduğunu ve ayrıca 5.5 değerinde bir optimum pH'sının olduğunu ki bu değer sitoplazmanın pH değerine yakın seyrettiğini bulmuşlardır. Bu enzimin optimum sıcaklığı da 55-57 °C olarak bulunmuştur.

BATRA ve ark.(2002), sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Bacillus coagulans* RCS3'un β -galaktozidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6-7 ve 65 °C olarak bulmuşlar ve bu enzimin hidroliz ürünü galaktoz tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiği bulunmuştur. Ayrıca, hem laktoz solüsyonu hem de peynir suyundaki laktoz 36 saat boyunca 50 derecede hidrolize edilebileceği gösterilmiştir.

HOLMES ve DYALL-SMITH (2000), halobakteri *Haloferax alicantei*'ye ait β -galaktozidaz genini başka mikroorganizmaya aktararak bu genin o organizmada çalışır olduğunu bulmuşlardır.

HIDAKA ve ark. (2002), ekstrem termofil *Thermus thermophilus* A4'den elde ettikleri β -galaktozidaz enzim yapısı üzerinde çalışma yapmışlardır.

VETERE ve PAOLETTI (1998), *Bacillus circulans*'dan β -galaktozidaz elde etmişler ve non-denatüre jel elektroforezi ile BNG substratını kullanarak bu izoformların molekül ağırlıklarını 212, 145 ve 86 kD olarak tespit etmişlerdir.

MACIU'NSKA ve ark (1998), % 2'lik laktoz veya galaktoz ile birlikte *Thermus thermophilus*'ta β -galaktozidaz sentezi konstitütif değerlerden sırasıyla % 33 ve % 61'lik artış gösterdiğini bulmuşlardır.

PISANI ve ark (1990), thermoasidofilik archaea *Sulfolobus solfataricus*'da β -galaktozidazın sitozolde lokalize olduğunu ve enzimin konstitütif yani sürekli sentezlendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu enzimin sodyum fosfat tamponu pH 6.5'te maksimum aktivite sergilediğini ve bu pH'nın *E. coli* dahil bir çok mezofilik mikroorganizma kaynaklarına benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır.

Daha önce yaptığımız çalışmalarda *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin konstitütif olarak intrasellüler β -galaktozidaz enzimini ürettiğini, ama laktoz ve diğer bazı indükleyiciler (IPTG) yardımıyla enzim üretiminin artabileceğini bulduk. β -Galaktozidaz spesifik aktivitesi 24 saatlik inkübasyon sonunda laktoz yokluğunda 0.4 U/mg, oysa bu değer laktoz varlığında 0.6 U/mg protein olarak bulunmuştur

(% 33 artış). Bunun yanında, laktoz varlığında 12 saatlik inkübasyon süresinde enzim spesifik aktivite artışı % 85 gibi bir değere ulaştığı bulundu (GÜVEN, 2004).

Bu çalışmamız dışında, termoasidofilik *Alicyclobacillus* cinsinin üyelerinde β -galaktozidaz enzimi üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu mevcut çalışmamızda, termoasidofilik *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* 'nin intrasellüler β -galaktozidaz enzimi saflaştırıldı ve saflaştırılan bu enzimin bazı özellikleri tespit edildi.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. BAKTERİ İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

3.1.1. İzole Edildikleri Sıcak Su Kaynakları ve Özellikleri

Taşlıdere sıcak su kaynağı, Batman ilinin Kozluk ilçesine bağlı Şelmo nahiyesinin 7 km kuzeybatısında, Holi ile İsmailkan yerleşim merkezinin arasında, anayol kenarında yer almaktadır (Resim 3.1). Su analiz raporuna göre su sıcaklığı 78 °C, pH ise 6.7 civarındadır. Su kaynağı su kimyası açısından incelendiğinde $SO_4 > Cl > HCO_3$ ve $Ca > Na > K$ şeklinde anyon-kasyon sıralamasına sahip olduğu ve kalsiyumlu, sodyumlu, sülfatlı, klorürlü sıcak su sınıfına girdiği belirlenmiştir.



Resim 3.1. Batman-Taşlıdere sıcak su kaynağı

Kös Kaplıca Kaynakları, Bingöl il merkezine 18 km. uzaklıktadır (Resim 3.2). Su sıcaklığı 45,5-47 °C, pH ise 6.57 civarındadır (2005 yılı DSİ Kalite Kontrol ve Laboratuvarı), (ÖZMEN ve DEMİREL, 2005).



Resim 3.2. Kös Kaplıcası

Su kaynağı su kimyası açısından incelendiğinde $\text{HCO}_3 > \text{SO}_4 > \text{Cl}$ ve $\text{Na} > \text{Ca} > \text{K}$ şeklinde anyon-kasyon sıralamasına sahip olduğu bulunmuştur (2005 yılı DSİ Kalite Kontrol ve Laboratuvarı), (ÖZMEN ve DEMİREL, 2005).

Yukarıda özellikleri açıklanan Bingöl'ün Kös ve Batman'nın Taşlıdere Kaplıcalarından alınan ve soğuk şartlarda muhafaza edilen su ve çamur örnekleri laboratuvarında steril su ile steril şartlarda seyreltildi (10-100 kat). Su ve çamur numunelerinde endospor oluşumu için numuneler 80 °C de 15 dakika inkübe edildi. 50 ml Nutrient broth sıvı besiyeri içeren 250 ml lik erlenlere 2 ml seyreltilmiş su ve çamur numuneleri ilave edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra sıvı besi yerinde üreyen bakterilerden katı besiyerine ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra petrilere üreyen kolonilerden tek koloni alınıp katı besi yerine ekim yapıldı. 24 saat sonunda bu petrilere saf kültür elde edildi.

Bingöl'ün Kös Kaplıcalarından bir bakteri (5 nolu izolat) ve Batman'nın Taşlıdere Kaplıcalarından dört bakteri (6, 7, 8 ve 9 nolu izolatlar) izole edildi. Bu bakterilerin bazı morfolojik özellikleri, lipid ve kinon analizleri sonucunda bazı bakterilerin benzerlik arz etmesinden dolayı taksonomik çalışmalar 3 izolat üzerinde yoğunlaştı. Bingöl'ün Kös Kaplıcalarından izole edilen izolat KG5 ve Batman'nın Taşlıdere Kaplıcalarından izole edilenler ise KG8 ve KG9 olarak adlandırıldı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri Bileşimi

Sıvı besi yerinin bileşimi:

Nutrient Broth (Oxoid):13 gr

Saf su:1000 ml

Katı besi yerinin bileşimi:

Nutrient Broth (NB):13gr

Agar (Difco):20 gr

Saf su:1000 ml

Bakterilerin karbon kaynaklarını kullanma yeteneklerini tespit etmek için minimal besi yeri kullanıldı. Minimal besi yerini hazırlamak için 0.2 gr /lt yeast ekstrakt (Sigma), 0.5 gr/lt pepton (Oxoid), 5 gr / lt NaCl kullanıldı.

Besi yeri sterilizasyonu 20 dakika 121 °C'de yapıldı.

3.1.3. Cihazlar

Çalkalamalı su banyosu	(Julabo)
Spektrofotometre	(Unicam, 8625, uv/vıs), (Perkin elmer UV -VIS Lambda 12)
Soğutmalı santrifüj	(Sigma Christ2K15)
Vortex	(Stuart)
PH metre	(Denway 3010, PCB 501 electrod), (PHM 210 meter lab.)
Deep-freeze	(Harris, -95 °C), (Ocean)
Etüv	(Heraus)
İnkübatör	(Heto HMT 200), (Heto OBN / 8), (Heraus Instruments kelvitron t)
Digital göstergeli hassas terazi	(Gec Avefy, 0.0001), (Bosh SAE 200)
Faz kontrast mikroskobu	(Nikon Eclipse E400 Faz Contrast 0.90 Japan)

Magnetik karıştırıcı	(Heidolph MR 3002), (Heidolph MR 3001)
TLC ısıtıcısı	(Bocsh PHG 500-2)
Sonikatör	(Sonikatör ultrasonic processor XL)
Çalkalayıcı	(Innova 4300)
Vakum	(Edwards oil mist filter EMF 10)
Rotavapor	(Büchi R-200, Büchi Heating Bath B-490)
Jel kurutucu	(Bio- RAD 583)
Bioreaktör	(B. Braun -Biotech 90-1)
Ultrafiltrasyon	(Amicon)
HPLC	(LCD Analytical refracto Monitor IV, Millipore 600 E , LCD Analytical SM 400 programmable)
Saf su cihazı	(Millipore Elix 5)
Elektroforez Aleti	(Midi Bio-Rad)
Otoklav	PBI International Fedegari
Steril kabin	Faster Bio 48
Ultrasantrifüj	(Heraus Rotor:8570 6x94; Beckman Coulter Avanti J-25 230 v , J-20 XP)
FPLC	Amersham-Biosciences
GC-MS	Hewlett-Packard 5890A
NMR	Bruker DPX-300 (300 MHz)

3.1.4. Optimum Üreme Şartlarının Belirlenmesi

Deneyler esnasında Nutrient Broth sıvı besiyeri (NB) ve NB katı besi yeri kullanıldı. Bakterilerin optimum üreme sıcaklığını tespit etmek için 15-75 °C (5 °C'lik aralıklarla) sıcaklık derecelerinde bakteriler inkübe edildi. Tespit edilen optimum üreme sıcaklığında optimum üreme pH'sı belirlendi. Bunun için pH 4-11 aralığındaki pH lar denenerek bakteri üremesinin en fazla olduğu pH, 470 nm de spektrofotometrik ölçümlerden faydalanarak tespit edildi.

Bakterilerin uygun üreme zamanını tespit etmek için bakteriler Nutrient Broth (NB) sıvı besi yerinde 6, 12, 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.

3.1.5. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

Bakterilerin optimum üreme sıcaklığı ve optimum üreme pH'sı belirlendikten sonra izolatların morfolojik tanımlanmaları yapıldı.

BAKTERİ KOLONİLERİNİN MORFOLOJİK İNCELENMESİ: Petri kutusunda gelişen bakteri kolonilerinin şekil, kenar ve yüzey şekilleri incelenerek özellikleri tespit edildi (ÖZÇELİK,1998).

BAKTERİLERİN GRAM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ: Gram özelliğinin tespiti için üç ayrı teknik kullanıldı.

1.Baktident:

Her bir bakteri için cam deney tüpüne 200 ml distile su bırakıldı.



Cam tüplere bir günlük katı besi yerinde üremiş bakteri kolonisinden kültür bırakıldı.



Tüplere L-alanin aminopeptidaz kiti (Merck) bırakıldı.



Cam tüpler en az 10 -30 dak. inkübatörde tutuldu.



Değerlendirme: Koyu sarı renk oluştuğunda bakteriler gram negatif, koyu sarı renk oluşmaması durumunda ise bakteriler gram pozitif olarak değerlendirildi.

2.KOH Testi:

Lam üzerine bir günlük katı besi yerinde üremiş bakteri kolonisinden kültür bırakıldı. Bunun üzerine ise % 3'lük KOH'ten 1-2 damla bırakıldı. Çıplak gözle

inceleme yapıldı (HALEBIAN ve ark. 1981).

Değerlendirme : İpliksi yapıların gözlenmesi durumunda bakteriler Gram (-) olarak değerlendirildi.

3.Gram Boyama Metodu:

Kullanılan çözeltiler:

Karbol fuksin:

Çözelti A

Bazik fuksin: 0.3 g

Etil alkol (% 95): 10.0 ml

Çözelti B

Fenol: 5.0 g

Destile su : 95.0 ml

Çözelti A ve B karıştırılır.

Kristal viyole:

Çözelti A

Kristal (Jansiyen) viyole: 2.0 g

Etil alkol (%95): 20.0 ml

Çözelti B

Amonyum oksalat: 0.8 g

Destile su: 80.0 ml

Çözelti A ve B karıştırılır, destile su ile 1:10 oranında sulandırılır ve filtre kağıdından süzülür.

Lügol çözeltisi:

İyot : 1.0g

Potasyum iyodür: 2.0 g

Destile su: 300.0 ml

Metilen mavisi:

Metilen mavisi: 0.3 g

Etil alkol (% 95): 30.0 g

Metilen mavisi etilalkol içinde eritildikten sonra, hacim 100 ml ye destile su ile tamamlanır.

Temiz bir lam üzerine 1-2 damla su bırakıldı. Bir günlük bakteri kültüründen 1-2 damla lam üzerinde su ile karıştırılıp yaydırıldı. Daha sonra lam havada kurutulup alevden geçirilerek fikse edildi ve sonra lam kristal viyole şalesinde 1 dak. tutuldu. Boya döküldükten sonra lam üzerine lügol çözeltisi damlatılıp 1 dak. beklendi ve lügol çözeltisi döküldükten sonra lam kurutuldu. Lam % 96 lık etil

alkole daldırılıp çıkarıldı. Daha sonra lam saf su ile yıkanıp kurutma kağıdı ile kurutuldu. Karbol fuksin lam üzerine damlatıldıktan sonra 0.5 dak. boyama yapıldı. Lam su ile yıkanıp kurutma kağıdı ile kurutulup mikroskopta inceleme yapıldı.

Değerlendirme: Mikroskop altında inceleme esnasında bakterilerin mavi veya mor renkte görülmesi durumunda bakteriler Gram-pozitif, pembe renkli görülmesi durumunda ise bakteriler Gram-negatif olarak değerlendirildi (ÖZÇELİK, 1998).

BAKTERİLERDE SPOR BOYAMA: Spor boyama için hazırlanan preparatlar önce karbol fuksin ile ısıtılarak boyandı ve daha sonra % 10'luk nitrik asit ile 10 sn muamele edildi. Metilen mavisi ile 2 dak. boyanan preparatta bakterilerin spor özellikleri mikroskop altında incelendi.

SODYUM HIPPURAT DENEYİ: Hippurat hidrolizi testinde her bir bakteri için 3 tüp hazırlandı.

1.tüp: 9ml besi yeri +1ml inokulum (gece boyunca üretilmiş genç bakteri içeren besi yeri)

2.tüp: 9ml besi yeri +1ml inokulum +Sodyum Hippurat (10 gr/lt)

3.tüp: 10 ml besi yeri +Sodyum Hippurat (10 gr/lt)

Her 3 bakteri için tüpler yukarıdaki gibi hazırlandıktan sonra tüpler 5 ve 10 gün için inkübatörde tutuldu. 5. gün 0.22 µm'lik filtre (Millex GP) ve şırınga kullanılarak tüplere hippuratlı besiyerlerinden 1 ml bırakıldı. Tüplerin üzerine % 50' lik H₂SO₄' ten 1.5 ml eklendi. Reaksiyon için 15-20 dak. beklendi. 2. tüplerde kristal oluşumu kontrol edildi (GORDON ve PANG ,1973).

Değerlendirme: Çalkalama esnasında erimeyen çökelti gözlenmesi durumunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi.

OKSİDAZ AKTİVİTESİ: % (v/v) tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür' den bir damla ile filtre kağıdının ortası ıslatıldı. Bunun üzerine öze ile bir günlük bakteri kolonisinden alınan bakteri kültürü filtre kağıdının üzerine yayıldı. 10 sn içinde koyu mor bir rengin oluşması gözlemlendi.

Değerlendirme: Koyu mavi bir rengin 10 sn içinde oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (KOVACS, 1956).

LİZOZİM DUYARLILIĞI: Her bakteri için 9 ml besi yeri +1ml inokulum içeren kontrol tüpü ve 9 ml besi yeri +1ml inokulum +0.9 ml (% 0.001gr) lizozim içeren tüpler hazırlandı.Tüpler 1-3 gün inkübe edildi. Sonuçlar 470 nm'de spektrofotometrik olarak okunarak kontrolle karşılaştırıldı (GORDON ve PANG, 1973).

KATALAZ TESTİ : Her bir bakteri için 9 ml besi yeri +1 ml inokulum içeren tüpler bir gün inkübatörde tutuldu. Bu bakteri numunelerinden 5 ml alınıp cam tüplere bırakıldı.Bu tüplere % 3 oranında 10 ml olarak hazırlanmış H₂O₂ ' den yaklaşık 5 damla ilave edildi. Tüpler baloncuk oluşumunu gözlemek için hafifçe karıştırıldı.

Değerlendirme: Gaz çıkışının olması veya baloncuk gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (SKERMAN, 1967).

SODYUM AZİD DUYARLILIĞI: Her bir bakteri için 9 ml besi yeri +1 ml inokulum +0.006 gr. sodyum azid (% 0.02) içeren tüpler hazırlandı. Tüpler 1 ve 3 gün inkübatörde tutuldu. 470 nm' de absorbans değerleri okunarak kontrolle karşılaştırıldı (GORDON ve PANG ,1973).

NaCl TOLERANSI: % 3 ve % 5'lik NaCl 'de üreme olup olmadığını test etmek için her bir bakteri için 9 ml besi yeri +1ml inokulum +%3 veya % 5 oranında NaCl içeren tüpler hazırlandı. Hazırlanan tüpler 1 ve 3 gün inkübatörde tutuldu. 470' nm de absorbans değerleri okunarak kontrolle karşılaştırıldı. Gerekli durumlarda bu değerler artırılarak NaCl tolerans sınırları tespit edildi (GORDON ve PANG ,1973).

HAREKETLİLİK VE OKSİJEN GEREKSİNİMİ : % 4 oranında agar içeren NB besi yeri hazırlandı ve 121 °C de 20 dak. otoklavlandı. Her bir bakteri için agarlı NB' den 50 ml'lik tüplere 15 ml bırakıldı. Öze ile 24 saatlik petrideki genç bakteri kültüründen agarlı besi yerine dik bir şekilde batırma yöntemi ile ekim yapıldı. Numuneler bir gün inkübe edildi.

Değerlendirme: Agarlı besi yerinin alt kısmında radyal şekilde üremenin olması durumunda bakteriler hareket yeteneğine sahip olarak değerlendirildi. Bakterilerin oksijene gereksinimi, üremenin inokülasyon hattının tüm kısmında görülmesi

sebebiyle fakültatif anaerob olarak değerlendirildi (ALEXANDER ve STRETE, 2001).

NİŞASTA HİDROLİZİ :

10 gr. patates nişastası 50 ml. saf suda çözdürüldü



1000 ml NB besi yeri +% 2 oranında agar hazırlandı



Agarlı NB ile çözüldürülmüş nişasta karıştırılıp 121°C de 15 dak. otoklavlandı



Agarlı NB içeren petrilere bir günlük bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ekim yapıldı↓

Petriler 1-3 gün inkübe edildi



Lügol 1/5 oranında seyreltildi



Petrilerin yarısındaki koloniler alındı. Petrilere saf su ile seyreltilmiş lügolden yaklaşık 3 ml döküldü

Değerlendirme: Koloninin alındığı yerin sarı renk görülmesi hidrolizin varlığı ile değerlendirildi (COWAN ve STEEL, 1974).

TİROZİN DEĞREDASYONU :

10 ml distile suda 0.5 gr L-Tirozin çözdürüldü



Çözdürülmüş L-Tirozin ve 100 ml agarlı besi yeri 121°C de 20 dak. steril edildi



Tirozin ve NB besi yeri steril şartlarda karıştırıldı



Her bir bakteri için 50 ml lik tüplere 10 ml Tirozinli NB besi yeri bırakıldı



Tüplere bir günlük bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ekim yapıldı



Tüpler 1-3-5 ve 10 gün inkübatörde tutuldu



Tüpler kontrol tüpüne göre değerlendirildi

Değerlendirme: Kontrol tüpüne göre L-Tirozinli tüpte daha koyu rengin oluşması durumunda L-Tirozin degradesyonu pozitif olarak değerlendirildi.

JELATİN HİDROLİZİ: 12 gr jelatin ve 100 ml NB besi yeri 50 °C de karıştırıldı. Jelatin iyice çözüldürüldükten sonra pH 7'ye ayarlandı ve 121 °C de 20 dak. otoklavlandı. Her bakteri için tüplere 9 ml jelatinli besi yeri ve 1 ml inokulum yapıldı. Tüpler 1-3 gün inkübatörde tutuldu. Değerlendirme için tüpler kontrol tüpler ile birlikte buzdolabında 1 saat tutuldu.

Değerlendirme: 1 saat sonunda katı olan tüpler için jelatin hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi.

NİTRAT VE NİTRİT REDÜKSİYONU :

Reaktif (1): % 8 (w/v) sülfanilik asit +5N asetik asit

Reaktif (2): % 0.6 (w/v) dimetil - α -naftilamin +5N asetik asit

Besiyeri (a): 0.8 gr NB+ 0.001 gr NaNO₂

Besiyeri (b): 0.8 gr NB+ 0.1 gr KNO₃

100 ml besiyeri (a) ve 100 ml besiyeri (b) hazırlandı



Her iki besi yeri 121 °C de 20 dak. otoklavlandı



Her bir bakteri için besiyeri (a) ve besiyeri (b) yi içeren tüplere bakteri ekimi yapıldı ve tüpler 1 gün inkübe edildi



Besiyeri (a) içeren ve besiyeri (b) içeren tüplerden 5 ml alınıp 2 tane cam tüpe aktarıldı (2 tane kontrol tüp kullanıldı)



Tüplerin her ikisine 0.5 ml reaktif (1) den ve 0.5 ml reaktif (2) den bırakıldı.

Değerlendirme: Kontrol tüpüne göre sonuçlar değerlendirildi. NaNO₂ kullanımı için kontrol tüpü pembe ve besiyeri (a) yı içeren tüp sarı olması durumunda NaNO₂ kullanımı pozitif olarak değerlendirildi. NO₃ kullanımı için kontrol tüpü sarı ve besiyeri (b) yı içeren tüpün kırmızı veya koyu pembe olması durumunda NO₃ kullanımı pozitif olarak değerlendirildi.

KAZEİN TESTİ: Petri kutularına 10 ml NB agar döküldükten sonra katılaştıran besiyerinin üzerine 15 ml' lik süt tozu içeren agarlı katı besiyeri (Süt tozu 115 °C 10 dakika ve % 3 agarlı NB besiyeri 121 °C 15 dakika ayrı ayrı sterilize edilip soğutulduktan sonra karıştırılarak hazırlandı) bir tabaka halinde ilave edildi. Taze kolonilerden bu petrilere yayma yöntemi ile ekim yapıldı. Kazein hidrolizi 1-3 günlük inkübasyondan sonra agar üzerinde açık saydam görünümlü zonların oluşumu ile tespit edildi (GORDON ve PANG ,1973).

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ: Antibiyotik duyarlılık testi iki farklı yöntemle test edildi.

*1.Yöntem:*700 ml agarlı besi yeri hazırlandı. Besiyeri 121 °C de 20 dak. otoklavlandı. Besiyeri içeren petrilere antibiyotik diskleri (6 mm, Oxoid) yerleştirildi ve disklerin üzerine 1 damla bir günlük bakteri kültüründen bırakıldı. Petriler 1-2 gün inkübatörde tutuldu.

Değerlendirme: Diskler etrafında bakteri üremesi olduğu durumda antibiyotik duyarlılığı negatif olarak değerlendirildi.

2. Yöntem: Besi yeri içeren petrilere yayma yöntemiyle bakteri ekimi yapıldı ve kuruyan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirildi. Petriler 1-2 gün inkübatörde tutuldu.

Değerlendirme: Disk etrafında boş bir zonun oluşması durumunda antibiyotik duyarlılığı pozitif olarak değerlendirildi.

KARBON KAYNAĞI KULLANIMI: Bakteri izolatlarının karbon kaynaklarını kullanma yeteneklerini ortaya çıkarmak için bakterilerin üremelerinin minimum

olduğu minimal besi yeri hazırlanarak Tablo 3.1’de gösterilen % 1 oranında karbon kaynakları ilave edildi.

Tablo 3.1. Kullanılan karbon kaynakları.

Monosakkarid	Disakkarid	Trisakkarid	Diğer
Glikoz	Sakkaroz	Raffinoz	Propiyonik asit
Ksiloz	Maltoz		Sodyum sitrat
Galaktoz	Sellobioz		Sodyum asetat
Fruktoz	Laktoz		Etanol
Mannoz	Trehaloz		
Riboz			
Arabinoz			
Gliserol			

Minimal besi yeri hazırlandı (0.2 gr /lt yeast ekstraktı, 0.5 gr/lt pepton, 5 gr/lt NaCl)



Her şekerden 200 mg alınıp ayrı ayrı 2-3 saat steril edildi



Steril şartlarda 200 mg veya 200 µl (sıvılar için) karbon kaynakları +20 ml minimal besiyeri içeren tüpler hazırlandı. İki ayrı tüpe 10 ml olarak taksim edildi



Farklı şekerleri içeren tüplerin pH’ları ölçüldü



Her bir tüp için 1ml inokulum ve 9 ml minimal besiyeri+ karbon kaynağı içeren tüpler hazırlandı



Tüpler 2-3 gün inkübatörde tutuldu



470 nm'de absorbanlar okundu



Kontrole göre tüpler değerlendirilerek uygun tüpler için 2. aşamaya geçildi. 2. aşamaya geçen tüplerden 2 ml alınıp 8 ml minimal +karbon kaynağı içeren tüpe eklendi ve bir gün sonra 470 nm'de absorban değerleri okundu.

3.1.6. Lipit Analizi

Kullanılan çözeltiler:

Dittmer ve Lester

Solüsyon A:1 litre H₂SO₄ (25 N % 70 v/v) e 40.11 g MoO₃ ilave edilir ve MoO₃ bitinceye kadar kaynatılır.

Solüsyon B:500 ml solüsyon A'ya 1.78g Mo ilave edilir ve 15 dak kaynatılır. Soğuyan karışımdan 50 ml ve solüsyon A dan 50ml 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

H₂SO₄: 6.5 ml

Etil alkol: 40.5 ml

Destile su: 4.0 ml

α-Naftalin 10.5 ml etil alkol de çözündürülür ve bu karışıma H₂SO₄, etil alkol ve su karıştırılır.

Ninhidrin:

Ninhidrin: 0.2 g

Etil alkol: 100 ml.

Ce (SO₄)₂

120 ml H₂SO₄ destile su ile 1000 ml ye tamamlanarak hazırlanır.

Lipit analizinde kullanılmak üzere her bir bakteri için 1.5 litre NB besi yeri hazırlandı (NB: 13gr / lt). Bakteriler bir gün inkübatörde tutuldu. Bakteri kültürü 50 ml lik tüplerde 7000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Pelet kısmı ayrı bir tüpte toplandı. Tüm peletlerin olduğu tüp 2 defa saf su ile yıkanıp 7000 rpm' de 10 dak. santrifüj edildi. Darası alınmış tüpteki yaş bakterilerin ağırlığı ölçüldü ve bakteriler 60 °C 'de kurutuldu.

Tablo 3.2. Lipit analizi için kullanılan bakteri miktarları

Bakteri varyeteleri	Besiyeri (ml)	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık(g)
KG5	650	4.233	0,442
KG8	1500	8.644	0,438
KG9	1500	11.065	0,918

Besiyerinde üretildikten sonra kurutulan bakteri numunelerine (Tablo 3.2) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4) ilave edildikten sonra 24 saat karıştırıcı üzerinde tutuldu. Süpernatant kısmı filtre edildikten sonra rotavapordan (40°C) geçirildi. Numune $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4) tamponuyla yıkandı ve N_2 altında kurutulan numunelere 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4) ilave edildi. 20x20 ebatındaki TLC'lere (Thin Layer Chromatography, Silika jel 60F₂₅₄, 0.25 mm, Merck) bu numuneler ve standartlar (*Thermus* ve *Bacillus* türlerine ait) uygulandı. Uygulanan bu numuneler 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, *Thermus* ve *Bacillus* 'a olan benzerlikleri analiz edildi.

Bakterilerin içerdikleri fosfolipit ve glikolipitleri daha belirgin bir şekilde analiz etmek için iki yönlü TLC'ler (20x20 ebatlarda) kullanıldı (Nicolaus ve ark. 2001).

3.1.6.1.Fosfolipit Analizi

İki yönlü TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ile 8 tane fosfolipit standartı kullanılarak bakterilerin içerdikleri fosfolipit çeşitleri tespit edildi. Bunun için 10x10 ebatındaki TLC' lere bakterilere ait numuneler ve 8 farklı fosfolipit standartı (1/1)

uygulandı. Kullanılan standartlar: 1(3-sn-fosfatidil)-rac-gliserol) sodyum klorür, bovine heart cardiolipin disodyum tuzu, phospmatidylethanolamine, bovine brain 3-sn-fosfatidil L-serin, -rac-1,2, dipalmitol-gliserol-3-fosfoetanolamine, 1-2 dipalmitol-sn-gliserol-3-fosfocolinmonohidrat, DL- α -fosfoasidik asit dipalmitol ve sfingosilfosforil colin (Sigma).

3.1.6.1.Fosfo-glikolipit Analizi

Bakterilerin fosfo-glikolipitleri, 10x20 ebatlardaki TLC'ler ikiye bölünerek fosfolipit ve glikoliptler için ayrı ayrı kimyasallarla muamele edilerek tespit edildi.

3.1.6.1.Yağ Asidi Analizi

Kurutulan bakteriler bir gün karıştırılıp süzdürülüp rotavapordan geçirildi (40 °C)



Azot altında kurutulup ağırlıkları tespit edilen numunelere 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4) ilave edildi



Numuneler azot altında kurutuldu



İçinde 20 mg lipit olan tüplere $\text{CH}_3\text{OH} / \text{HCl}$ (9/1) den 1 ml bırakıldı



Tüpler 24 saat 75 °C'de tutuldu



Tüpler azot altında kurutulup 4 kez metanolla yıkandı



Tüplere 100 μl metanol ilave edildi



Yağ asidi standardına (*Metilici abano* esteri) 200 μl CHCl_3 ilave edildi



5x10 ebatındaki TLC'ye bakteri numuneleri ve standart uygulandı



TLC Exan /etil asetat (96/4) te yürütüldü



Solventten çıkarılan TLC 5 dak. I₂ ile muamele edildi
 ↓
 Oluşan bantlar çizildi
 ↓
 TLC Ce (SO₄)₂ ile muamele edildi

Bakteri numunelerini içeren tüpler Azot altında kurutulduktan sonra bu tüplere 500µl CHCl₃ ve 500µl CH₃OH ten 100 µl bırakıldı. 3 tane 20x20 ebatındaki preparatif TLC'ye (Silica jel 60F₂₅₄, 0.5 mm, Merck) standart (*Metilici abano* esteri) ve numuneler uygulandı. TLC'ler hexan/etil asetat (96/4 ml) solventinde yürütüldü. TLC'ler I₂ ile muamele edildikten sonra oluşan bant kazınılarak içinde silika (0.040-0.063 mm) olan cam kolona dolduruldu. Kolon 50 ml CHCl₃/CH₃OH (25/25 ml) ile yıkandı. Azot altında kurutulan numunelerin ağırlıkları tespit edildi. Bakterilerin içerdiği yağ asitlerinin tiplerini ve miktarlarını tespit etmek için numuneler GC-MS (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi) ile analiz edildi (NICOLAUS ve ark. 2001).

3.1.7. Kinon Analizi

Bakterilerdeki kinonların varlığını tespit etmek için besiyerinde üretildikten sonra kurutulan bakteri numunelerine CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65/25/4) ilave edildikten sonra 24 saat karıştırıcı üzerinde tutuldu. Süpernatant kısmı filtre edildikten sonra rotavapordan (50 °C) geçirildi. Azot altında kurutulan numunelere 100-200 µl kloroform ilave edildi. 20x20 TLC'lere bu numuneler uygulandı. Uygulanan bu numuneler solventte (hexan/etil asetat (96/4 ml) yürütüldükten sonra TLC'ler üzerindeki kinon bantları UV altında tutularak işaretlendi. Daha sonra Ce (SO₄)₂ ile muamelesi ile kinon bantları tespit edildi.

Kinon saflaştırılması için 3 bakteriye ait azot altında kurutulmuş numunelere CHCl₃/CH₃OH (1/1ml) den 1 damla ilave edildi. Numune spotlanmış TLC'ler hexan/etil asetat (96/4 ml) solventinde yürütüldükten sonra elde edilen bantlar

kazılarak, silika içeren cam kolon bırakıldı. Kolon 50 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (25/25 ml) ile yıkandı. Azot altında kurutulan numunelerin ağırlıkları tespit edildi. Bakteri numunesi içeren şişelere 100 µl kloroform bırakıldı. Bakteri numunesinden 5 µl alındı ve HPLC'de (Yüksek Performans Likit Kromatografisi) sisteme enjekte edildi. HPLC'leri (akış oranı 1ml/1dak., λ 254 nm, 100 Rp-18.5 µm ve kullanılan kolon: LiChroCART HPLC Cartridge 100Rp-18.5 µm) yapılarak kinonların saflıkları test edildi (NICOLAUS ve ark. 2001).

Azot altında kurutulmuş bakteri numunelerine kloroform-d 99.8 atom % D' den 700 µl bırakıldı. Bu karışım özel NMR tüpüne bırakıldı. Numunelerin ^1H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), (300 MHz) analizleri yapıldı. NMR analizi sonucunda elde edilen pikler, kinon tiplerinin verdiği spesifik pik değerleri ile karşılaştırarak bakterilerin kinon tipi belirlendi.

NMR analizi ile bakterilerin kinon tipleri belirlendikten sonra LC- MS ile kinonların içerdiği izopren üniteleri tespit edildi. Bunun için NMR analizinden sonra ağırlıkları belli olan bakteri numunelerine net ağırlıkları oranında kloroform ilave edilip LC-MS (Likit Kromatografisi /Kütle Spektrometresi) ile kinonların ağırlıklarının tespiti için analiz yapıldı (% 100 metanol, akış oranı 1.2 ml/dak., Reverse Phase C 18 kolonu, 254 nm. dalga boyu).

3.1.8. rRNA Dizi Analizi

rRNA dizi analizi için katı besi yerinde üremiş bir günlük bakteriler alınarak Genomik DNA ekstraksiyonu yapıldı (Poli ve ark. 2006) ve sonra 16S rRNA'nın PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin saflaştırılması RAINEY ve ark. 1994;1996, tarafından açıklanan yöntemle gerçekleştirildi. Saflaştırılan PCR ürünlerinin Taq Dye-DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems) kullanılarak dizileme (sequencing) yapıldı. Dizi reaksiyonları Applied Biosystems 373A DNA Sequencer kullanarak elektroforetik olarak analiz edildi. Bakteri izolatlarını teşhis etmek için 16S rDNA dizileri belirlenen KG5, KG8 ve KG9 ve yakın türler arasındaki 16S rRNA benzerlik değerleri, hem EMBL-EBI

(European Bioinformatics Institute) nükleotit dizileri veri bankasından hem de GenBank (NCBI Blast-nucleotide sequencing) veri tabanından elde edildi.

Filogenetik ağaç oluşturmak için veri tabanından elde edilen 16S rRNA gen dizi benzerlikleri (16 S rRNA gene similarity) oranları girilen bir program kullanıldı (PHYLIP package), (FELSENSTEIN, 1993). JUKES ve CANTOR (1969) yöntemiyle mesafe matrisi hesaplandıktan sonra filogenetik ağaç neighbour-joining metodu ile çizildi.

3.2. *ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS* SUBSP. *RITTMANNII*'NİN İNTRASELLÜLER β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

3.2. 1. Kimyasal Maddeler

o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) ve 6-Bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside (BNG), Diazo blue B, Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve laktöz Sigma'dan temin edilmiştir.

3.2.2. Biyolojik Materyal

β -Galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan termoasidofilik *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* İtalya'nın Ulusal Araştırma Merkezi Biyomoleküler Kimya Enstitüsü'nde görev yapan Barbara Nicolaus ve ekibi tarafından Antartika'nın Rittmann dağının jeotermal topraklarından izole edilerek tanımlanmıştır (NICOLAUS ve ark.1998).

3.2.3. Enzim Saflaştırma Aşamaları

A. acidocaldarius subsp. *rittmannii*'nin intrasellüler β -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır.

1. Bakterilerin kültüre alınması.
2. Enzimin saflaştırılması.
 - a. Hücrelerin parçalanması ve ekstraksiyonu.
 - b. Amonyum sülfat ile çöktürme, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon.
 - c. Jel filtrasyon kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon
 - d. İyon -değişim(DEAE) kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon
 - e. Afinite kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon
 - f. Preparatif elektroforez
 - g. Enzim ünitesinin belirlenmesi ve tüm saflaştırma aşamalarında enzim spesifik aktivitesinin belirlenmesi
3. Enzimin özelliklerinin belirlenmesi
 - a. Elektroforetik analiz
 - b. Enzimin moleküler ağırlığının hesaplanması (FPLC ile gel filtrasyonu ve SDS-PAGE)
 - c. Optimum pH ve sıcaklık tespiti

3.2.3.1. Bakterilerin Kültüre Alınması

A. acidocaldarius subsp. *rittmannii* (Strain MR1)'nin kültüre alınması Nicolaus ve ark. 1998'e göre yapıldı. Kültürlere enzim indüksiyonu ve üretiminin artırılması için ayrıca laktoz ilave edildi. 24 saat 61 °C'de 90 litrelik biyoreaktör içerisinde % 1'lik laktoz içeren aşağıda bileşimi verilen 42 litrelik besi yerinde 56 gr yaş hücre üretildi (Santrifüj işlemi; 4 °C, 15 dak., 18.500xg).

Yeast extract (4g/l),

(NH₄)₂ SO₄ 1g/l,

KH₂PO₄ (2g/l),

2 ml/l A solüsyonu

2 ml/l B solüsyonu

(A solüsyonu: 125 g/l $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$,+ 50 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

(B solüsyonu: 62.5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

pH 0.1 M H_2SO_4 ile 3.6-3.8'e ayarlandı.

3.2.3.2. Enzimin Saflaştırılması

Bütün saflaştırma aşamaları aksi yazılmadığı durumlarda oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bütün kromatografik deneyler 500 ml' lik ultrafiltration system (Corning) kullanılarak elde edilen ultrapure sterilize su kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan tamponlar: (A) 0.1 M Tris HCl (pH 7), 30 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl ; (B) 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 mM MgSO_4 ; (C) 10mM Tris-acetate (pH 7.5), 10 mM MgSO_4 , 10 mM NaCl; (D) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl_2 ; (E) 50 mM Tris-HCl (pH 7.3), 1mM MgCl_2 ; (F) 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0).

Bütün saflaştırma aşamalarında her bir fraksiyondaki protein içeriği 280 nm ve enzim aktivitesi ise 405 nm'de ölçülmüştür.

A-Hücrelerin parçalanması ve ekstraksiyonu

Tampon A (175 ml)'da çözdürülen dondurulmuş 56 g hücre sonikatörde (Sonicator Ultrasonic Processor, Heat System) parçalandıktan sonra 4°C, 20 dak. 18.500 xg' de santrifüj işlemi yapıldı. Sonikatör ile hücre duvarı veya membranının bütünlüğü bozularak doku parçalandı. Öncelikle, sonikatör probu ısınmayı önlemek amacıyla buz altındaki örnek içine daldırıldı ve istenilen titreşim şiddeti (Power 5) ile ayarlanma yapıldı ve 4 kez birer dakika aralıklarla parçalanma gerçekleştirildi. Mikroskop altında hücre parçalanması teyit edildikten sonra santrifüj işlemi (4°C, 20 dak.18.500 xg) gerçekleştirildi ve elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak değerlendirildi.

B-Amonyum sülfat ile çöktürme

Hücre ekstraksiyonuna (175 ml) son konsantrasyon %50 [w/v] olacak şekilde karıştırıcı ve buz kullanarak yavaş yavaş amonyum sülfat (toplam 55.125 gr) ilave edilerek çöktürme işlemi sağlandı. Çökelti santrifüjlendikten sonra (4°C, 45 dak.18.500 xg) belirli bir miktarda B tamponuyla (40 ml) tekrar çözdürüldü.

Yeniden çözülen çökelek dikkate değer miktarlarda amonyum sülfat içerir. Genellikle bir sonraki aşamaya geçmeden önce bu uzaklaştırılmalıdır. Bu amaçla diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz işlemi için ilk önce diyaliz tüpü kaynar distile suda yumuşatıldı ve daha sonra enzim solüsyonu (40 ml) içerisine bırakılarak sıkıca bağlandı. Diyaliz işlemi 100 kat hacimde ki B tamponuyla gece boyunca 4 °C’de iki kez tampon değiştirilerek yapıldı.

Solüsyon içerisinde proteini daha fazla konsantre etmek için ultrafiltrasyon işlemi uygulandı. Amicon Ultrafiltrasyon Sistemi (Amicon YM10 membrane) kullanarak üstten tazyikli azot gazı altında ve buz kabı içerisinde konsantrasyon işlemi (toplam 4.5 ml) gerçekleştirildi.

C-Jel filtrasyon kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Diyaliz edilmiş enzim solüsyonu (1 ml) daha önce C tamponuyla kararlı hale getirilen (etanolda korunan kolon önce ultrapure su ile 3 saat ve sonra C tamponuyla 3 saat yıkandı) superdex 200 içeren bir kolona (40 cmx1.5 cm) uygulandı. Kolondan inen numuneler her bir tüpte 3 ml olacak şekilde 0.5ml/dak akış hızıyla enzim aktivitesi ve protein içeriklerinin belirlenmesi için toplandı (25 tüp). β -galaktozidaz içeren fraksiyonlar bir havuza alınarak (110 ml) ultrafiltrasyonla konsantre edilip (4 ml) 5 litre D tamponuyla gece boyunca diyaliz edildi.

D-İyon-değişim (DEAE) kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Hazır olarak alınan ıslatılmış (pre-wet) sellüloz ile doldurulan (24x1.5 cm) ve D tamponuyla karalı hale getirilen DEAE-sellüloz (DE52 Whatman) kolona önceki adımdan elde edilen enzim solüsyonu üstten ilave edildi. Kullanılan kolonun hacmine eş değerdeki D tamponuyla yıkandıktan sonra 1.5 ml/1 dak.akış hızı (3 ml fraksiyonlar) ile aynı tamponda 0-0.3 M NaCl'nin bir lineer gradiyenti ile yıkama (elüsyon) programı (50 ml D tamponu, 150 ml 0-0.3 M NaCl, 50 ml D tamponu) uygulandı. 0.16 M NaCl konsantrasyonunda kolondan yıkanan enzim fraksiyonları toplandı (34 ml). Toplanan fraksiyonlar ultrafiltrasyonla konsantre edildikten sonra (6 ml) E tamponunda gece boyunca diyaliz edildi.

E-Afinite kromatografisi, Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Önceki aşamadan (DEAE selüloz) elde edilen numune (2 ml) daha önce E tamponuyla yıkanan kolona (agarose-p-aminobenzyl-l-thio-β-D-galactopyranoside; 1x25 cm, Sigma) uygulandı. Kolon aynı tamponla bir kez daha yıkandı. 0.2 ml/dak. akış hızı (3 ml fraksiyonlar) ile aynı tamponda 0-1 M NaCl'nin lineer bir gradiyenti ile yıkama programı uygulandı (toplam 205 ml, 17 saat). 10 ve 100 mM borat tamponu ile 1 ml/dak akış hızı ile kolon yıkandı, fakat önemli oranlarda enzim aktivitesi elde edilemedi. Kolonda tutulmayan ve toplanan enzimce aktif fraksiyonlar (24 ml) F tamponunda diyaliz edilip ultrafiltrasyon ile konsantre edildi (2.2 ml).

Enzim kolondaki liganta bağlanmadığından veya çok zayıf bağlandığından daha sonra borat tamponu yerine %7.5' lik laktoz ve düşük tuz konsantrasyonu gibi alternatifler de kullanılarak proteinin saflaştırma derecesi artırılmak istendi fakat bu denemeler olumlu sonuçlanmadı.

F-Preparatif elektroforez

Homojen enzim elde etmek için preparatif PAGE (% 8) kullanıldı. Affinite kromatografisinden elde edilen enzim solüsyonu nativ PAGE ile çözünürleştirildi ve

β -galaktozidaza denk gelen enzim bandı jelden koparıldı (Fogel and Sypherd, 1968; Galvani ve ark. 2001). Kesilen jel parçası F tamponunda manuel olarak öğütüldü. Daha sonra jelden elute edildi. Enzim saflığı sonra hem nativ hem de SDS-PAGE ile kontrol edildi.

G- Enzim ünitesinin belirlenmesi ve tüm saflaştırma aşamalarında enzim spesifik aktivitesinin belirlenmesi

Tüm saflaştırma adımları en az iki kez tekrarlanmıştır. Tüm saflaştırma adımlarından sonra 200 μ l enzim solüsyonu alınarak enzim aktivitesi ve protein miktar ölçümleri için derin dondurucuya alındı. β - galaktozidaz aktivitesi, 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) içinde 1.5 mM O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside substratı (ONPG; Sigma; 18 mg/ml stok solüsyon) kullanılarak 65 °C de ölçüldü. Substrat (1ml) ilgili sıcaklıkta ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra enzim ilavesi (10 μ l) ile reaksiyon başlatıldı. 10 dakikalık inkübasyondan sonra 1 ml 1 M sodyum karbonat ile reaksiyon durduruldu. ONPG'nin termal hidrolizini dikkate almak için 1 ml tampon ve substrat içeren kör kullanıldı. 405 nm de okunan absorbans değerleri o-nitrofenol (ürün) konsantrasyonlarına dönüştürmek için, ONPG için elde edilen $4.376 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değerindeki millimolar extinction coefficient (C_{mM405}) sabitesinden faydalanıldı. Protein konsantrasyonları BSA standart olarak kullanılan Bio-Rad Assay Kiti yardımıyla tespit edildi.

Kinetik parametreler, 0.1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 6.0) 0.1-50 mM arasında değişen ONPG konsantrasyonları kullanılarak 65 °C'de ölçüldü. Kinetik parametre ölçümleri Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanarak yapılmıştır.

3.2.3.3. Saflaştırılan Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi

A- Nativ PAGE ile Elektroforetik Analiz

Saflaştırmanın çeşitli aşamalarından elde edilen aktif enzimatif fraksiyonlar ve ham preparasyon (crude extract) Laemmli'nin nativ PAGE elektroforez tekniği ile analiz edildi (Laemmli, 1970). Nativ PAGE tekniği şöyle uygulandı; 4 °C' de % 8

'lik iki paralel jel kullanılarak non-denatüre şartlar altında elektroforetik koşmadan sonra jellerden biri protein bantlarını tespit etmek için Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) ile boyanarak işleminden geçirildi, diğer jel ise bazı modifikasyonlarla daha önce tanımlanan metotlar (Güven ve ark.1994; Güven ve ark.1995; Vetere ve Paoletti, 1998; Becerra ve ark. 1998) kullanılarak β -galaktozidaz aktivitesi için boyandı. Aktivite jeli daha sonra %10 (v/v) metanol içeren 0.1 M sodyum fosfat pH 6.0 da % 0.025 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galaktopyranoside (BNG) de inkübe edildi. İnkübasyon 65 °C'de 30 dakika uygulandı. İnkübasyondan sonra distile suya % 0.125'lik diazo-blue B solüsyonunda 2-5 dak. tutuldu. Enzimin varlığı mor bir bandın oluşmasıyla tespit edildi. Daha sonra jel % 75'lik asetik asit içinde fikse edildi ve durulandı. Bu işlemlerden sonra jeller jel kurutucu aletinde 80 °C'de 2 saat (gel dryer) kurutuldu.

B-Enzimin Moleküler Ağırlığının Hesaplanması (FPLC ile gel filtrasyonu ve SDS-PAGE kullanılarak)

Enzimin denatüre haldeki molekül ağırlığı, Bio-Rad 'den alınan (fosforilaz b (94 kDa), serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), karbonik anhidraz (30 kDa), tripsin inhibitör (20.1 kDa) ve α -laktalbumin (14.4 kDa) gibi düşük moleküler ağırlıklı SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları kullanılarak SDS-PAGE tekniği ile belirlendi (Laemmli, 1970). Bunun için % 8'lik jelde, proteinler, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve boya çıkarma solüsyonu ile iyice yıkandıktan sonra, jel kurutuldu ve enzimin aldığı mesafe semilogaritmik bir skalada standart proteinlerle karşılaştırılarak belirlendi.

β -Galaktozidazın nativ şartlardaki moleküler kütesini hesaplamak için Bio-Rad'in standart proteinleriyle (thyroglobulin (669 kDa), γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), miyoglobulin (17 kDa), vitamin B12 (1.34 kDa) kalibre edilen ve 50 mM sodyum fosfat pH 7.0 ile kararlı hale getirilen FPLC Superdex 200 kolonu (30x1.5 cm) kullanarak yapıldı. Kolonun kararlı hale getirilmesi, yüklenmesi ve elusyyonu oda sıcaklığında 0.5 ml/dak. akış hızı ile yapıldı. Toplam 100 μ l enzim numunesi kolona enjekte edildi. Her bir standardın ve saf enzimin elusyon volumü (V_e ; yani proteinlerin yıkandığı fraksiyon) bilgisayar uyumlu FPLC aleti

(Amersham-Biosciences) ile 280 nm'de absorbansın ölçülmesiyle belirlenirken, β -galaktozidaz'ın V_e 'si ise aktivite ölçümü ile belirlendi. β -Galaktozidazın nativ moleküler ağırlığı, her bir standart proteinin log moleküller ağırlıklarının ilgili V_e ye karşı grafiğe geçirerek kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır (PISANI ve ark., 1990).

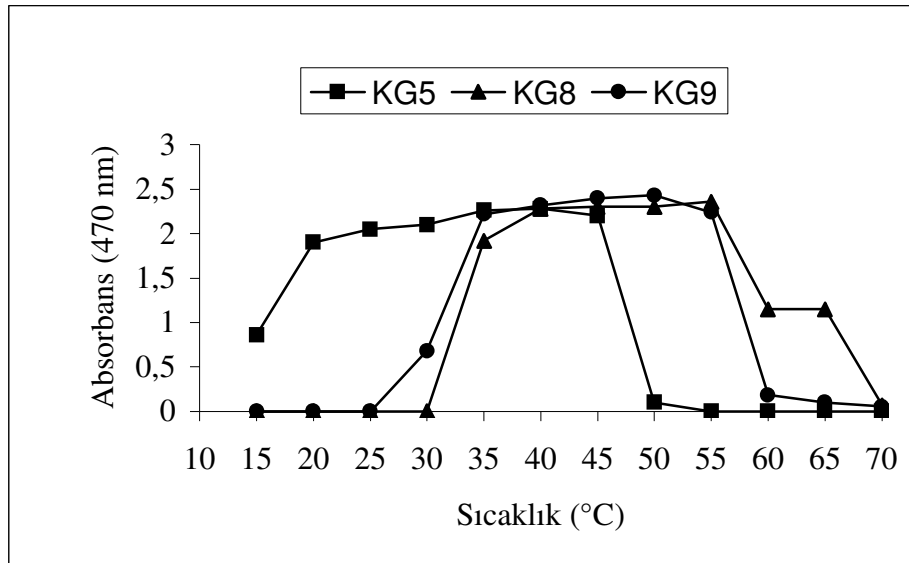
C- Optimum pH ve Sıcaklık Tespiti

β -Galaktozidaz enzimi üzerine pH etkisi 65 °C 'de pH 3.5-8.5 aralığında (0.1 M sodyum nitrat (pH 3.5-6.0) ve sodyum fosfat (pH 6.0-8.5) tamponu kullanılarak ve sıcaklık etkisi 0.1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 6.0) 35-95 °C aralığında test edilmiştir. Kullanılan substrat konsantrasyonu 1.5 mM ONPG. Tüm tamponlar enzim katılmadan önce istenen sıcaklıklarda ön ısıtmaya tabi tutuldu. Kuvars küvetler de sabit ısılarda tutuldu.

4. BULGULAR

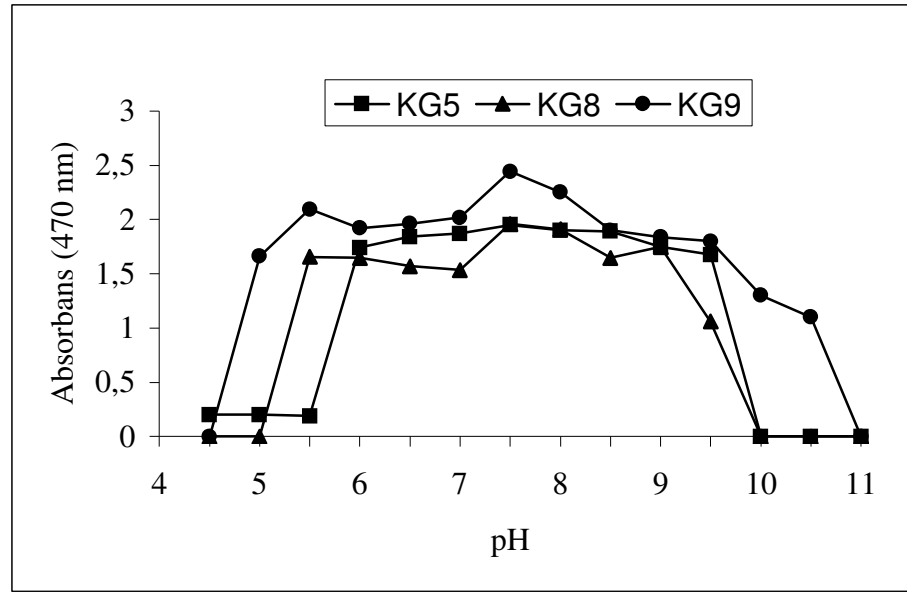
4.1. BAKTERİLERİN OPTİMUM ÜREME SICAKLIK VE OPTİMUM ÜREME PH DEĞERLERİNİN TESPİTİ

Materyal ve Metod'da belirtildiği gibi bakteri çoğalması 470 nm'de spektrofotometrik ölçümle tespit edildi. KG5'in üreme sıcaklık aralığı 15-45 °C, optimum üreme sıcaklığı 40 °C olarak tespit edildi. KG8'in üreme sıcaklık aralığı 35-65 °C, optimum üreme sıcaklığı 55 °C olarak tespit edildi. KG9'un üreme sıcaklık aralığı 30-55 °C, optimum üreme sıcaklığı 50 °C olarak tespit edildi (Şekil 4.1). Böylece, KG5'in mezofilik, KG8 ve KG9 izolatlarının ise ılımlı termofil bakteriler sınıfına girdikleri görülmektedir.



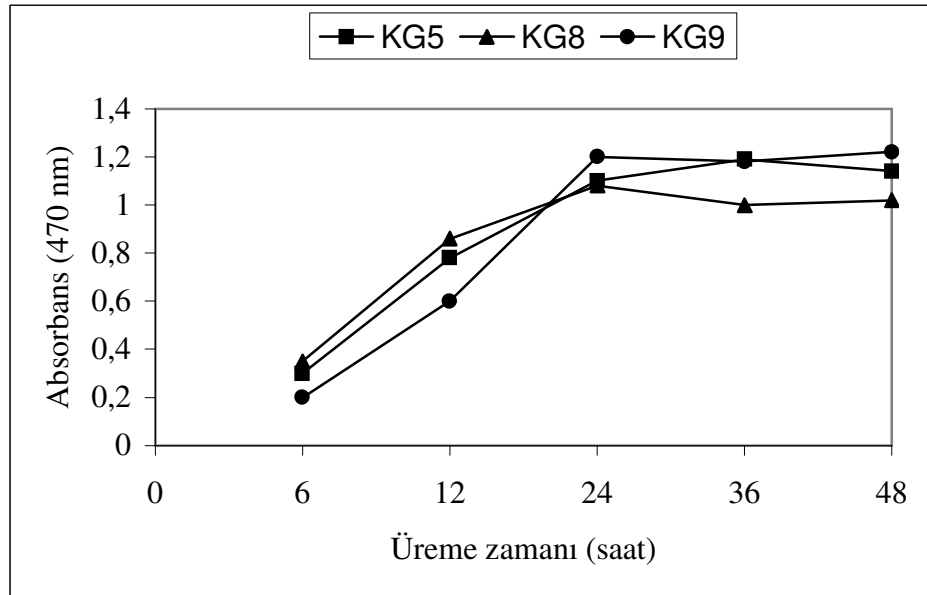
Şekil 4.1. Sıcaklığın Bakterilerin Üremesi Üzerine Etkisi

KG5'in üreme pH aralığı pH 6-9.5, optimum pH 7.5 olarak tespit edildi. KG8' in üreme pH aralığı pH 5.5-9.5, optimum üremenin ise pH 7.5 olduğu bulundu. KG9 için üreme pH aralığı pH 5-10.5, optimum pH ise 7.5 olarak tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pH'nın Bakterilerin Üremesi Üzerine Etkisi

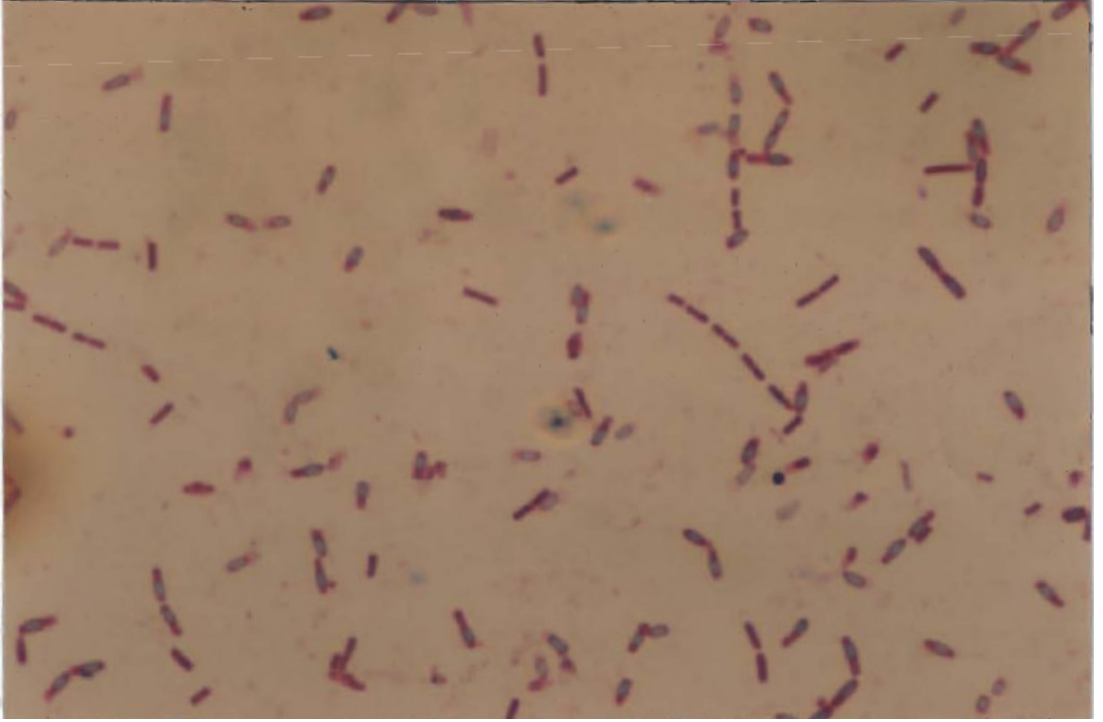
Şekil 4.3 izolatların optimum sıcaklık ve pH'da 6, 12, 24 ve 48 saatlerdeki üreme grafiğini göstermektedir.



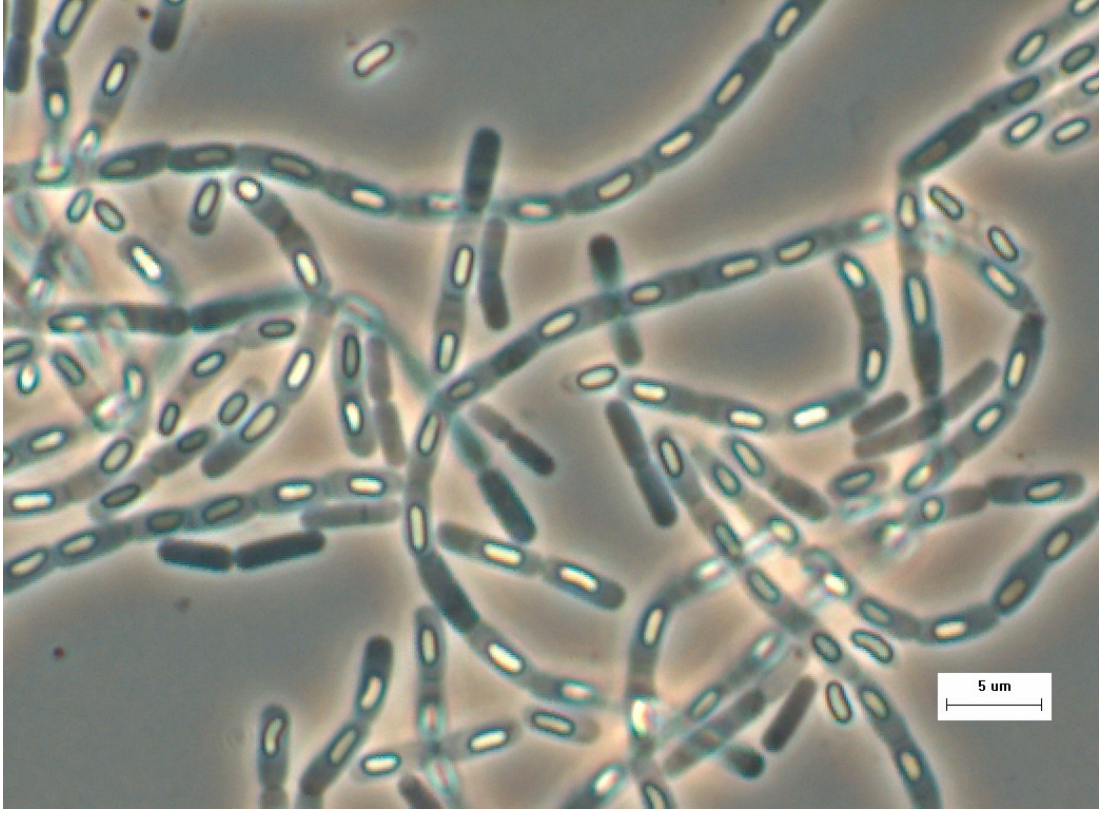
Şekil 4.3. Bakterilerin Zamana Bağlı Üreme Grafiği

4.2. MORFOLOJİK ANALİZLER

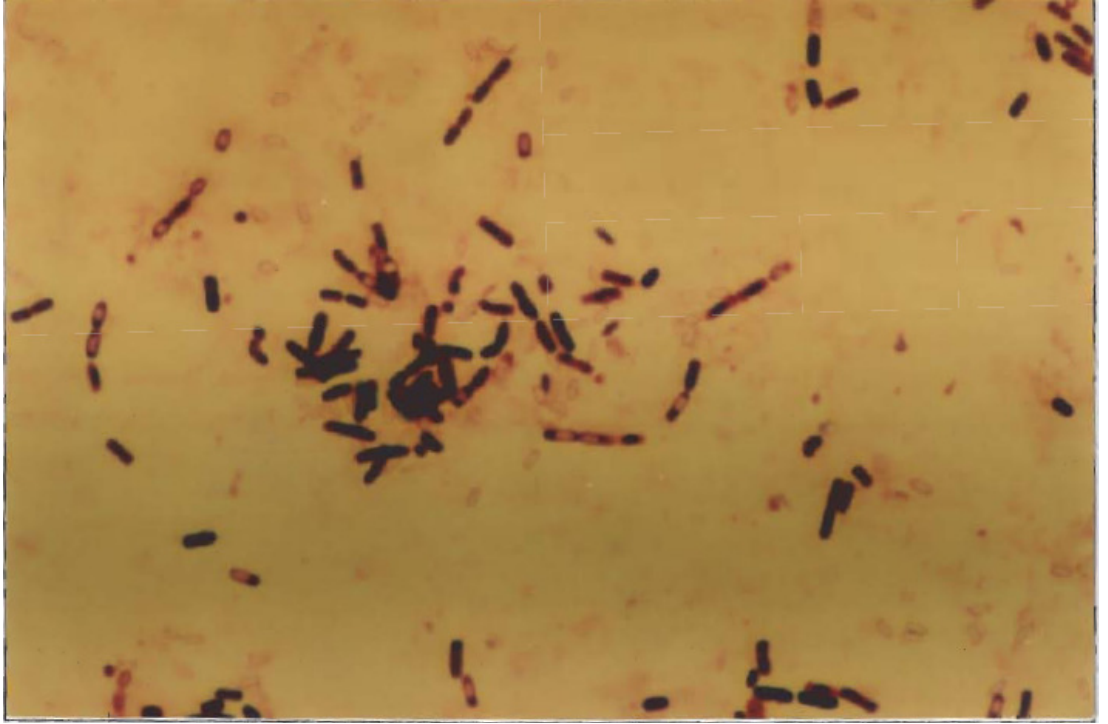
KG5' in endosporları oval şekilli, sentral konumlu (Şekil 4.4 ve 4.5), gram pozitif (Şekil 4.6), fakültatif anaerobik, hareketli, kolonileri düz mat ve pürüzlü olduğu tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.4. KG5'e ait Endospor Görünüşü



Şekil 4.5. KG5'in Mikroskopik Görüntüsü

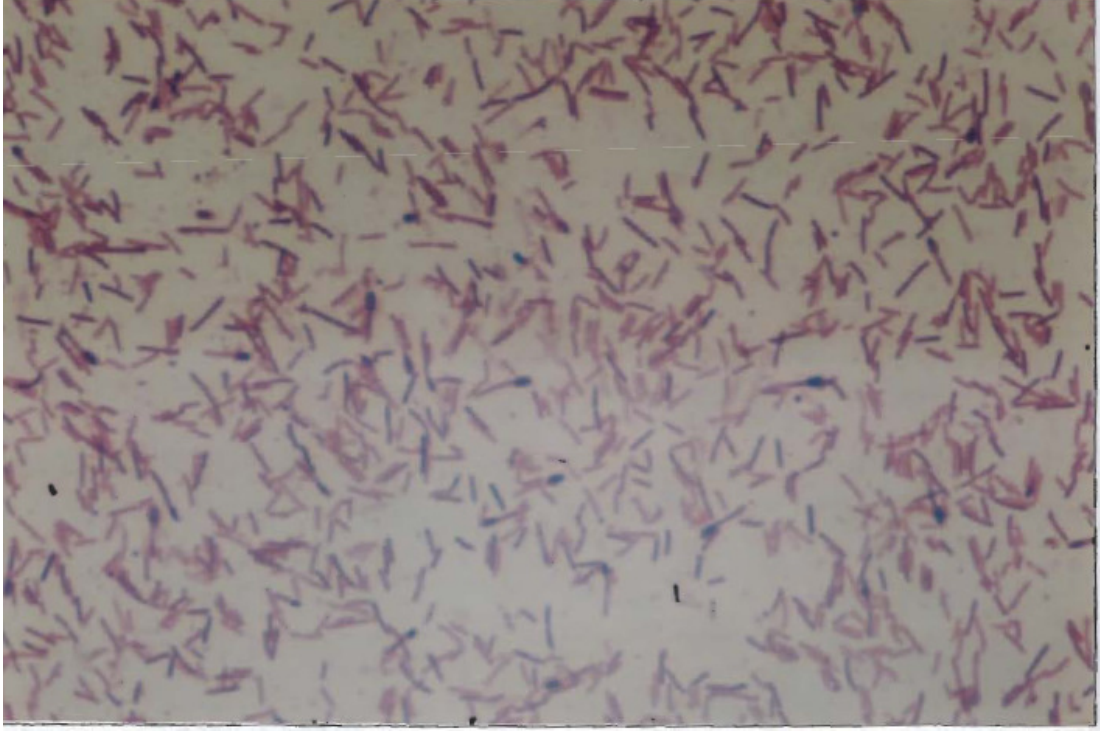


Şekil 4.6. KG5'in Gram Boyama Özelliği

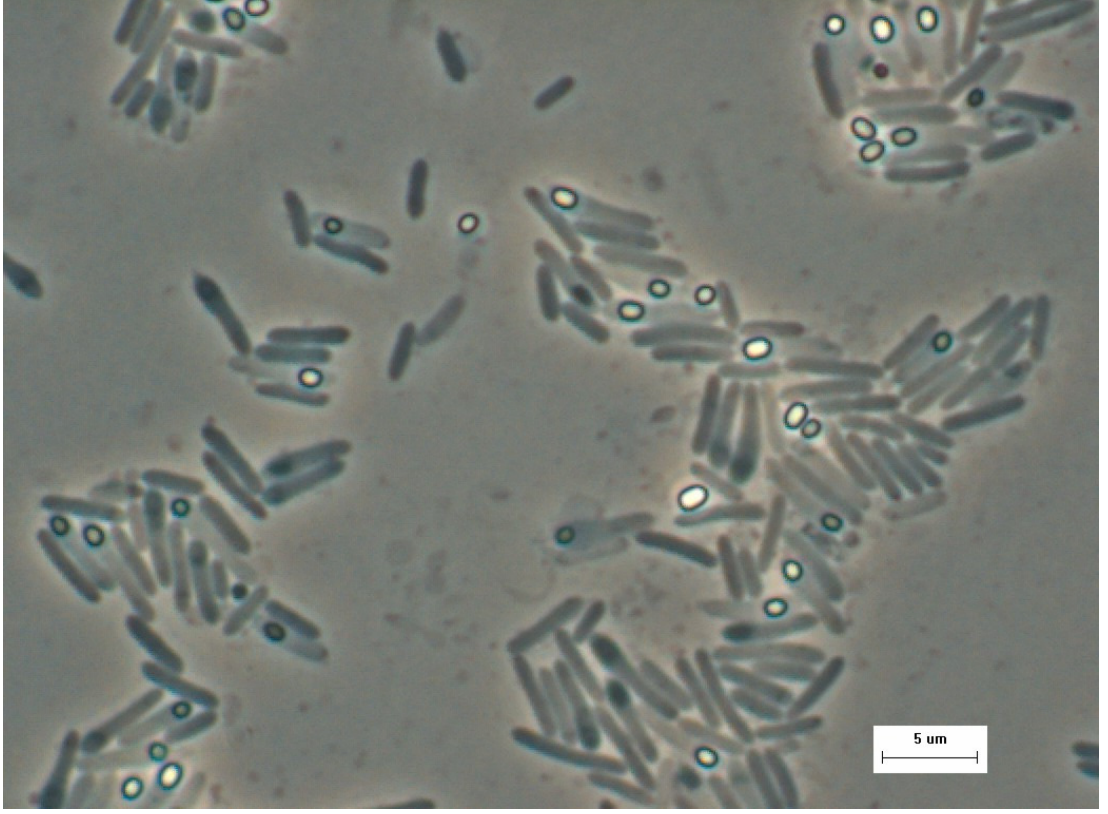


Şekil 4.7. KG5'in NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

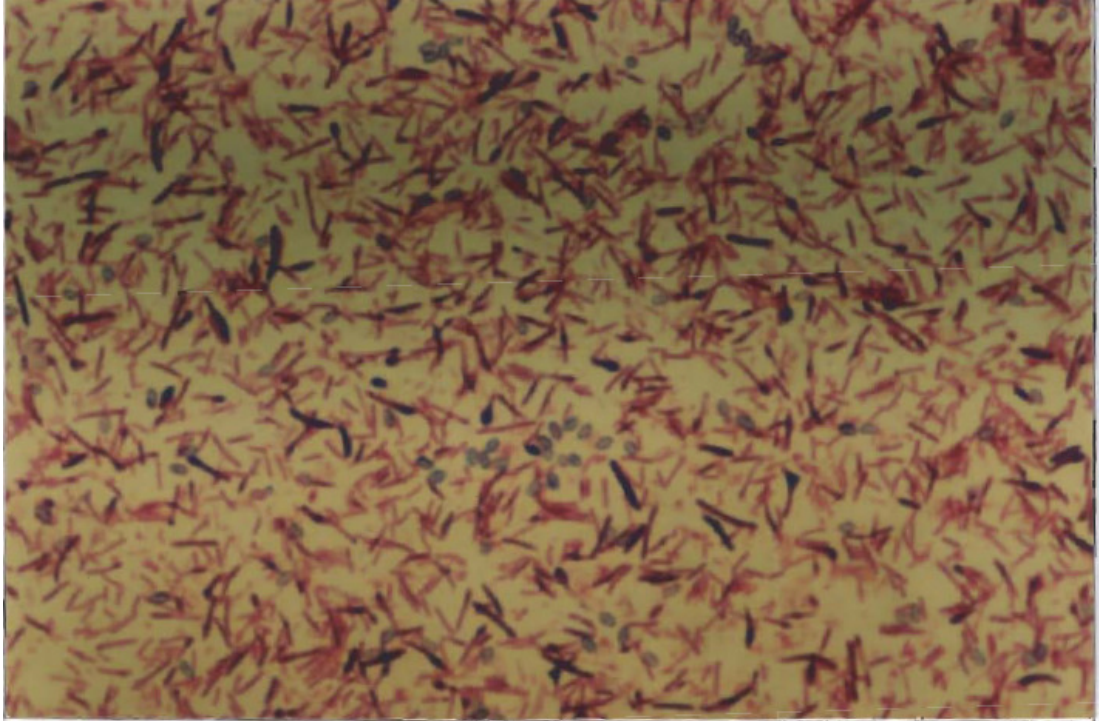
KG8'in endosporları oval şekilli, subterminal konumlu (Şekil 4.8 ve 4.9), gram pozitif (Şekil 4.10), fakültatif anaerob, hareketli, kolonileri düz mat ve pürüzlü olduğu tespit edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.8. KG8'e ait Endospor Görünüşü



Şekil 4.9. KG8'in Mikroskopik Görüntüsü

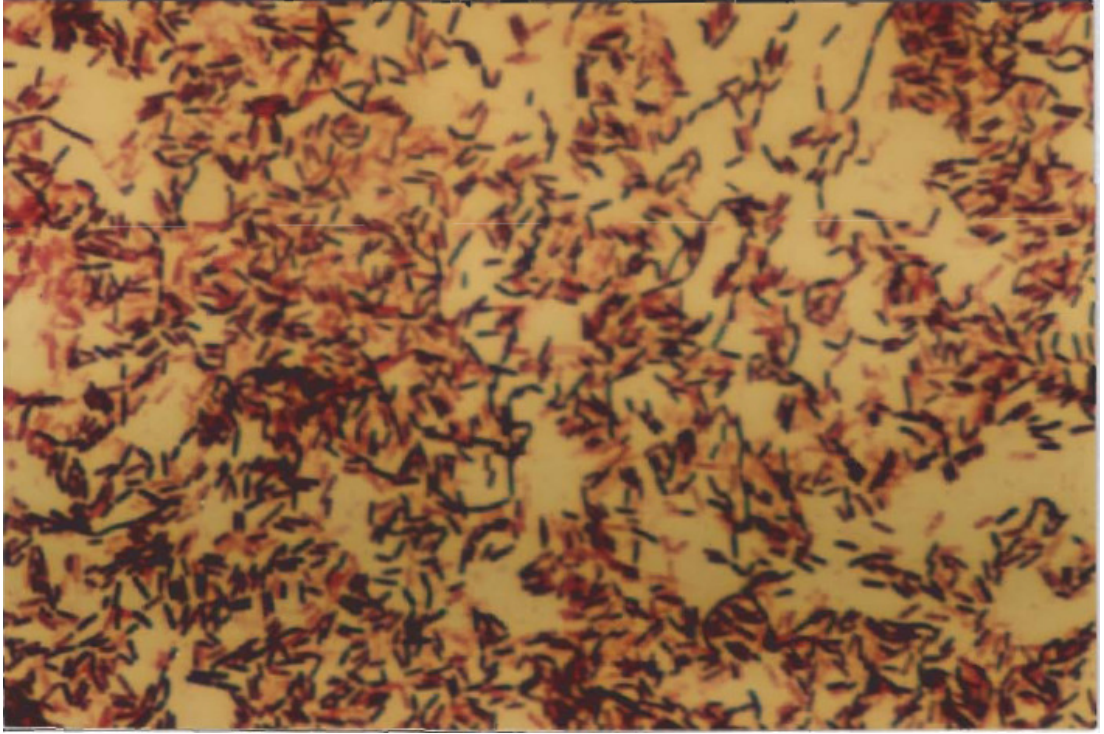


Şekil 4.10. KG8'in Gram Boyama Özelliği

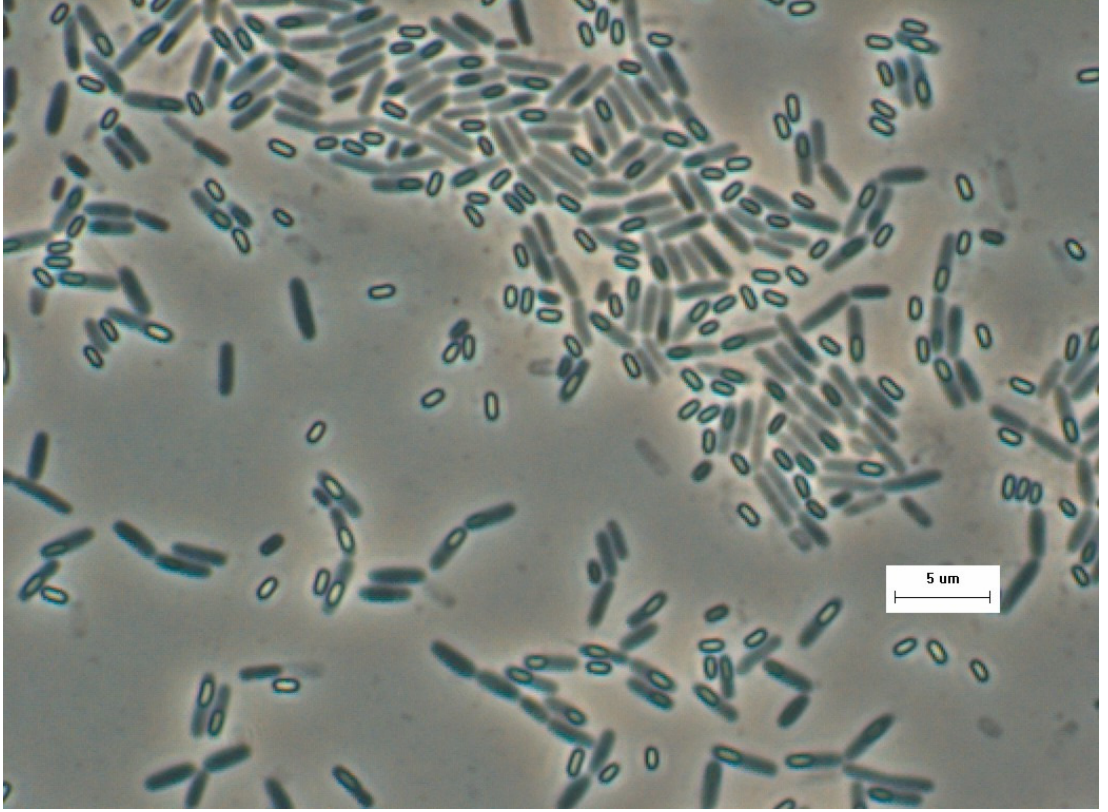


Şekil 4.11. KG8'in NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

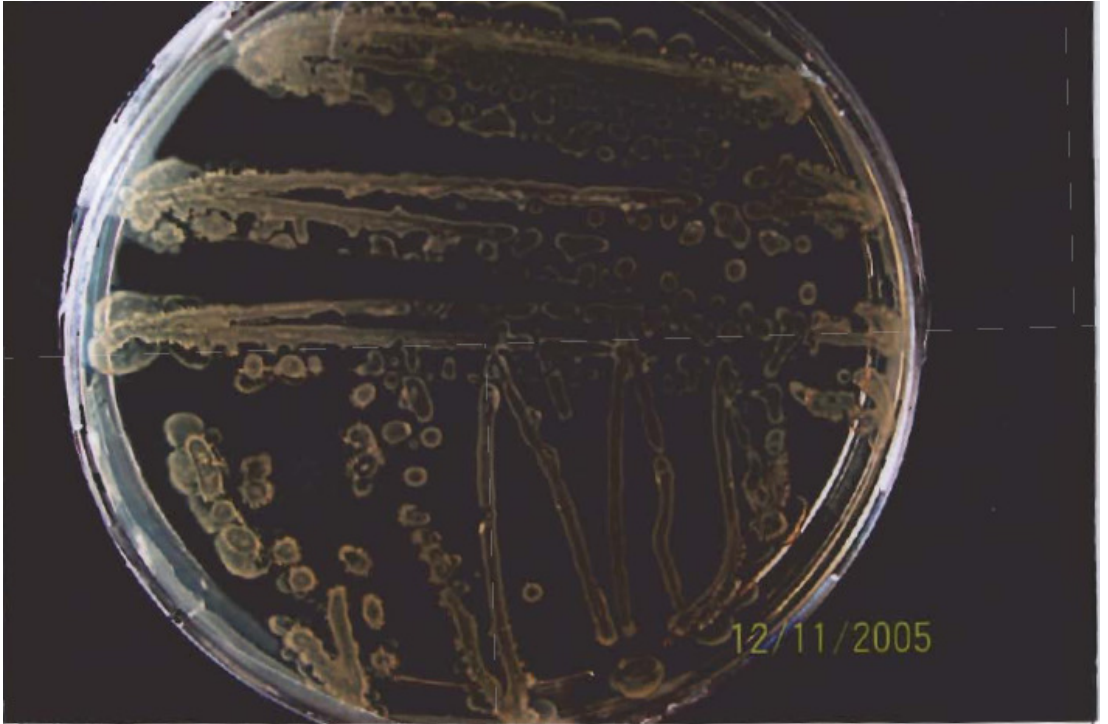
KG9'in gram pozitif (Şekil 4.12), fakültatif anaerob, hareketli, endosporları oval şekilli, subterminal veya paraterminal konumlu (Şekil 4.13), kolonileri düz mat ve pürüzlü olduğu tespit edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. KG9'un Gram Boyama Özelliği



Şekil 4.13. KG9'un Mikroskopik Görünümü



Şekil 4.14. KG9'un NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

4.3.BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK ANALİZLER

4.3.1.Karbon Kaynağının Kullanımı

Tablo 4.1'de KG5' in maltoz, fruktoz, sellobioz, riboz, sodyum asetat, propanoik asit ve sakkarozu karbon kaynağı olarak kullandığını, Tablo 4.2'de ise KG8'in galaktoz ve az oranda da sodyum asetat ve propanoik asiti karbon kaynağı olarak kullandığını açık bir şekilde göstermektedir. KG9'un maltoz, sellobioz, laktoz, ksiloz, rafinoz, sodyum asetat ve galaktozu karbon kaynağı olarak kullandığı tespit edildi (Tablo 4.3). Tablolarda verilen OD değerleri iki ayrı testin ortalamasını göstermektedir.

Tablo 4.1. KG5'in Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)

	<i>1. GÜN</i>	<i>2. GÜN</i>	<i>3.GÜN</i>	<i>SONUÇ</i>
<i>KG5 (Kontrol)</i>	0.519 (T)	0.255	0.145	
<i>KG5+Glukoz</i>	ND	0.427	0.227	--
<i>KG5+Sakkaroz</i>	1.245 (T)	0.569	0.525	+
<i>KG5+Maltoz</i>	ND	1.241	1.124	++
<i>KG5+Sellobiyoz</i>	1.120 (T)	0.984		++
<i>KG5+Laktoz</i>	0.850 (T)	0.391	0.207	w
<i>KG5+Ksiloz</i>	0.680	0.248		--
<i>KG5+Trehaloz</i>	0.915 (T)	0.404	0.270	w
<i>KG5+Galaktoz</i>	ND	0.290		--
<i>KG5+Fruktoz</i>	1.216 (T)	1.053		++
<i>KG5+Mannoz</i>	ND	0.180		--
<i>KG5+Rafinoz</i>	ND	0.368		--
<i>KG5+Riboz</i>	1.259 (T)	1.134		++
<i>KG5+Arabinoz</i>	0.693	0.433		--
<i>KG5+Gliserol</i>	ND	0.105		--
<i>KG5+Sodyum asetat</i>	0.968 (T)	0.730	0.872	++
<i>KG5+Sodyum sitrat</i>	ND	0.060		--

	<i>1. GÜN</i>	<i>2. GÜN</i>	<i>3.GÜN</i>	<i>SONUÇ</i>
<i>KG5+Propiyonik asit</i>	ND	0.780	0.700	++
<i>KG5+Etanol</i>	ND	0.210		--

T: Taze besi yerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi

w: Üreme zayıf; + Üreme yeterli; ++ Üreme oldukça iyi; -- Üreme sağlanamadı

Tablo 4.2. KG8'in Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)

	<i>1. GÜN</i>	<i>2. GÜN</i>	<i>3.GÜN</i>	<i>SONUÇ</i>
<i>KG8(Kontrol)</i>	0.290	0.130	0.125	
<i>KG8+Glukoz</i>	ND		0.217	--
<i>KG8+Sakkaroz</i>	ND		0.270	--
<i>KG8+Maltoz</i>	ND		0.240	--
<i>KG8+Sellobiyoz</i>	0.382		0.250	w
<i>KG8+Laktöz</i>	0.410	0.273	0.236	w
<i>KG8+Ksiloz</i>	ND		0.160	--
<i>KG8+Trehaloz</i>	ND		0.225	--
<i>KG8+Galaktöz</i>	ND	0.695 (T)	0.400	+
<i>KG8+Fruktoz</i>	ND		0.260	--
<i>KG8+Mannoz</i>	ND		0.210	--
<i>KG8+Raffinoz</i>	ND	0.310	0.312	--
<i>KG8+Riboz</i>	ND		0.185	--
<i>KG8+Arabinoz</i>	ND		0.125	--
<i>KG8+Gliserol</i>	ND		0.200	--
<i>KG8+Sodyum asetat</i>	0.477	0.545	0.314	w
<i>KG8+Sodyum sitrat</i>	ND		0.139	--
<i>KG8+Propiyonik asit</i>	ND	0.410	0.420	w
<i>KG8+Etanol</i>	ND		0.176	--

T: Taze besi yerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi

w: Üreme zayıf; + Üreme yeterli; -- Üreme sağlanamadı

Tablo 4.3. KG9'un Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)

	1. GÜN	2. GÜN	3.GÜN	SONUÇ
KG9 (Kontrol)	0.390 (T)	0.149	0.112	
KG9+Glukoz	0.760	0.730 (T)	0.173	w ?
KG9+Sakkaroz	0.671	0.848 (T)	0.200	w ?
KG9+Maltoz	ND	0.808 (T)	0.725	++
KG9+Sellobiyoz	ND	0.801 (T)	0.785	++
KG9+Laktoz	0.816 (T)	0.517	0.400	+
KG9+Ksiloz	0.805 (T)	0.574	0.538	+
KG9+Trehaloz	0.734	0.701 (T)	0.220	w ?
KG9+Galaktoz	ND	0.615 (T)	0.550	+
KG9+Fruktoz	ND	0.825 (T)	0.220	w
KG9+Mannoz	ND	0.711 (T)	0.170	w
KG9+Raffinoz	0.799 (T)	0.546	0.475	+
KG9+Riboz	0.938 (T)	0.418	0.336	w
KG9+Arabinoz	ND		0.210	--
KG9+Gliserol	ND		0.370	--
KG9+Sodyum asetat	0.853 (T)	0.600	0.500	+
KG9+Sodyum sitrat	ND		0.174	--
KG9+Propiyonik asit	ND	0.552	0.350	w
KG9+Etanol	ND	0.210	0.176	--

T: Taze besi yerine transfer edilerek tekrar üreme özelliklerinin test edilmesi

ND: Üreme tespit edilmedi

w: Üreme zayıf; + Üreme yeterli; ++ Üreme oldukça iyi; -- Üreme sağlanamadı

4.3.2.Katalaz Testi

Katalaz testinde KG5'in negatif, KG8'in pozitif ve KG9'un ise güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.15).



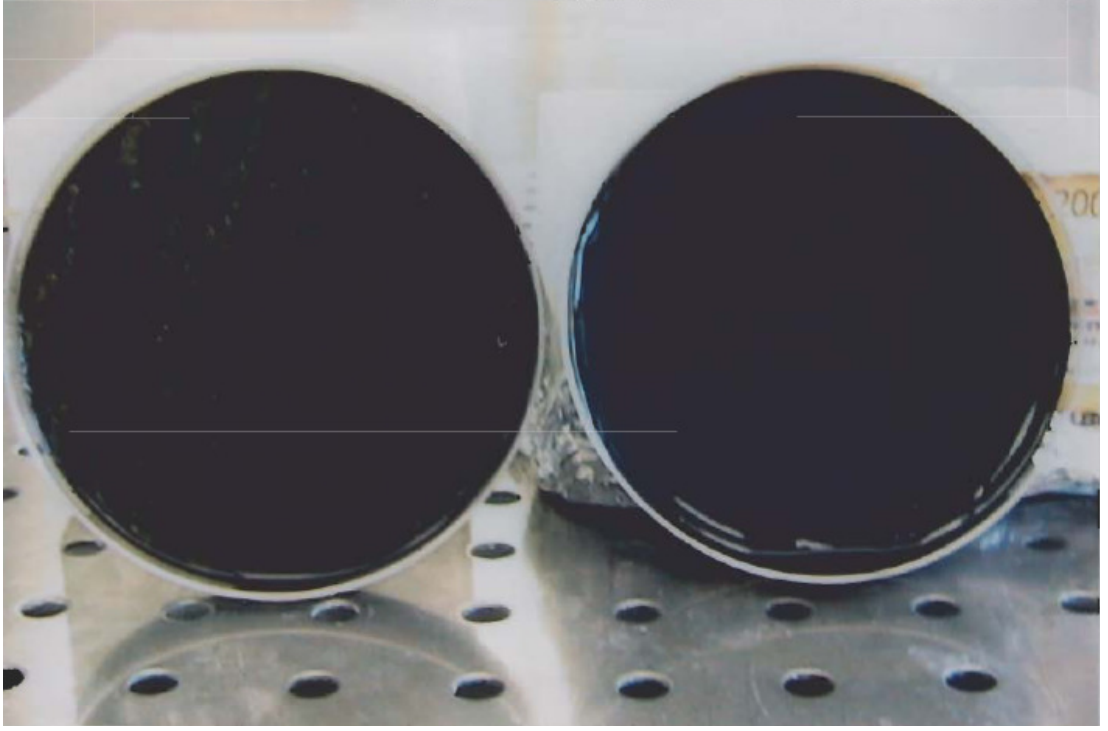
Şekil 4.15. KG5, KG8 ve KG9'un Katalaz Aktivite Testi

4.3.3.Oksidaz Testi

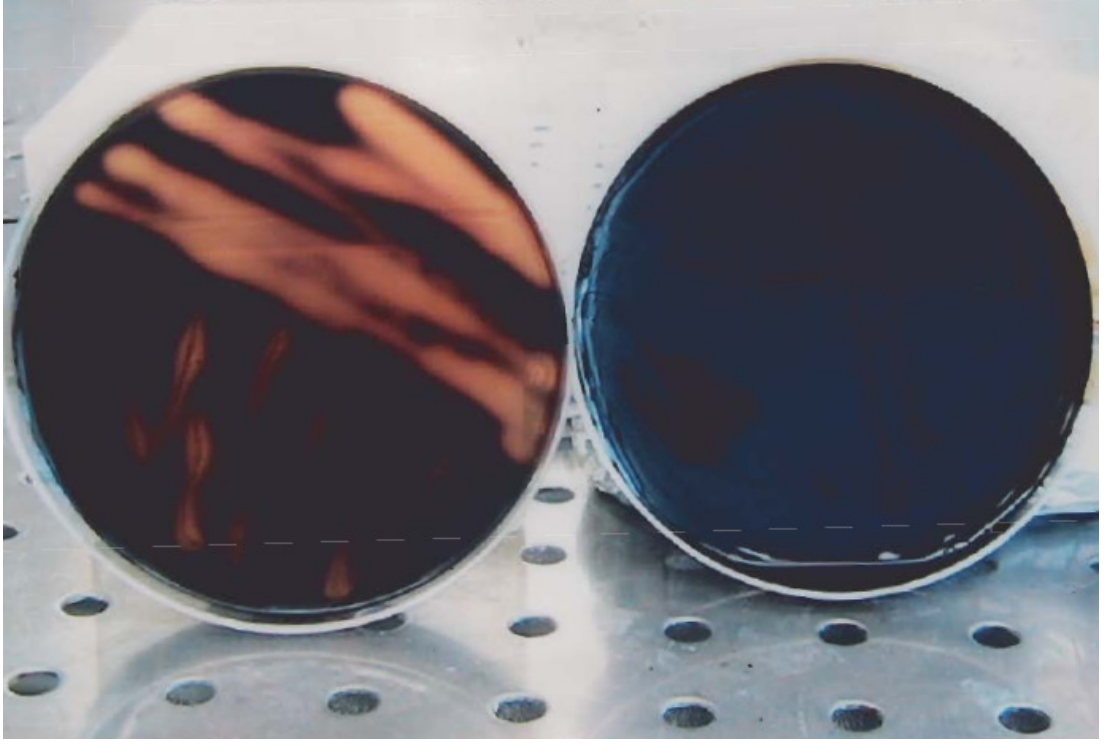
KG5, KG8 ve KG9'un oksidaz aktivite testinde negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6.)

4.3.4.Nişasta Hidrolizi

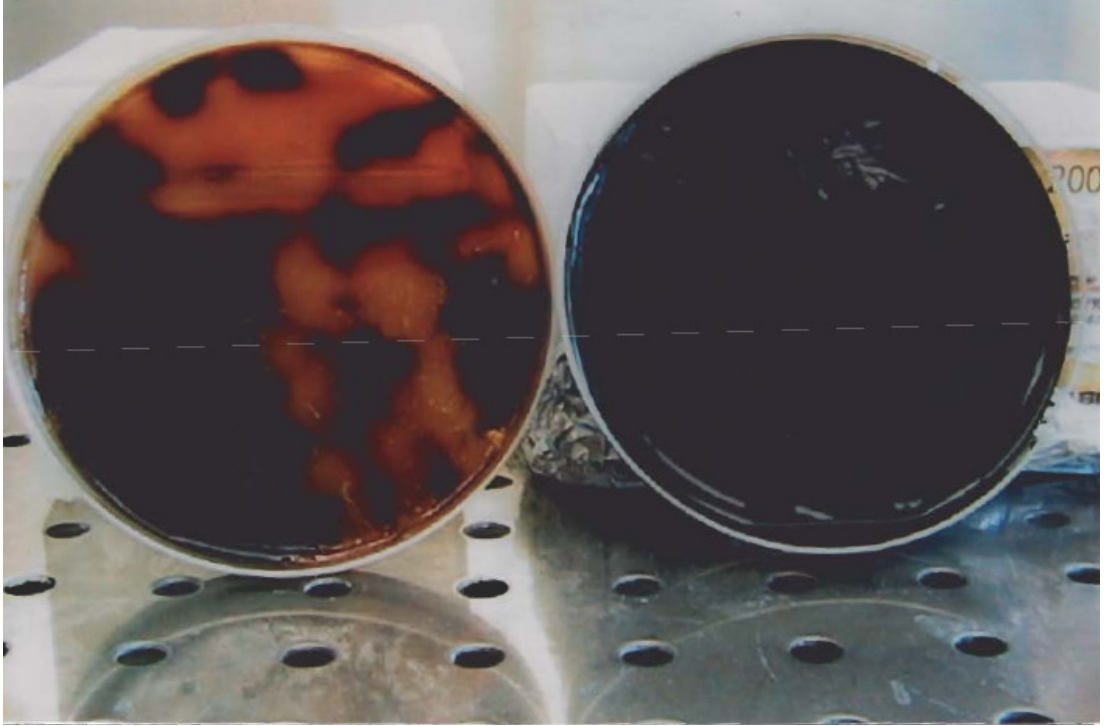
Nişasta hidrolizi testiyle KG5'in negatif, KG8'in pozitif ve KG9'un ise güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6; şekil 4.16-4.18).



şekil 4.16. KG5'e ait Nişasta Hidrolizi Testi



Şekil 4.17. KG8'e ait Nişasta Hidrolizi Testi



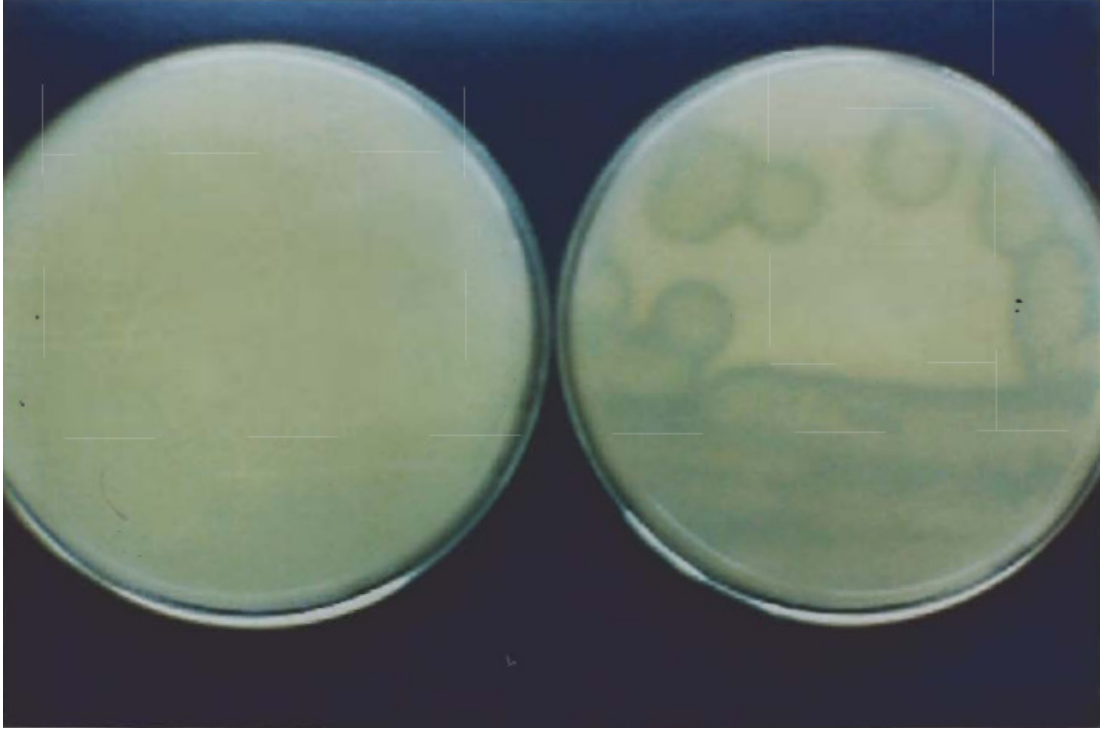
Şekil 4.18. KG9'a ait Nişasta Hidrolizi Testi

4.3.5.Kazein Hidrolizi

Kazein hidrolizi testiyle KG5' in güçlü pozitif, KG8' in negatif ve KG9'un ise pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.19 ve 4.20).



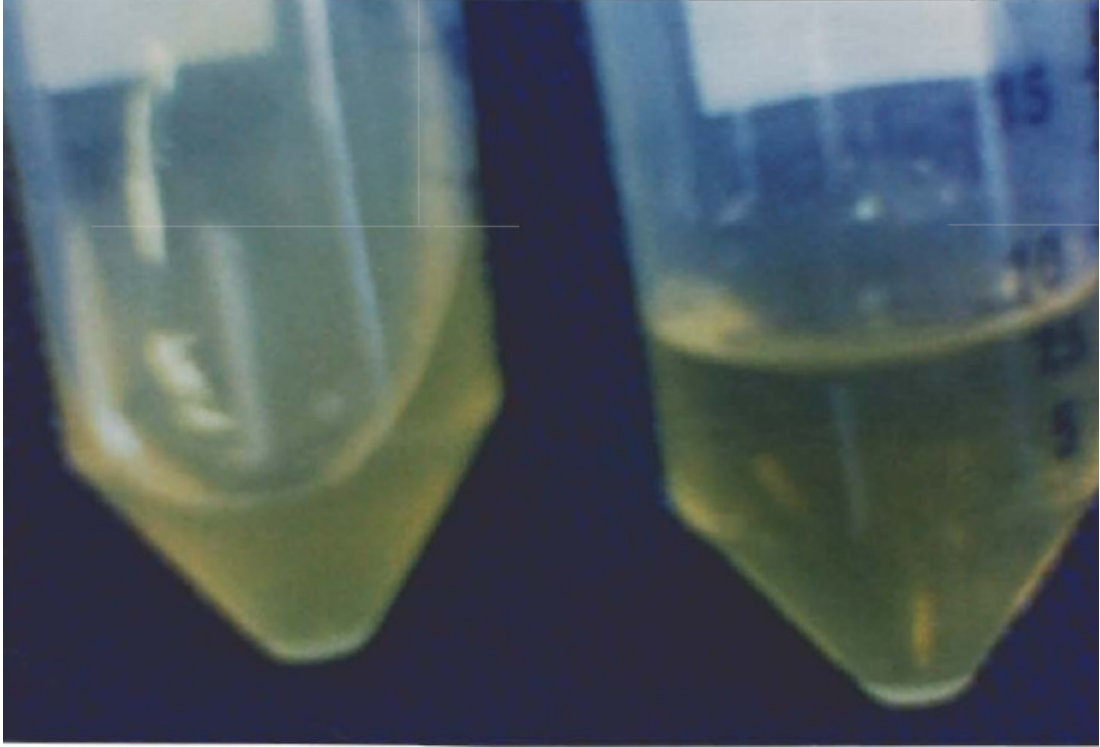
Şekil 4.19. KG5'e ait Kazein Hidrolizi Testi



Şekil 4.20. KG9'a ait Kazein Hidrolizi Testi

4.3.6. Jelatin Hidrolizi

Jelatin hidrolizi testiyle KG5'in pozitif (Şekil 4.21), KG8 ve KG9'un negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6).



Şekil 4.21. KG5'e ait Jelatin Hidrolizi Testi

4.3.7. L-Tirozin Degredasyonu

KG5 ve KG8'in pozitif (Şekil 4.22 ve 4.23), KG9'un ise negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6).



Şekil 4.22. KG5'e ait L-Tirozin Degradasyonu Deneyi



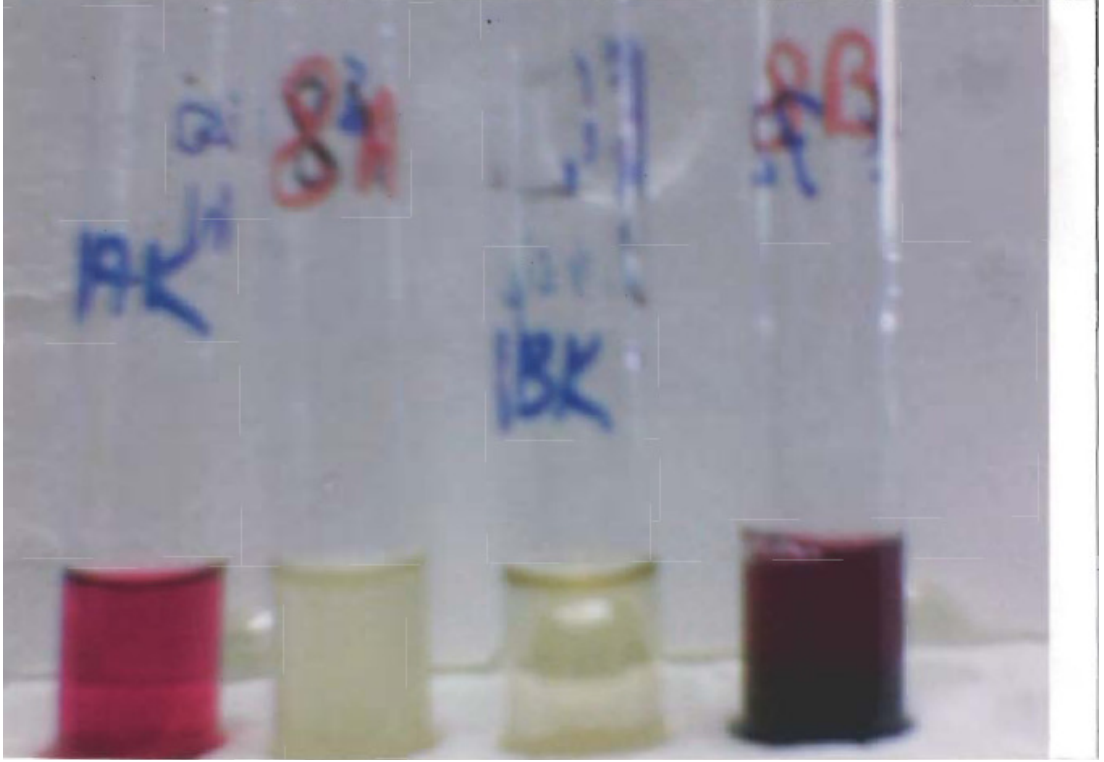
Şekil 4.23. KG8'e ait L-Tirozin Degradasyonu Deneyi

4.3.8. Nitrit Redüksiyonu

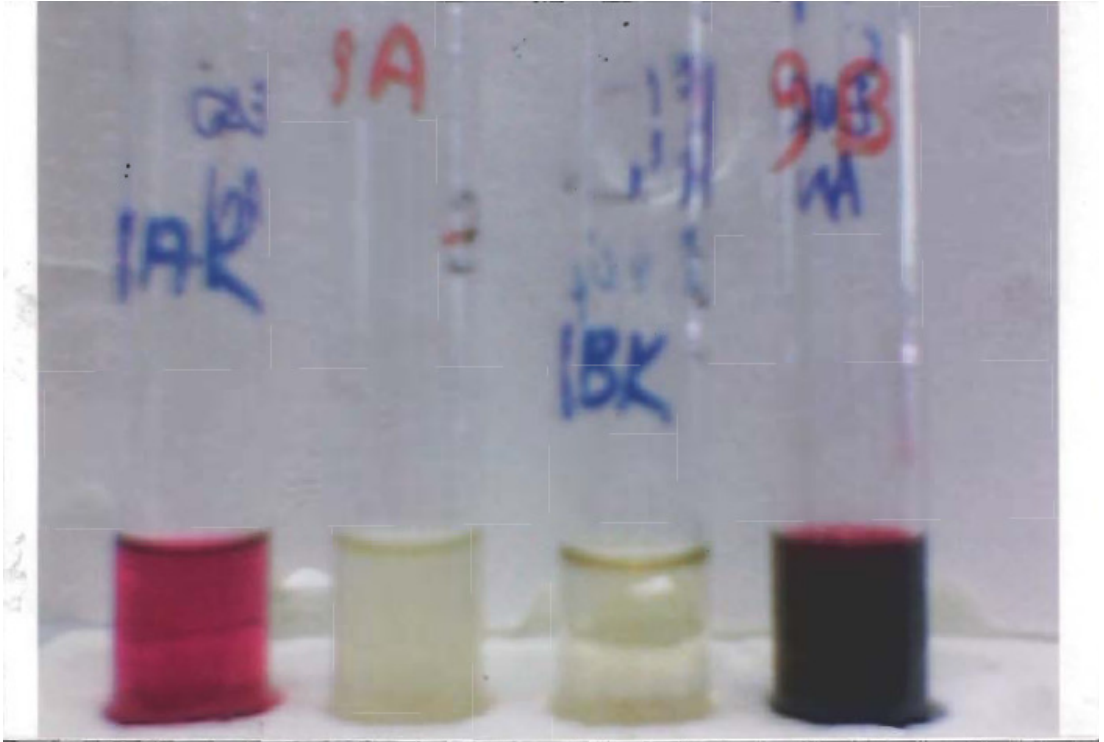
KG5 ve KG8'in pozitif, KG9'un ise güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği renk oluşumuyla tespit edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.24-4.26).



Şekil 4.24. KG5'e ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi



Şekil 4.25. KG8'e ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi



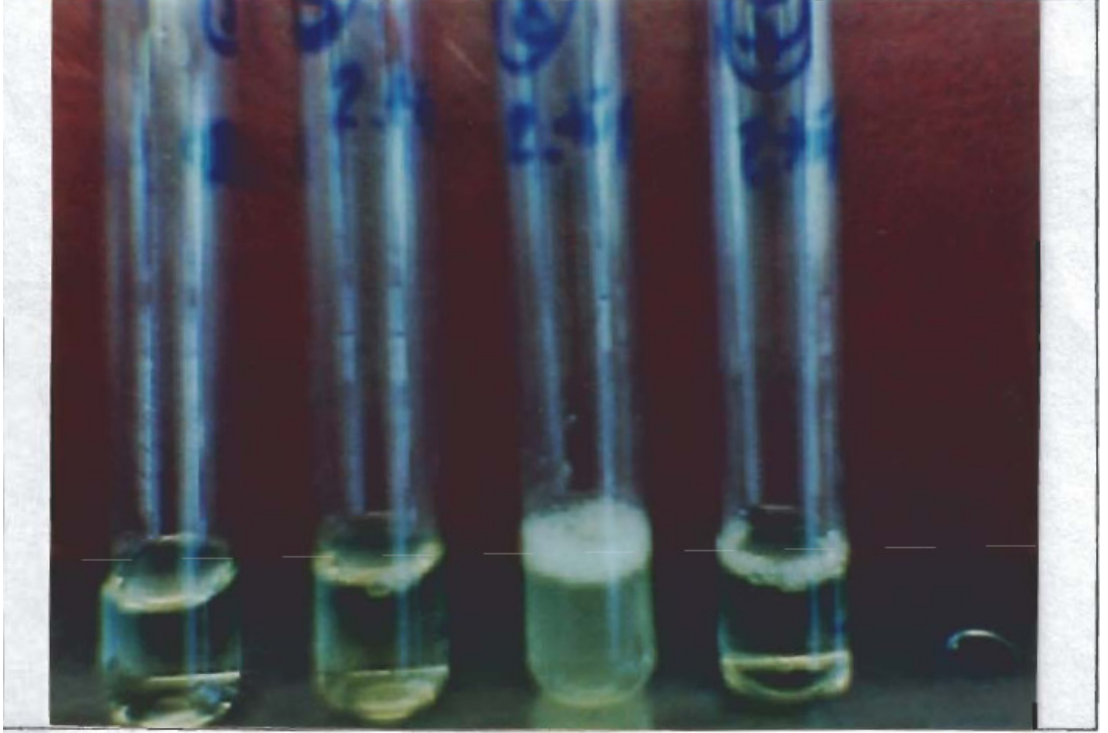
Şekil 4.26. KG9'a ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi

4.3.9. Nitrat Redüksiyonu

KG5'in negatif, KG8'in pozitif ve KG9'un ise güçlü pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.24-4.26).

4.3.10. Hippurat Hidrolizi

KG5'in zayıf, KG8'in pozitif, KG9'un ise negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.27).



Şekil 4.27. KG5, KG8 ve KG9'a ait Sodyum Hippurat Hidrolizi Testi

4.3.11. Sodyum Azid Duyarlılığı

Tablo 4.4'te görüldüğü gibi 1 ve 3 günlük inkübasyon süresinden sonra KG5'in ve KG8' in pozitif, KG9'un negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.4. Sodyum Azid (SA) Duyarlılığı (OD 470 nm)

	<i>Kontrol</i> <i>1.gün</i>	<i>(% 0.02 SA)</i> <i>1. gün</i>	<i>Kontrol</i> <i>3.gün</i>	<i>(% 0.02 SA)</i> <i>3. gün</i>
<i>KG5</i>	1.100	0.200	1.300	0.260
<i>KG8</i>	1.150	0.095	1.200	0.078
<i>KG9</i>	0.550	0.747	0.890	0.500

4.3.12. Lizozim Duyarlılığı

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi 1 günlük inkübasyon süresinden sonra KG5 ve KG8'in pozitif, KG9'un ise zayıf reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.5 Lizozim Duyarlılığı (OD 470 nm)

	<i>Kontrol</i> <i>1.gün</i>	<i>(% 0.001 Lizozim)</i> <i>1.gün</i>
<i>KG5</i>	0.820	0.703
<i>KG8</i>	1.141	1.015
<i>KG9</i>	1.220	0.780

Tablo 4.6. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

<i>Özellikler</i>	<i>KG5</i>	<i>KG8</i>	<i>KG9</i>
Katalaz	-	+	++
Oksidaz	-	-	-
Gram Boyama	+	+	+
Nişasta hidrolizi	-	+	++
Kazein hidrolizi	++	-	+
Jelatin hidrolizi	+	-	-
L-tyrosine degradesyonu	+	+	-
Nitrit redüksiyonu	+	+	++
Nitrat redüksiyonu	-	+	++
Hippurat hidrolizi	w	+	-
Lizozim duyarlılığı	-	-	w
Sodyum azid duyarlılığı	+	+	-
Hareketlilik	+	+	+
Aerobik	+	+	+

+ pozitif; ++ güçlü pozitif; -- negatif; w zayıf

4.3.13. NaCl Toleransları

Tablo 4.7'de görüldüğü gibi çok geniş NaCl konsantrasyon aralıkları 24 saatlik sürede test edilmiş, KG5'in %5, KG8'in %3 ve KG9'un ise %15 oranındaki NaCl konsantrasyonlarına tolere ettiği tespit edildi. OD değerleri 3 ayrı çalışmanın ortalamasını gösterir.

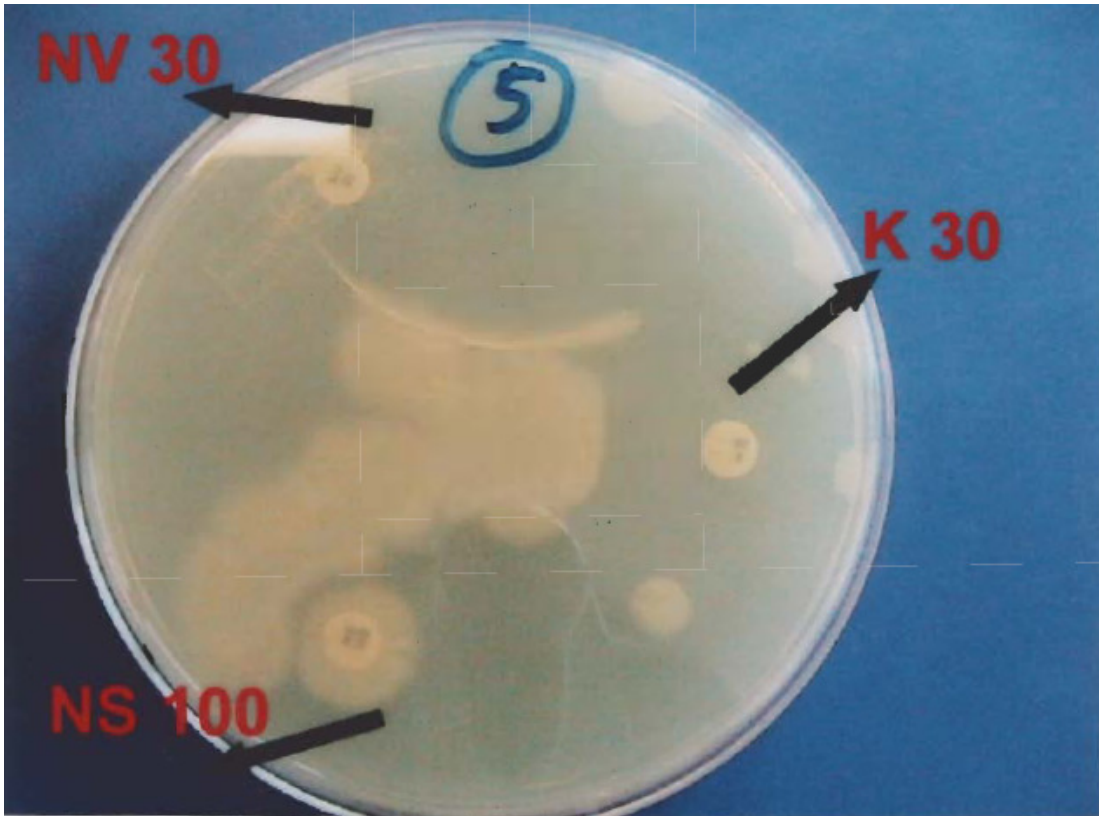
Tablo 4.7. İzole Edilen Bakterilerin Değişik Konsantrasyonlardaki NaCl'e Toleransları (OD 470 nm)

<i>Strains</i>	<i>Kontrol</i>	<i>%3</i>	<i>%5</i>	<i>%7</i>	<i>%10</i>	<i>%12.5</i>	<i>%15</i>	<i>%17.5</i>	<i>%20</i>	<i>%25</i>
KG5	1.079	1.259	1.180	0.523	0.057	ND	ND	ND	ND	ND
KG8	1.380	0.905	0.240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KG9	1.368	1.043	1.395	1.307	1.198	1.180	1.102	0.079	0.080	0.085

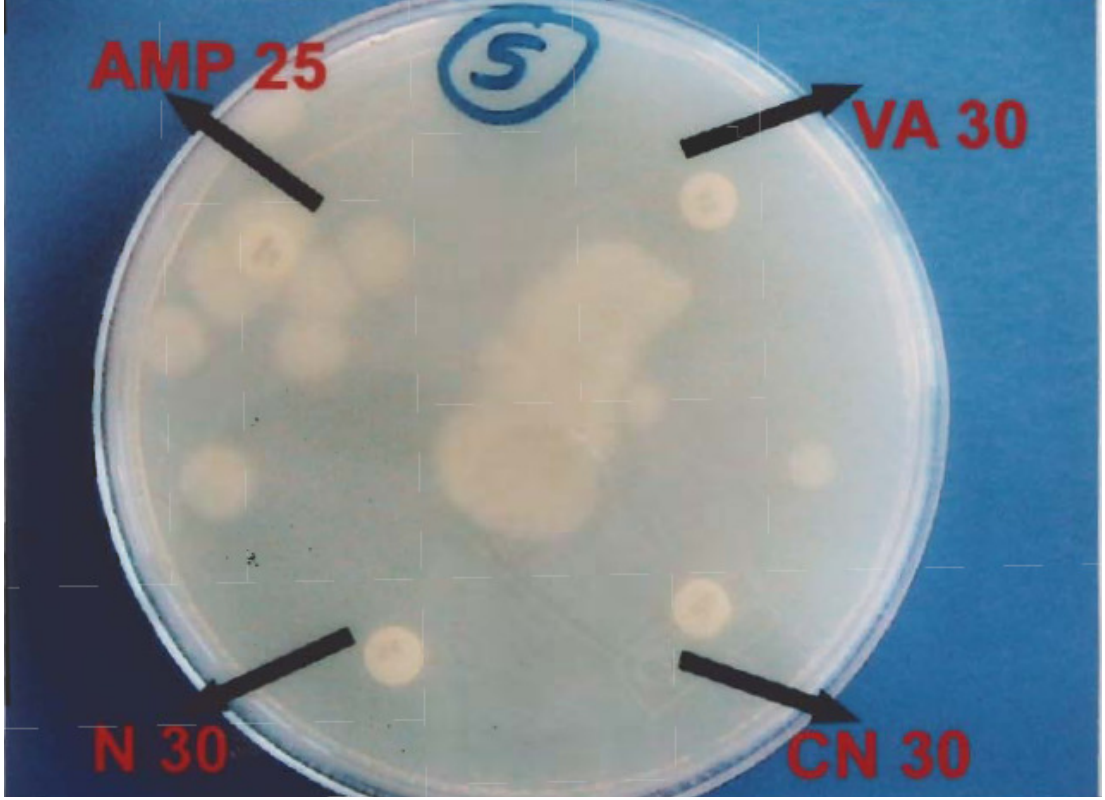
ND: Üreme tespit edilmedi.

4.3.14. Antibiyotik Duyarlılık Testi

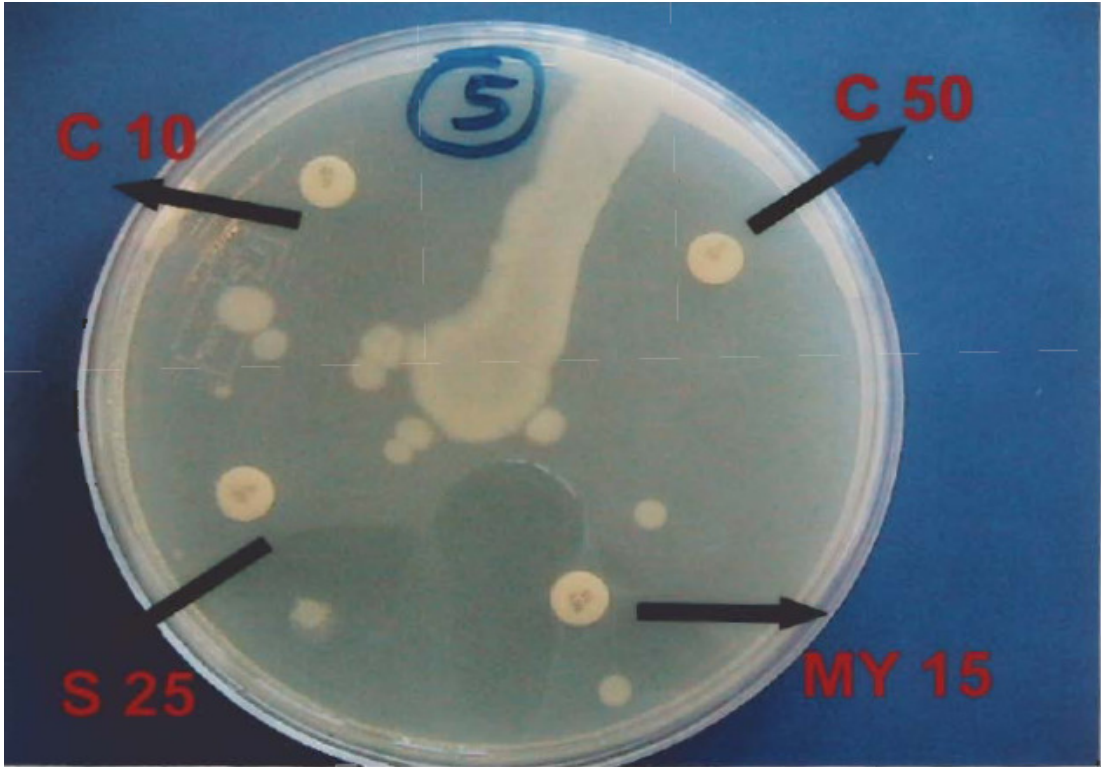
Materyal ve Metod kısmında belirtilen birinci yöntemle antibiyotik duyarlılıkları test edilen KG5'in Penicillin 2, Penicillin 10, Nystatin 100, Ampicillin 25'e dirençli olduğu (Tablo 4.8; Şekil 4.28-4.32), ikinci yöntemle duyarlılıkları inhibisyon zon çapları baz alınarak test edilen KG8'in sadece Nystatin 100'e dirençli olduğu (Duyarlı olanların inhibisyon çapları 20 mm'den daha büyük olduğu bulunmuştur; Tablo 4.8; Şekil 4.33-4.38) ve birinci yöntemle duyarlılığı test edilen KG9'un Penicillin 2, Penicillin 10, Chloramphenicol 10, Nystatin 100, Ampicillin 25, Lincomiysin 15, Fosidik asit 10 ve Bacitrin 10'a dirençli olduğu tespit edildi (Tablo 4.8; Şekil 4.39-4.44).



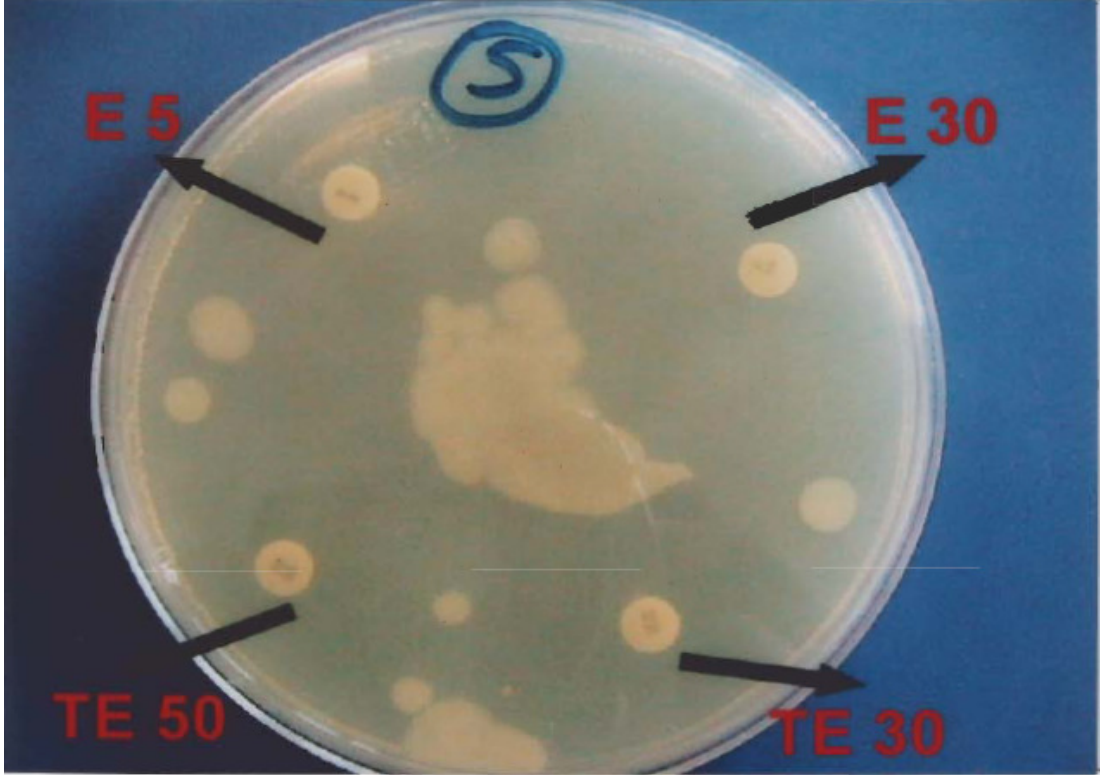
Şekil 4.28. KG5'in NV30, K30 ve NS100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



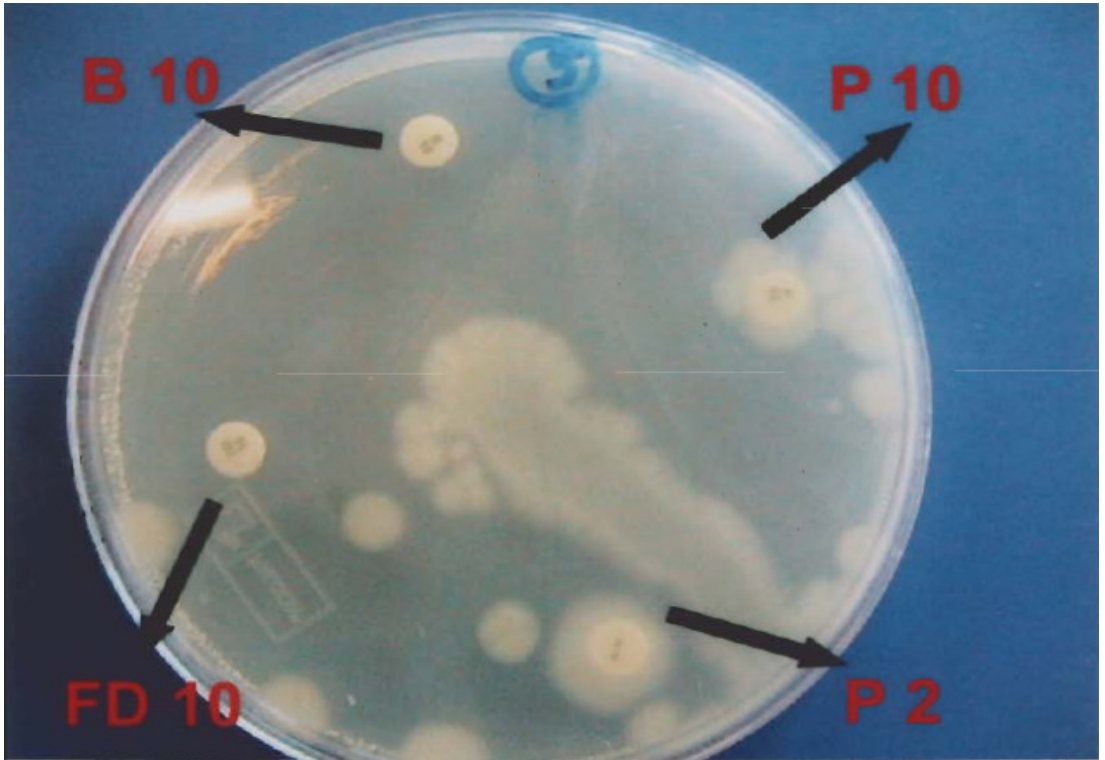
Şekil 4.29. KG5'in AMP25, VA30, CN30 ve N30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



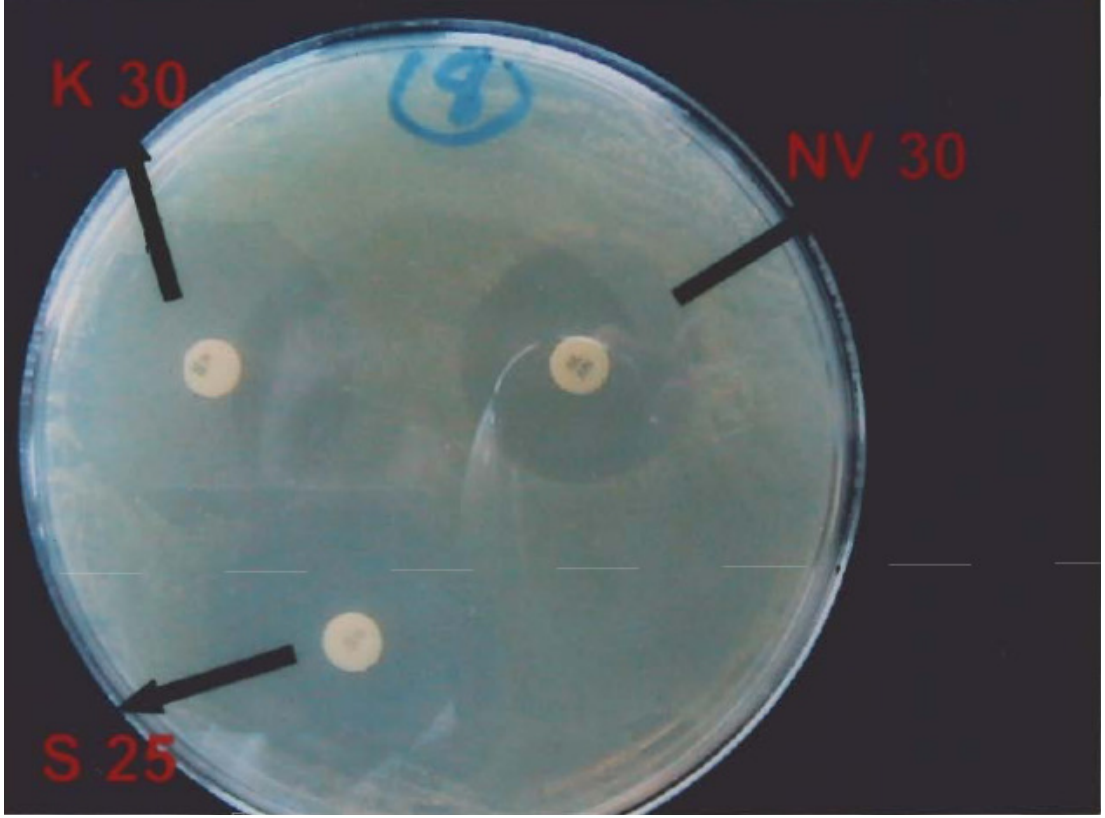
Şekil 4.30. KG5'in C10, C50, S25 ve MY15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



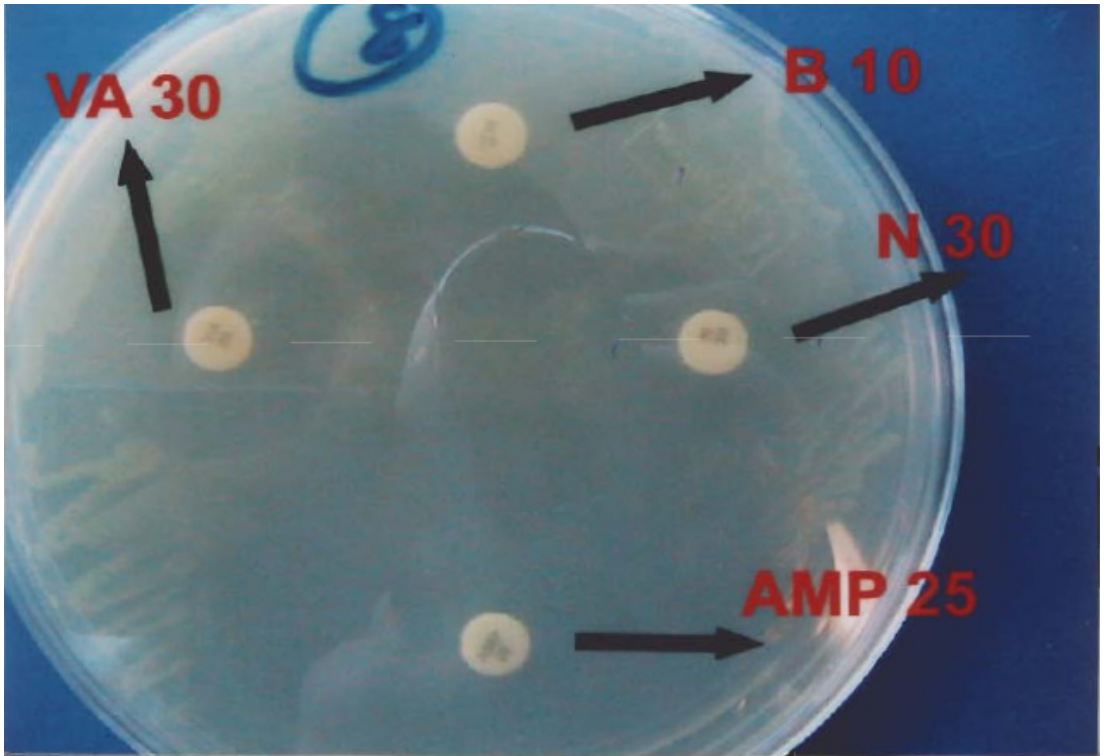
Şekil 4.31. KG5'in E5, E30, TE30 ve TE50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



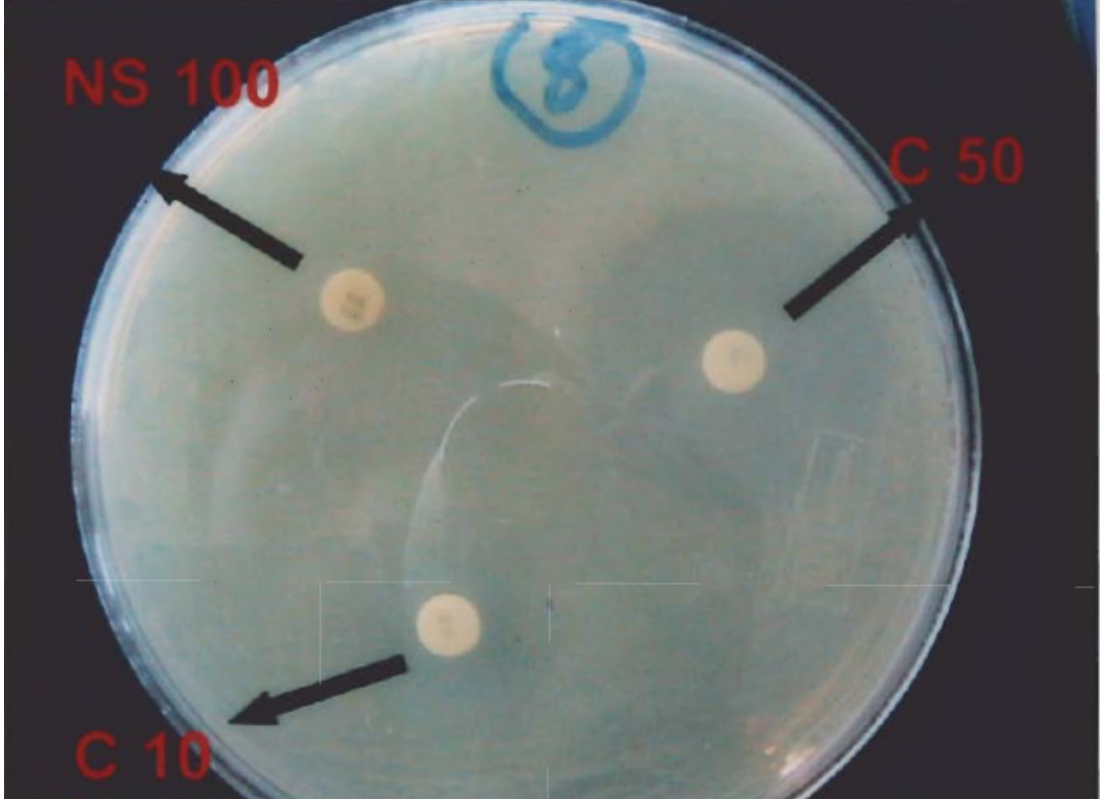
Şekil 4.32. KG5'in B10, P10, FD10 ve P2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



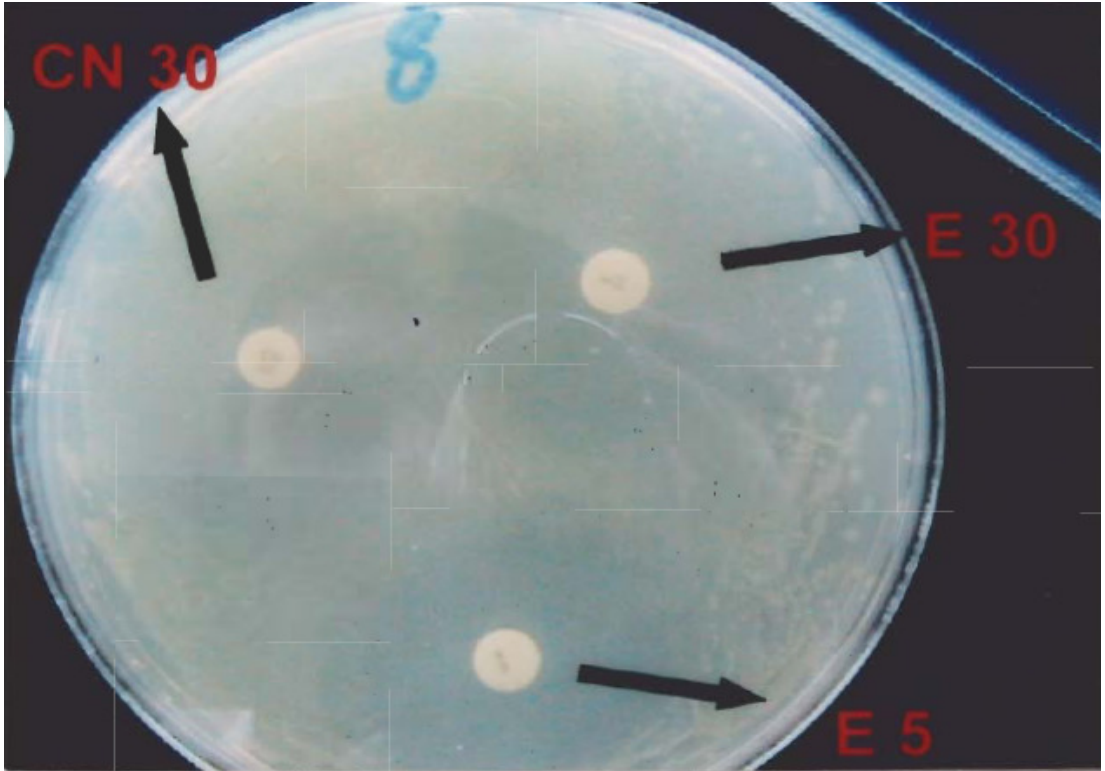
Şekil 4.33. KG8'in K30, NV30 ve S25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



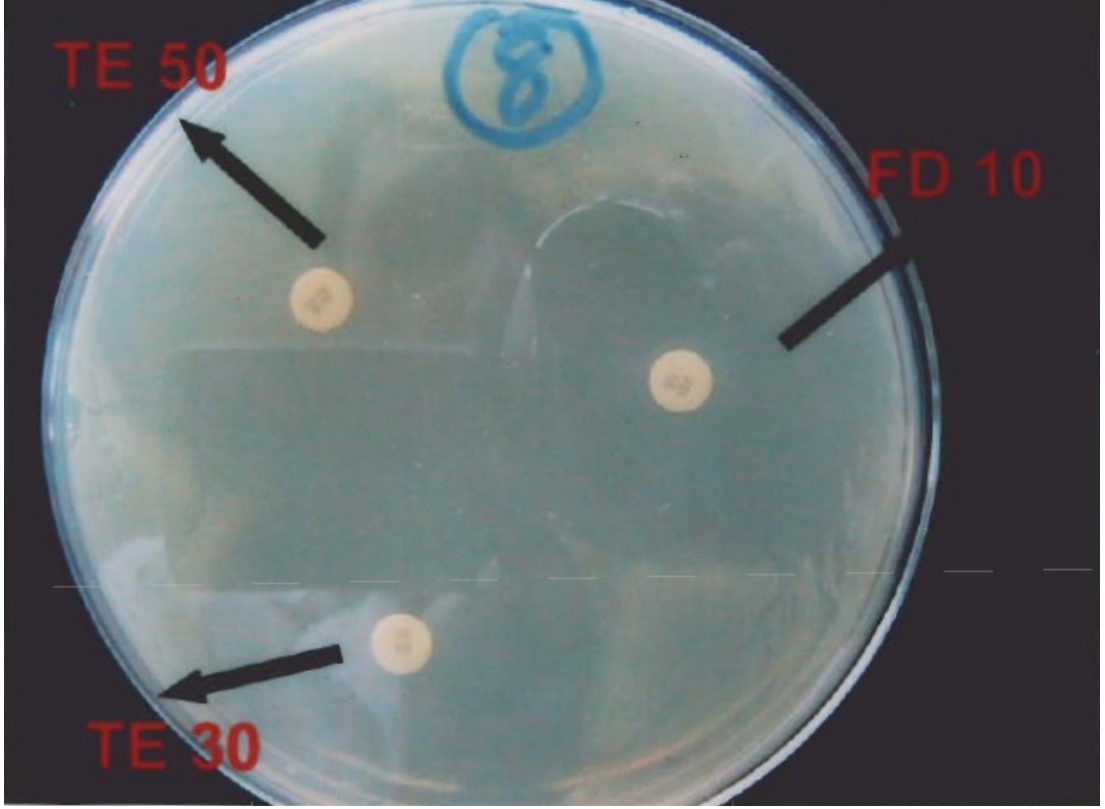
Şekil 4.34. KG8'in VA30, B10, N30 ve AMP25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



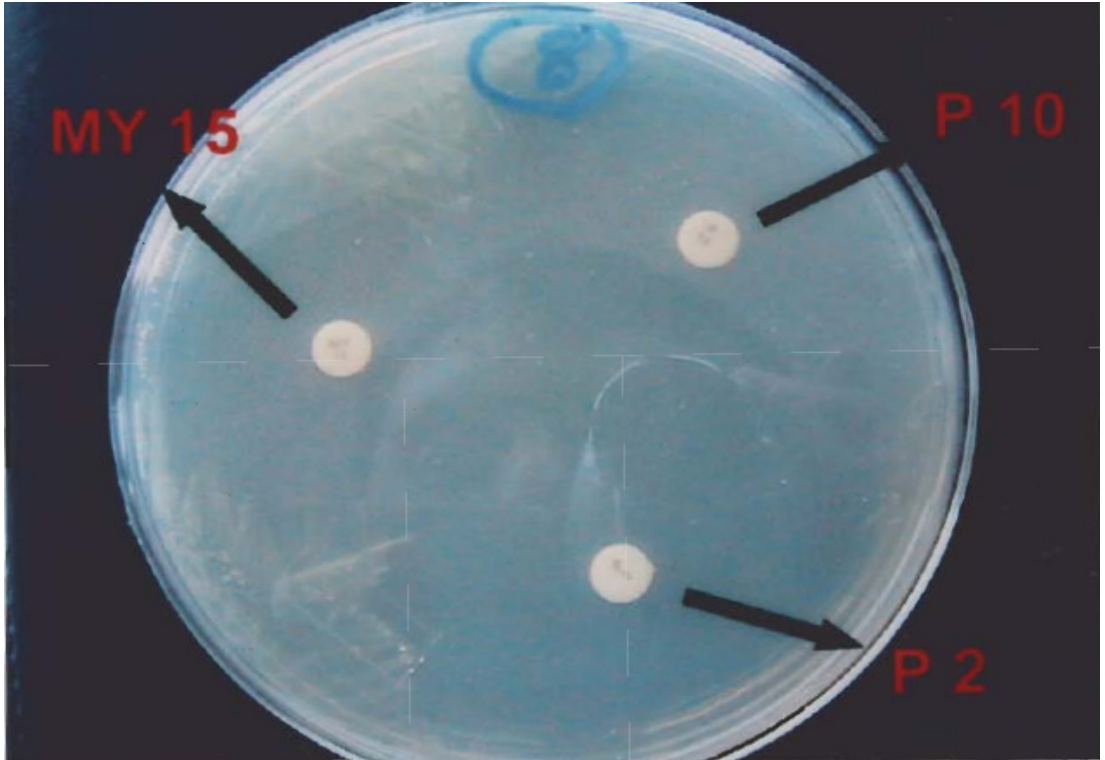
Şekil 4.35. KG8'in NS100, C10 ve C50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



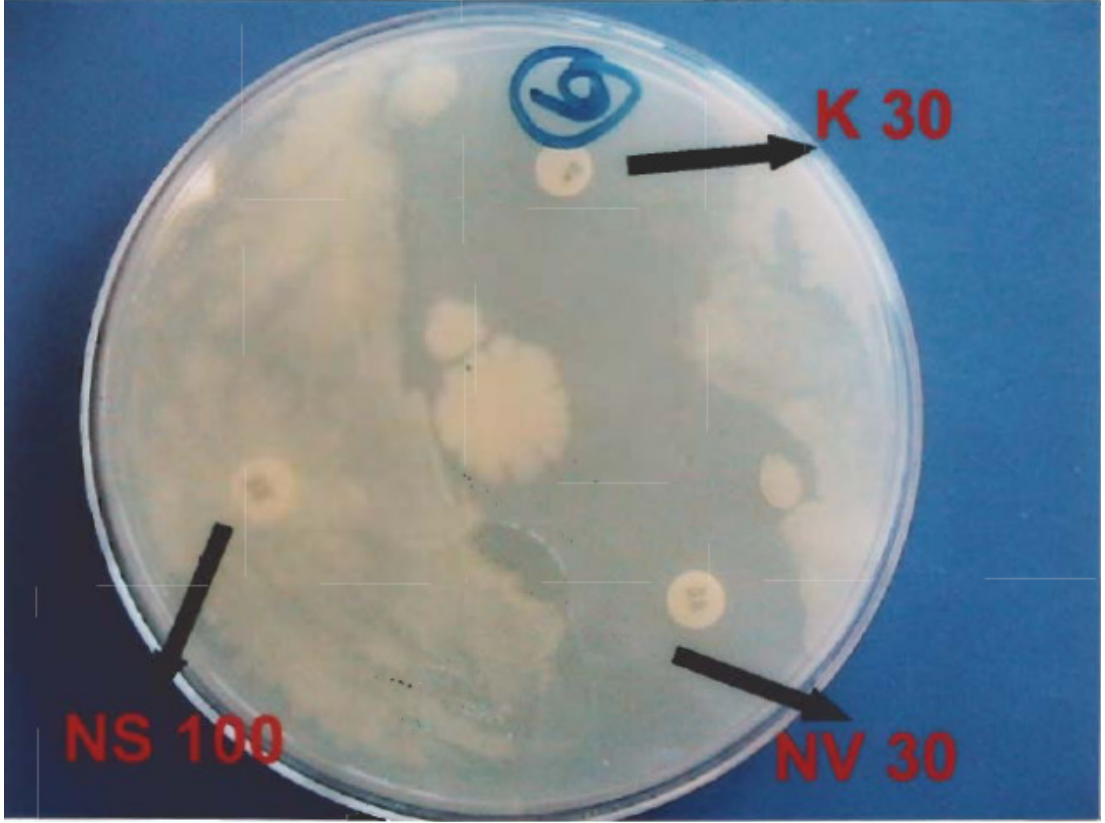
Şekil 4.36. KG8'in CN30, E5 ve E30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



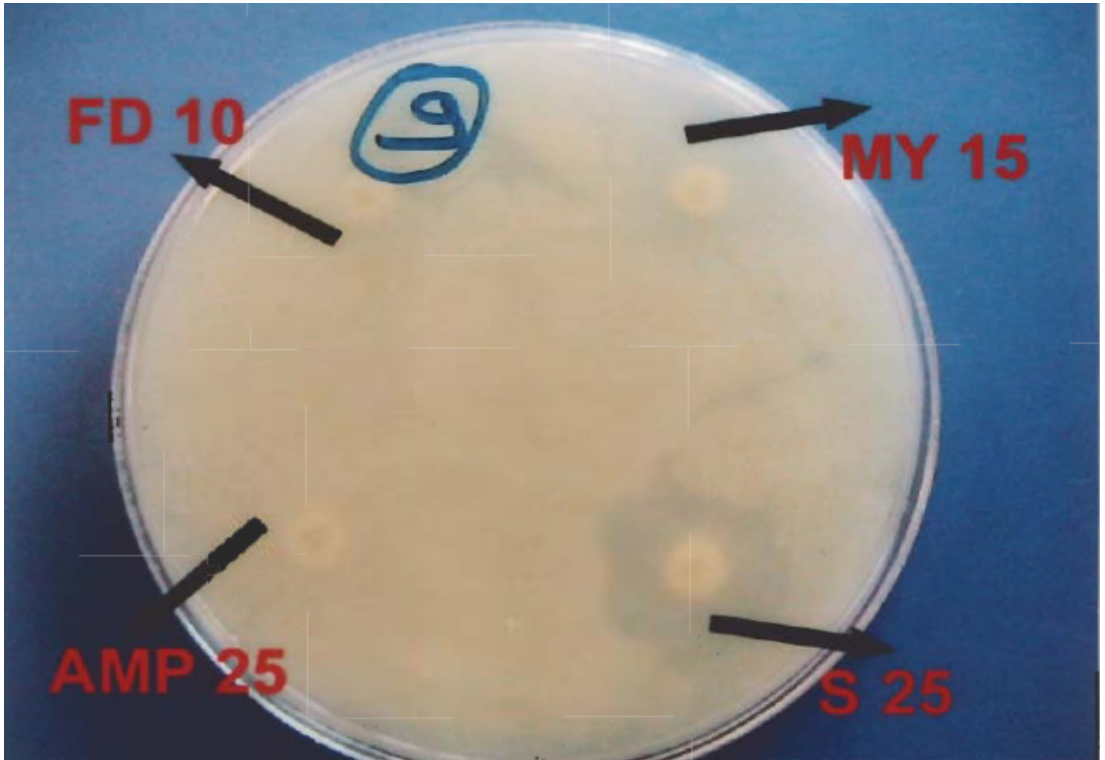
Şekil 4.37. KG8'in TE50, TE30 ve FD10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



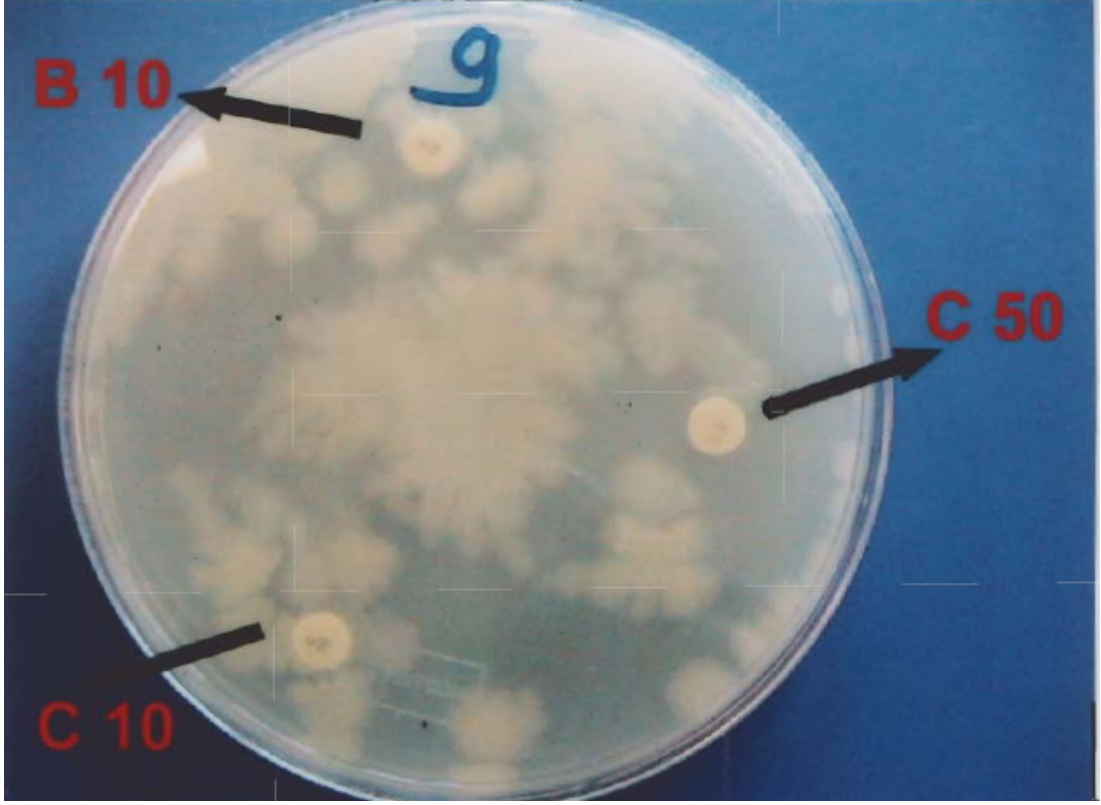
Şekil 4.38. KG8'in MY15, P2 ve P10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



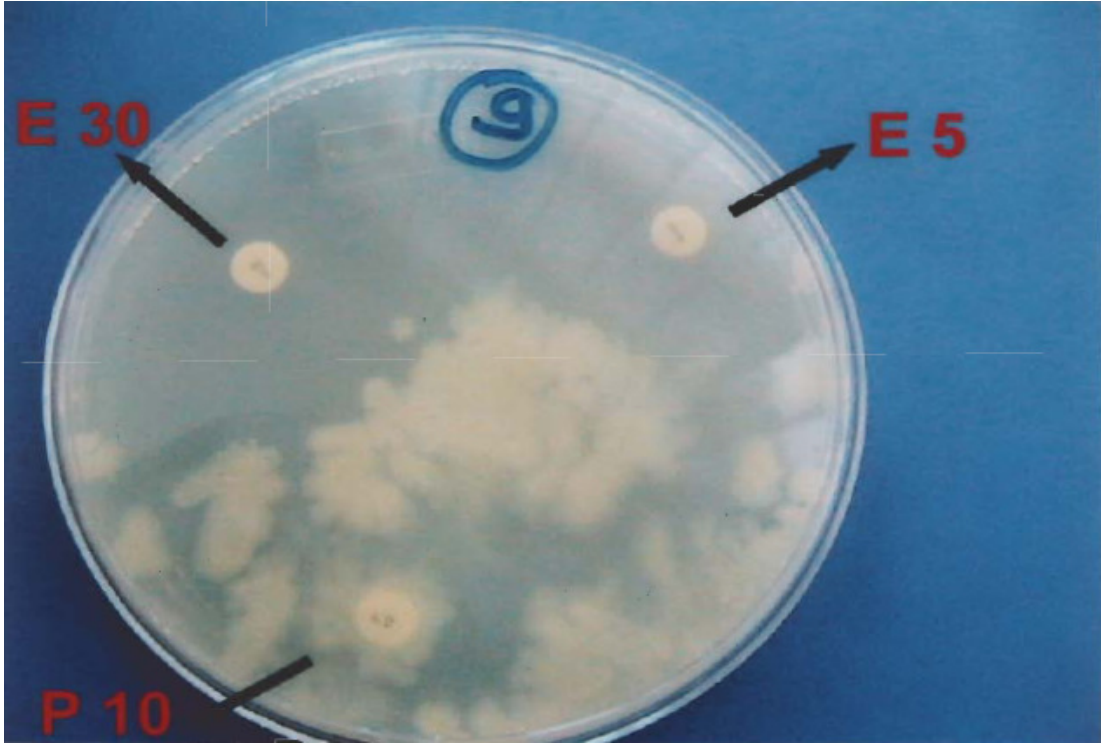
Şekil 4.39. KG9'un NV30, NS100 ve K30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



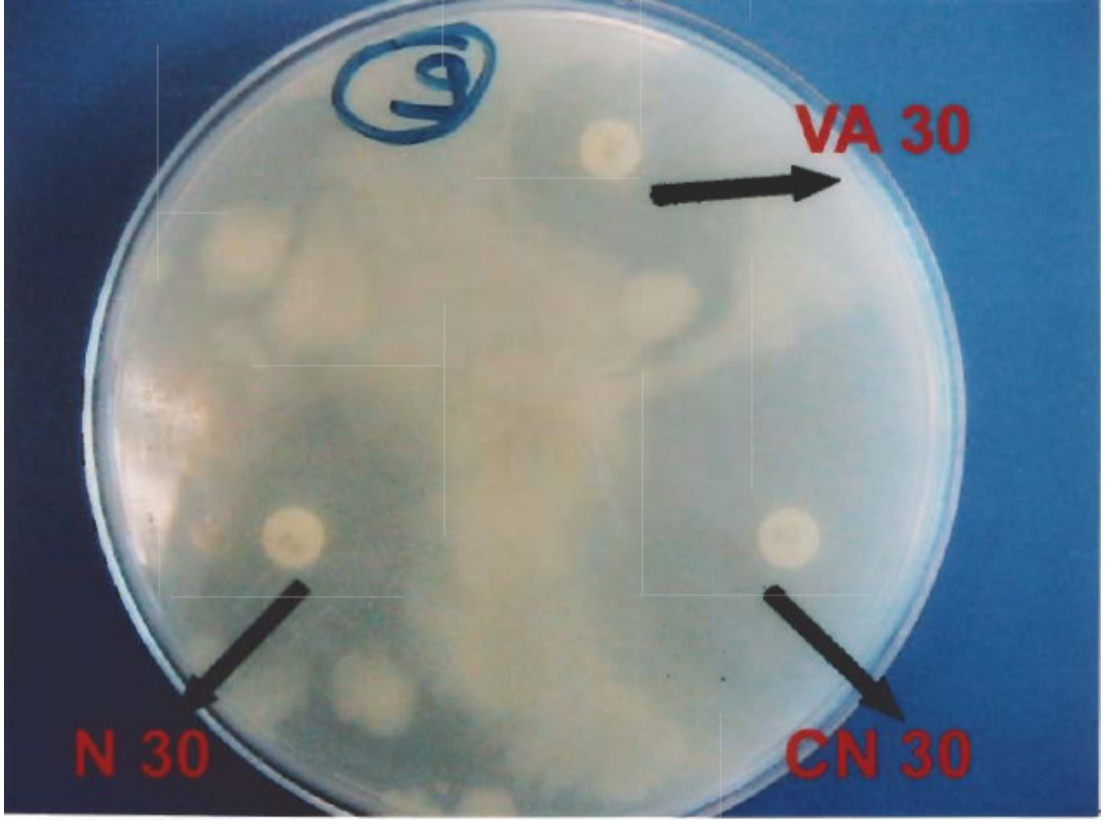
Şekil 4.40. KG9'un FD10, MY15, AMP25 ve S25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



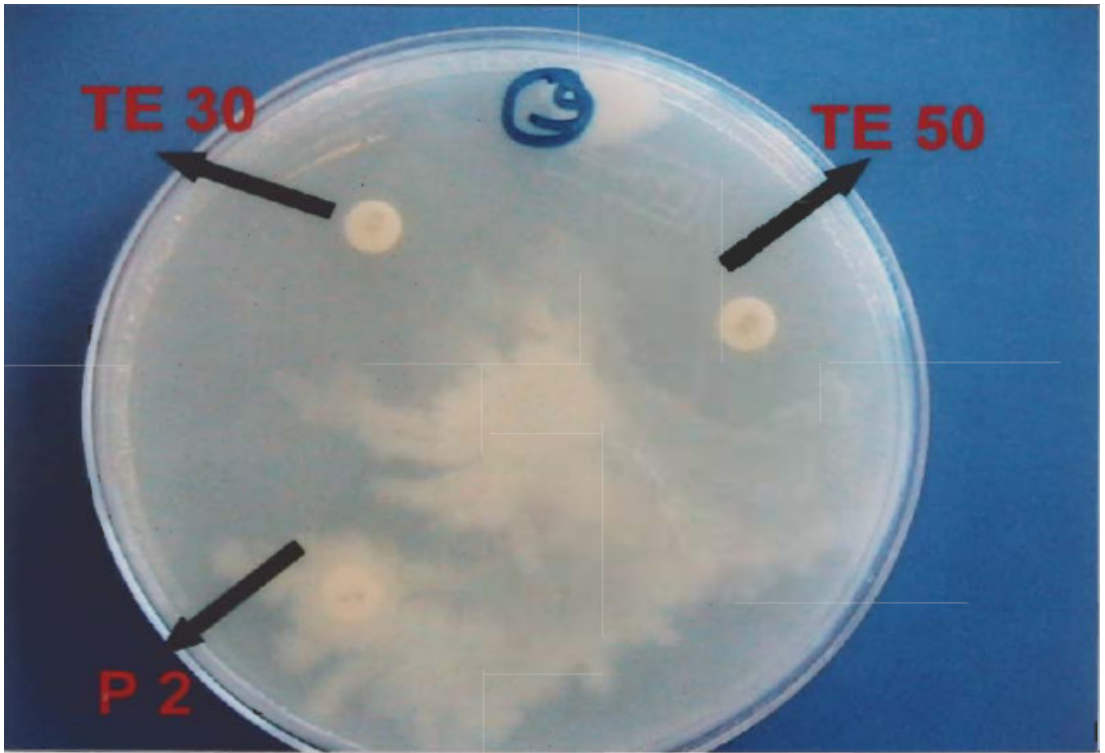
Şekil 4.41. KG9'un B10, C10 ve C50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.42. KG9'un E5, E30 ve P10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.43. KG9'un N30, VA30 ve CN30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı



Şekil 4.44. KG9'un TE30, TE50 ve P2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı

Tablo 4.8. Antibiyotik Duyarlılık Testi

<i>Antibiyotikler</i>	<i>Strain KG5</i>	<i>Strain KG8</i>	<i>Strain KG9</i>
P2 iu Penicillin G	+	-	+
E5 mcg Erythromycin	-	-	-
P10 iu Penicillin G	+	-	+
C10 mcg Chloramphenicol	-	-	+
S25 mcg Streptomycin	-	-	-
NS100 iu Nystatin	+	+	+
K30 mcg Kanamycin	-	-	-
NV30 mcg Novobiacin	-	-	-
CN 30 mcg Gentamycin	-	-	-
N30 mcg Neomycin	-	-	-
VA 30 mcg Vancomycin	-	-	-
AMP25 mcg Ampicillin	+	-	+
TE30 mcg Tetracycline	-	-	-
TE50 mcg Tetracycline	-	-	-
MY15 mcg Lincomycin	-	-	+
C50 mcg Chloramphenicol	-	-	-
FD10 mcg Fusidic acid	-	-	+
B10 iu Bacitracin	-	-	+
E30 mcg Erythromycin	-	-	-

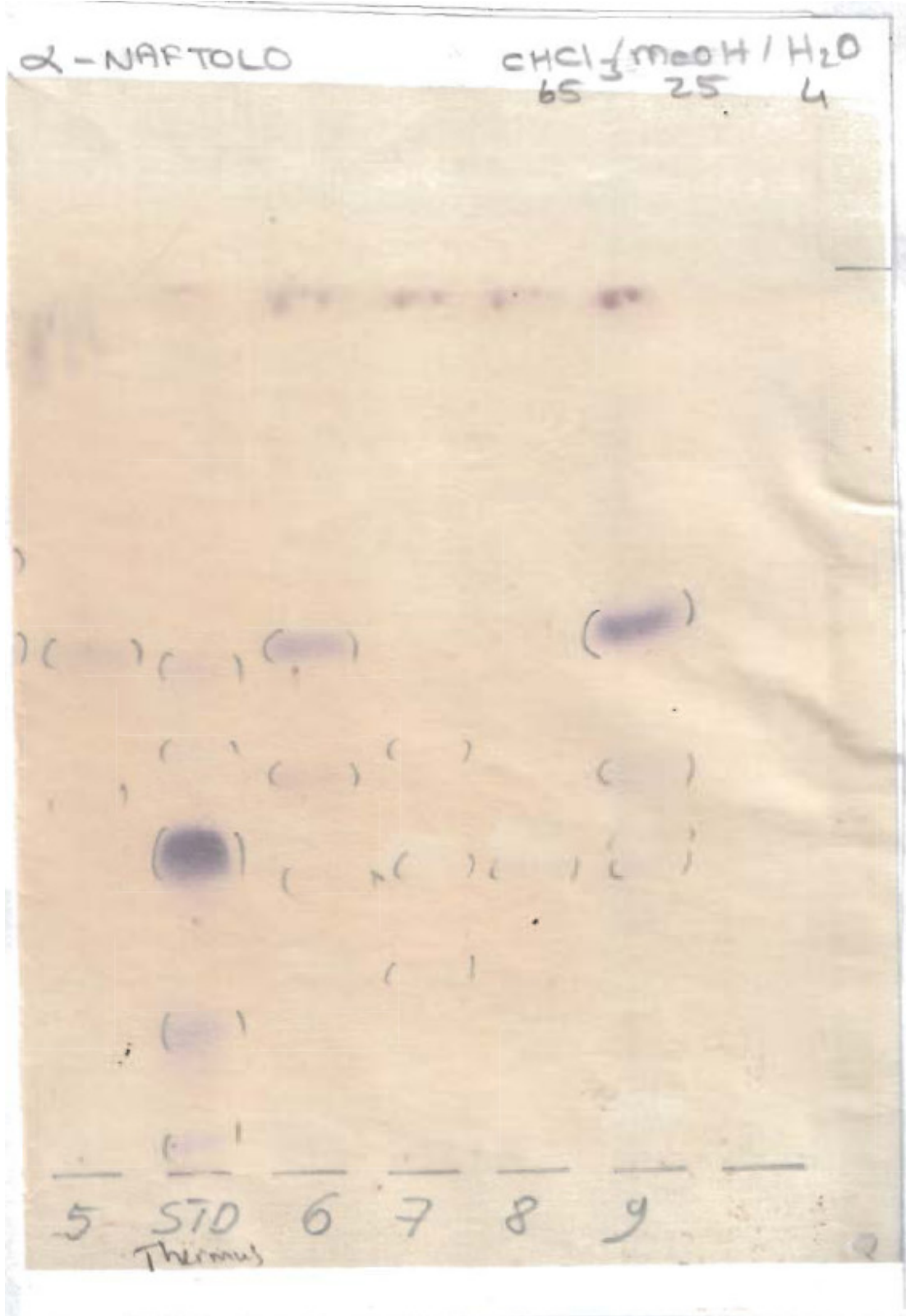
+ Üreme var (Dirençli)

- Üreme yok (Dirençsiz)

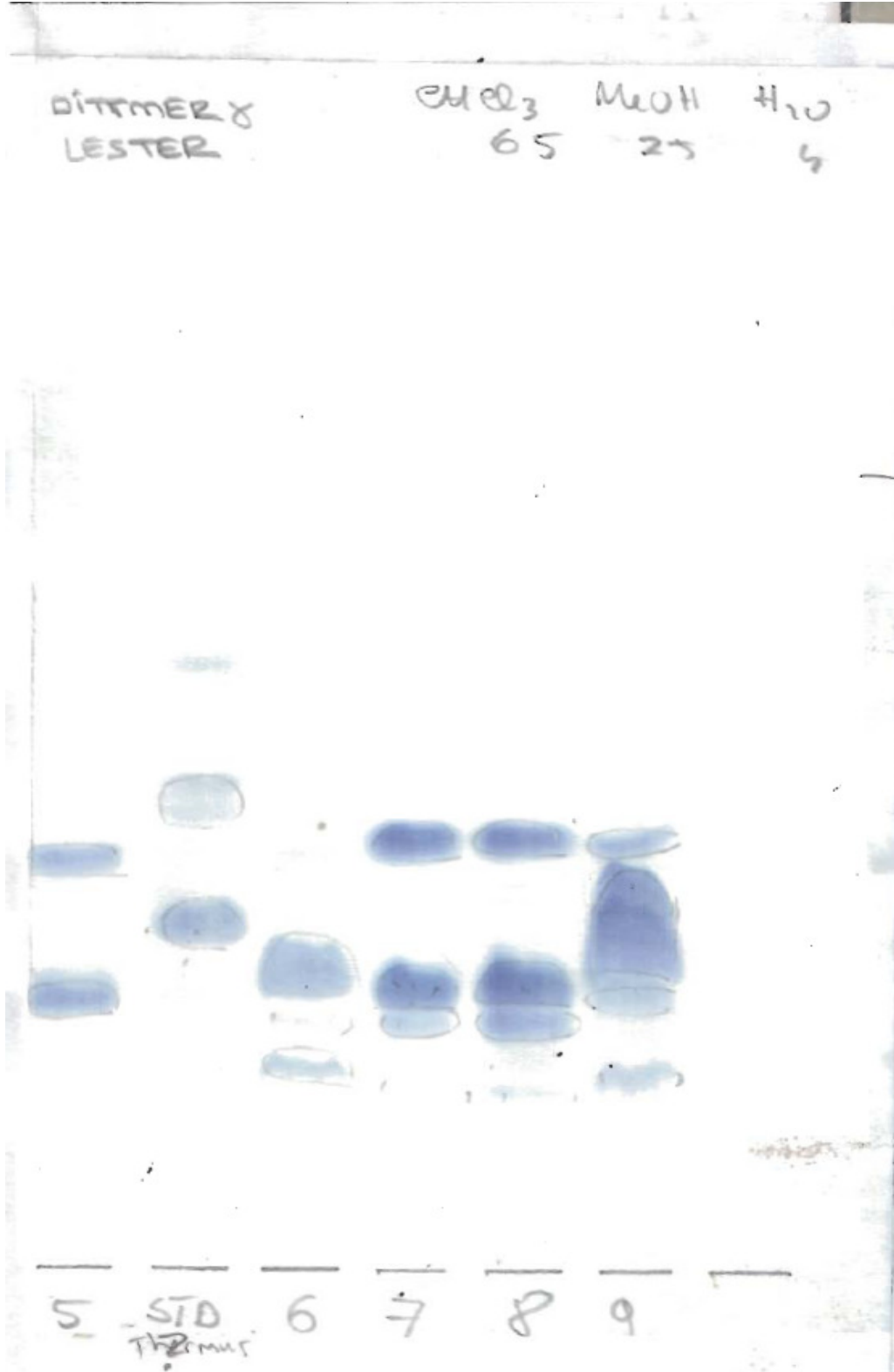
4.4.LİPİT VE YAĞ ASİDİ ANALİZİ:

4.4.1.Lipit Analizi

Thermus ve *Bacillus* standartları ile yapılan karşılaştırmalarda izole edilen bakterilerin fosfolipit, glikolipit ve aminolipitlerinin *Bacillus* standartlarına büyük oranda benzerlik gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.45-4.50).



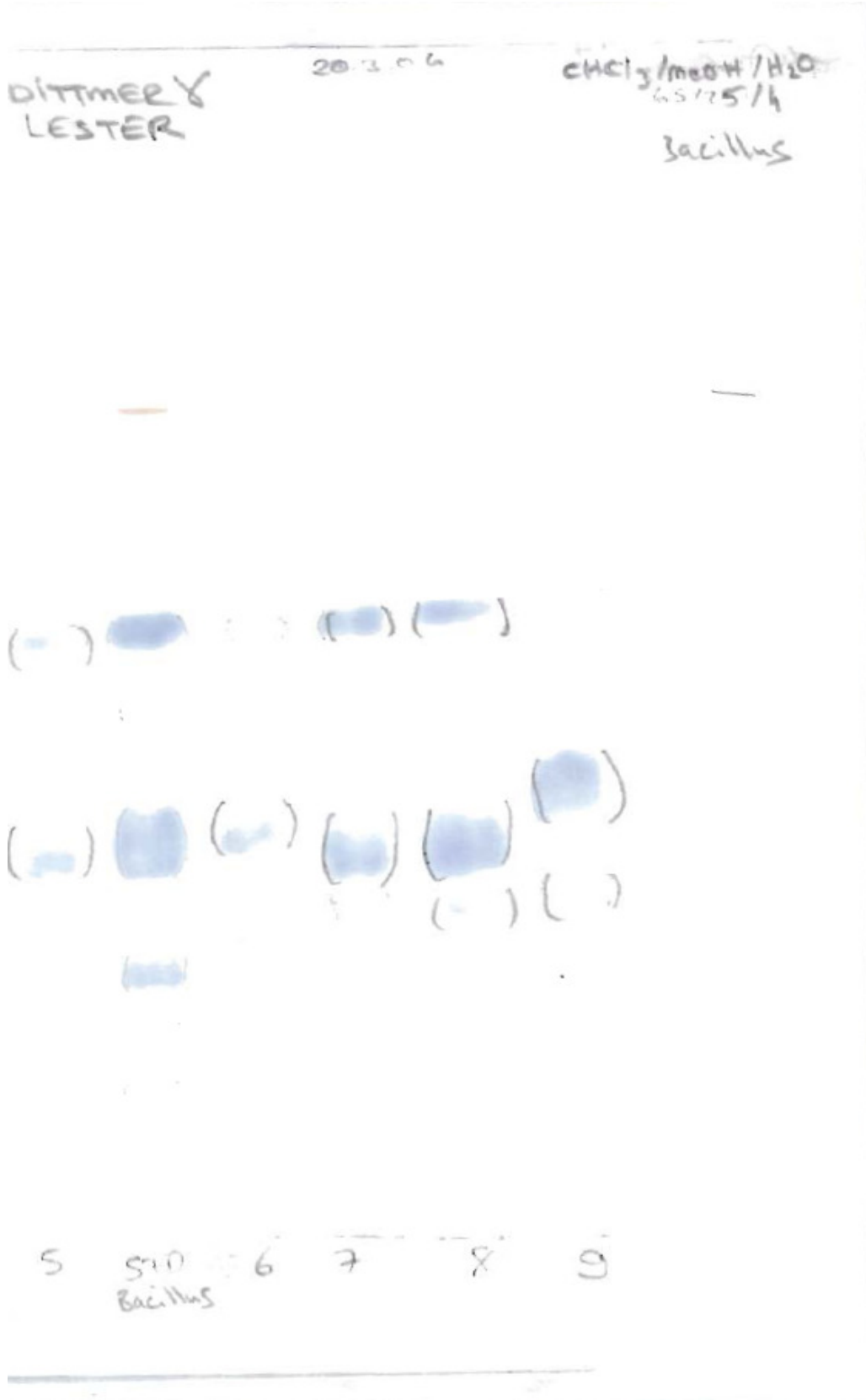
Şekil 4.45. Bakteri İzolatlarına ait Glikolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Glikolipit Standartları ile Karşılaştırılması



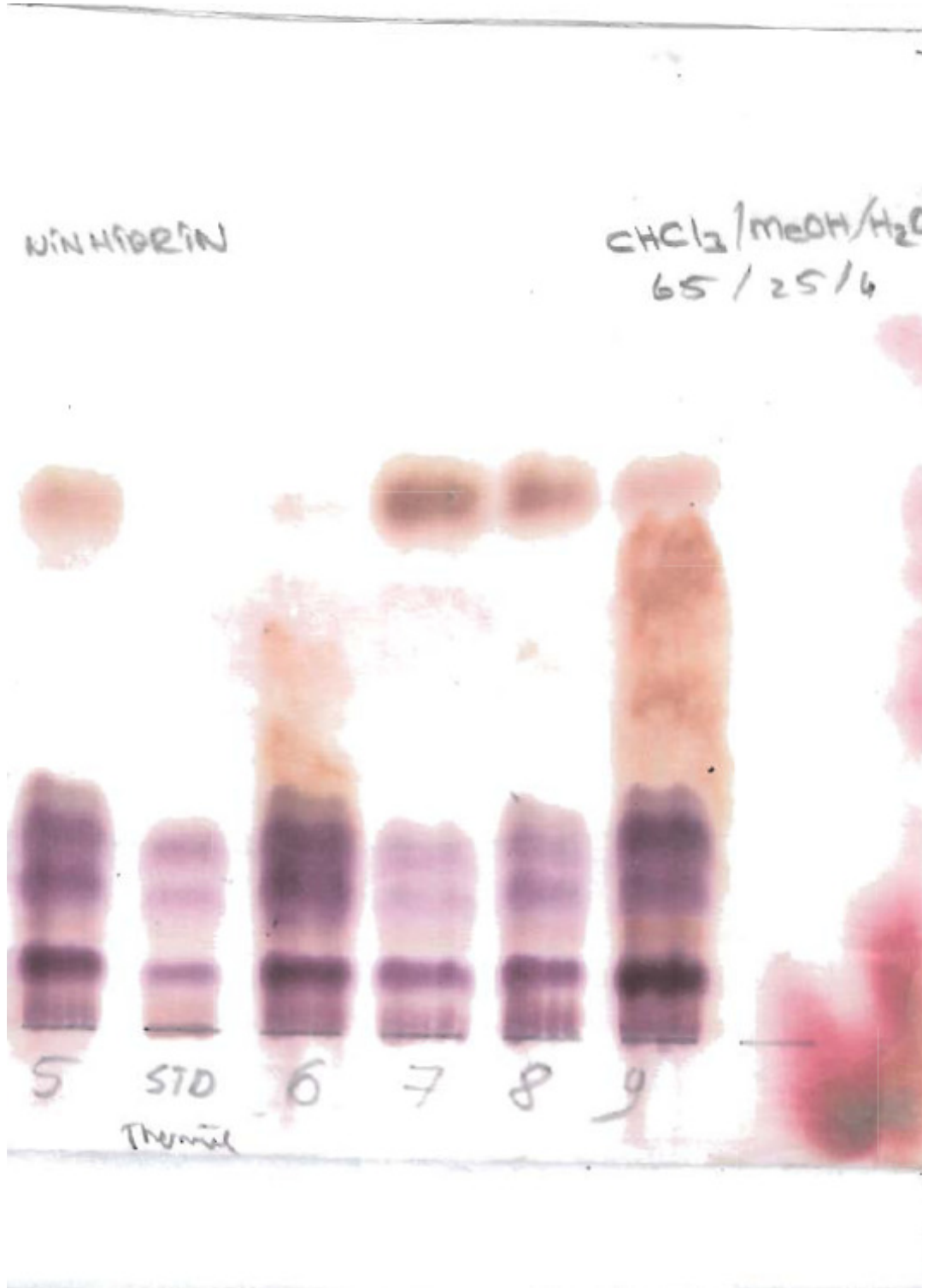
Şekil 4.46. Bakteri İzolatlarına ait Fosfolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Fosfolipit Standartları ile Karşılaştırılması



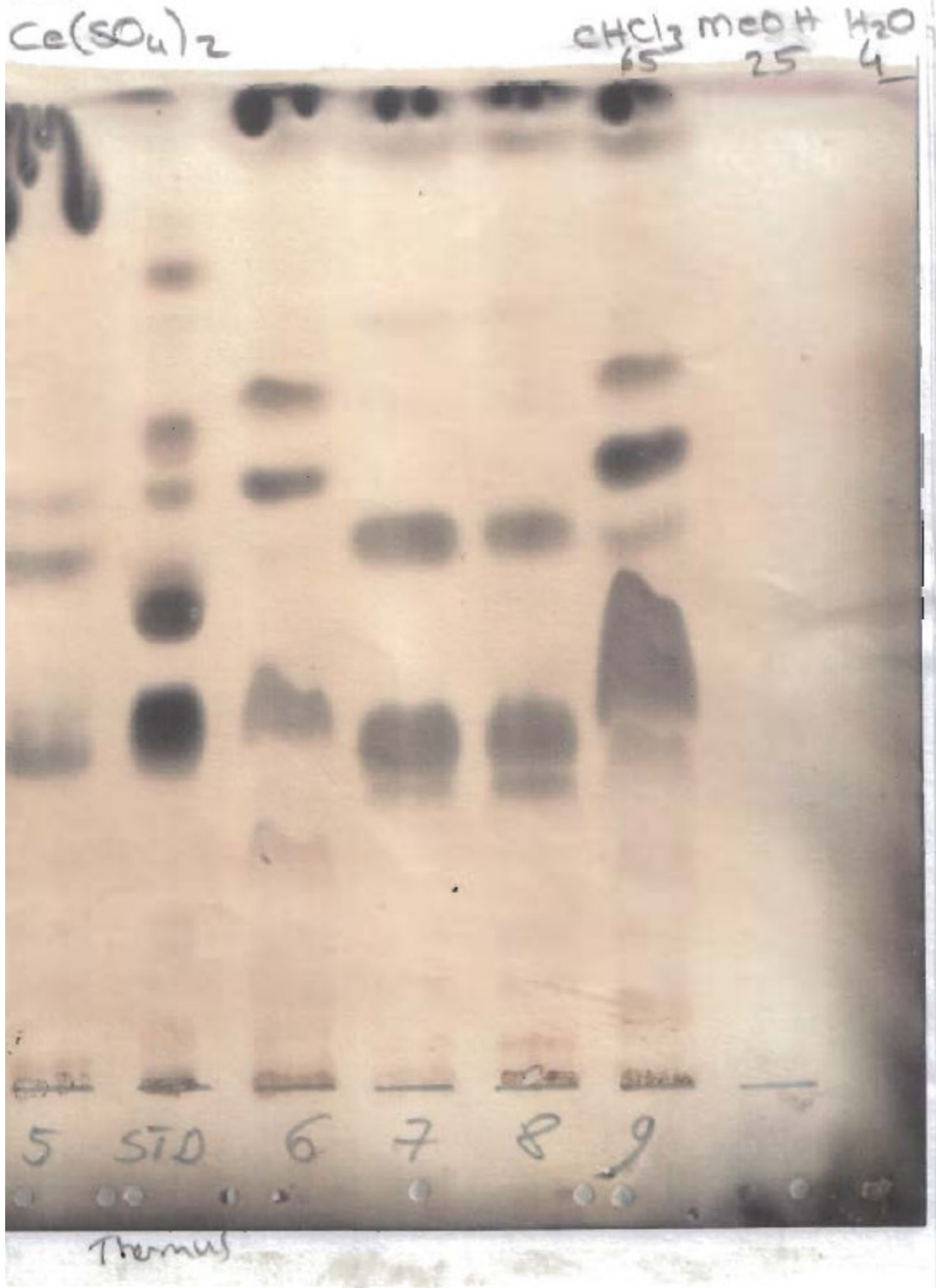
Şekil 4.47. Bakteri İzolatlarına ait Glikolipitlerin *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Glikolipit Standartları ile Karşılaştırılması



Şekil 4.48. Bakteri İzolatlarına ait Fosfolipitlerin *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Fosfolipit Standartları ile Karşılaştırılması

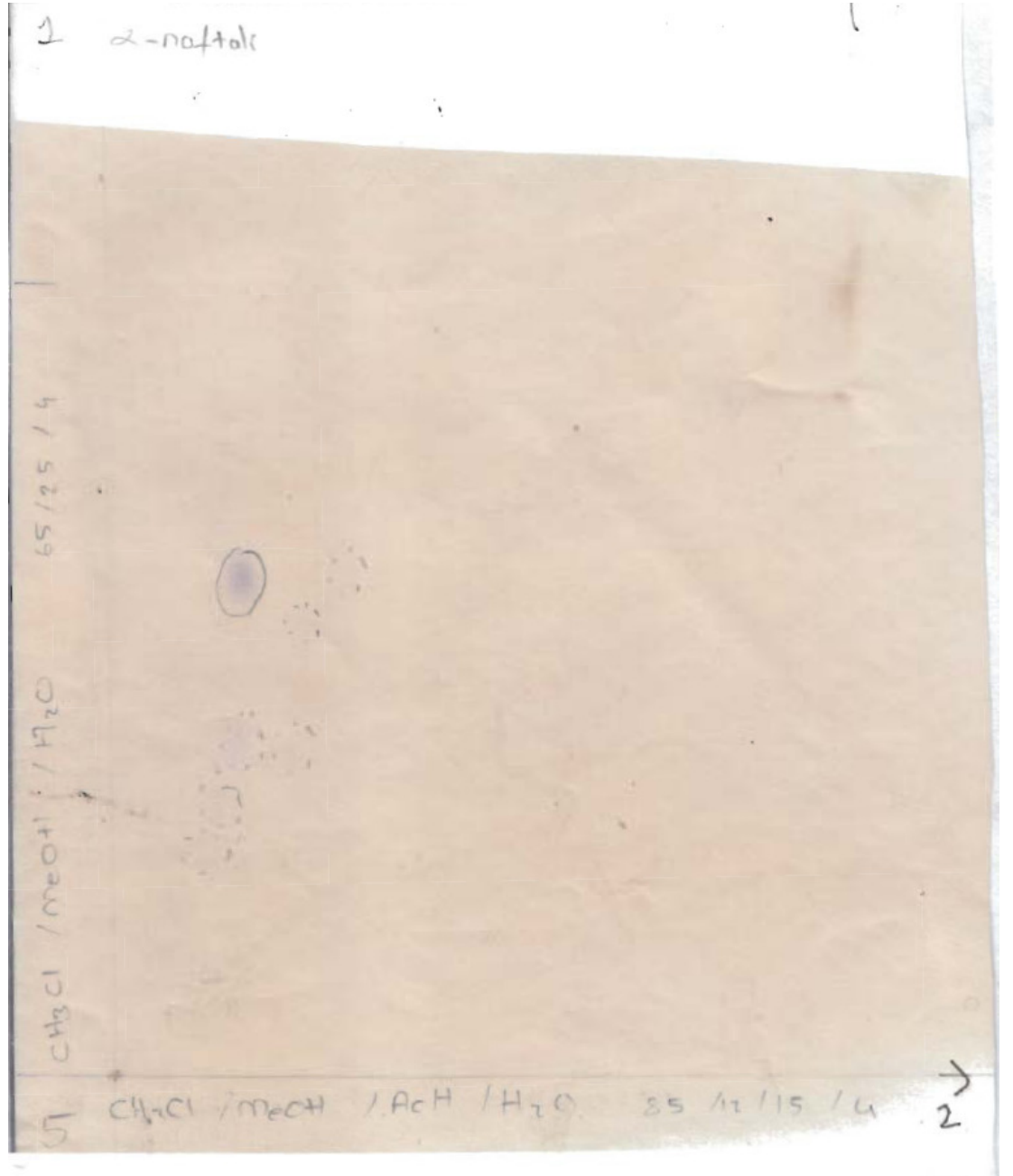


Şekil 4.49. Bakteri İzolatlarına ait Aminolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Aminolipit Standartları ile Karşılaştırılması

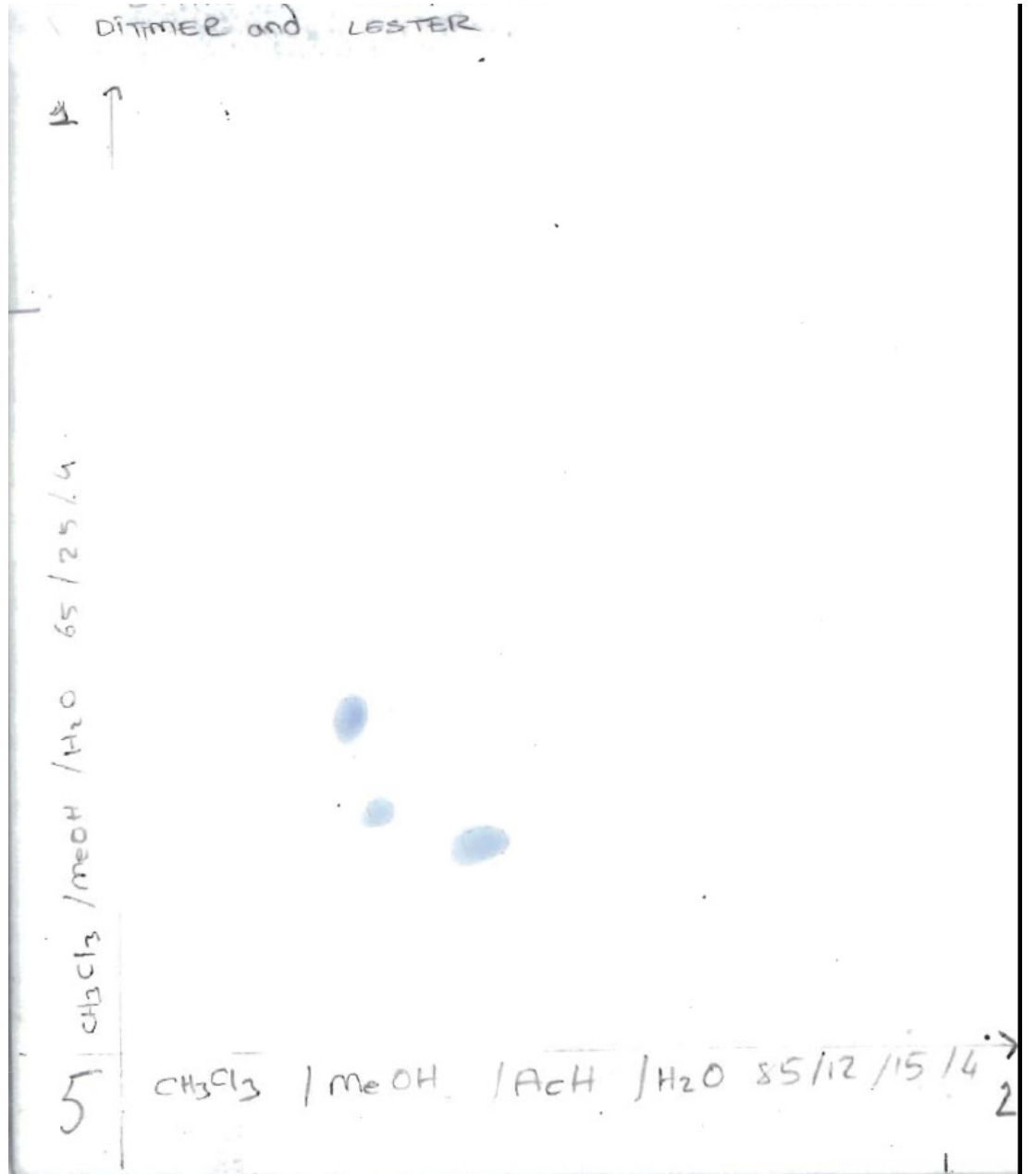


Şekil 4.50. Bakteri İzolatlarına ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Fosfo-gliko-aminolipit Standartları ile Karşılaştırılması

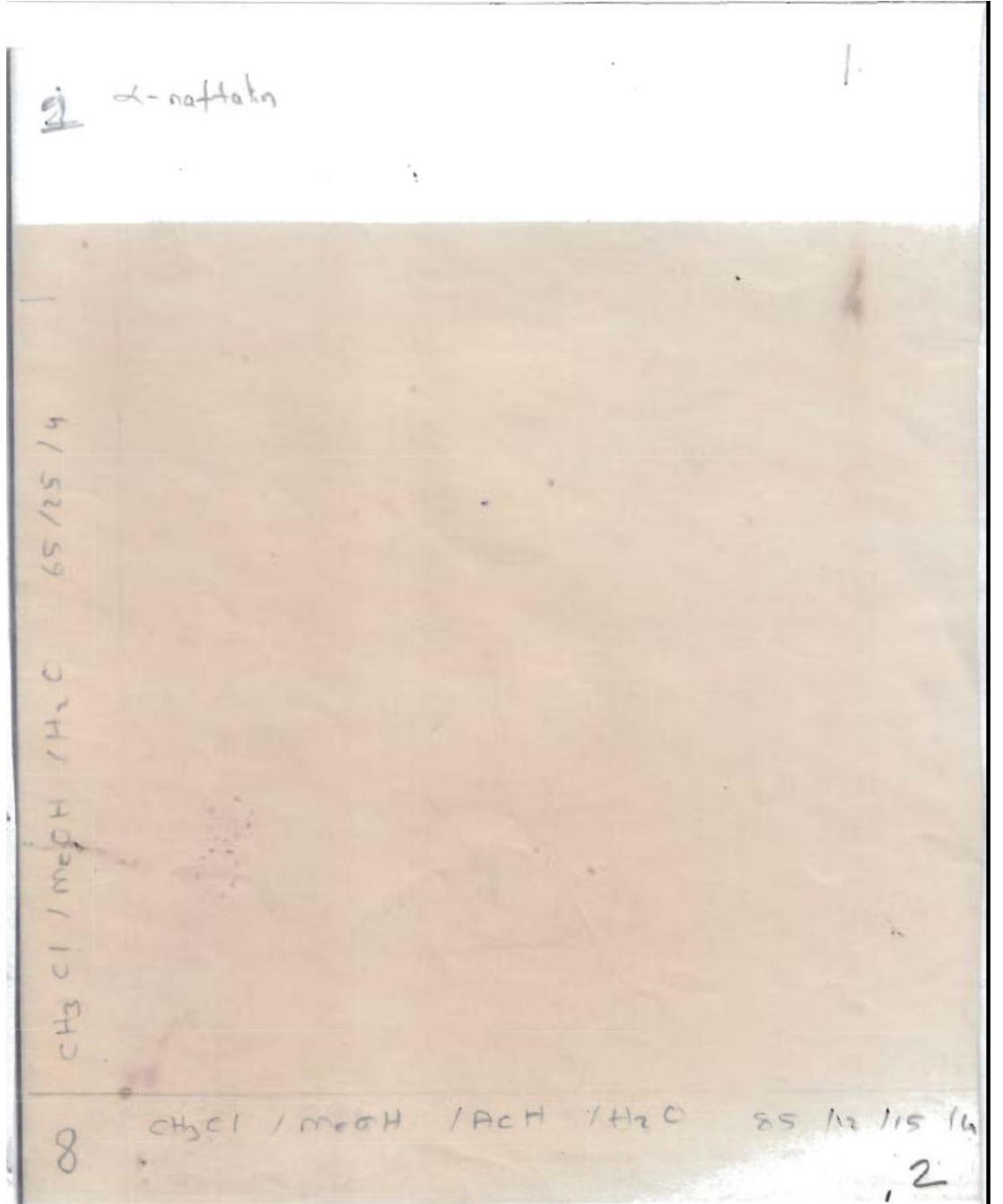
Bakterilerin içerdikleri fosfolipit ve glikolipitleri iki yönlü TLC'ler kullanılarak daha belirgin bir şekilde analiz edildi (Şekil 4.51-4.56).



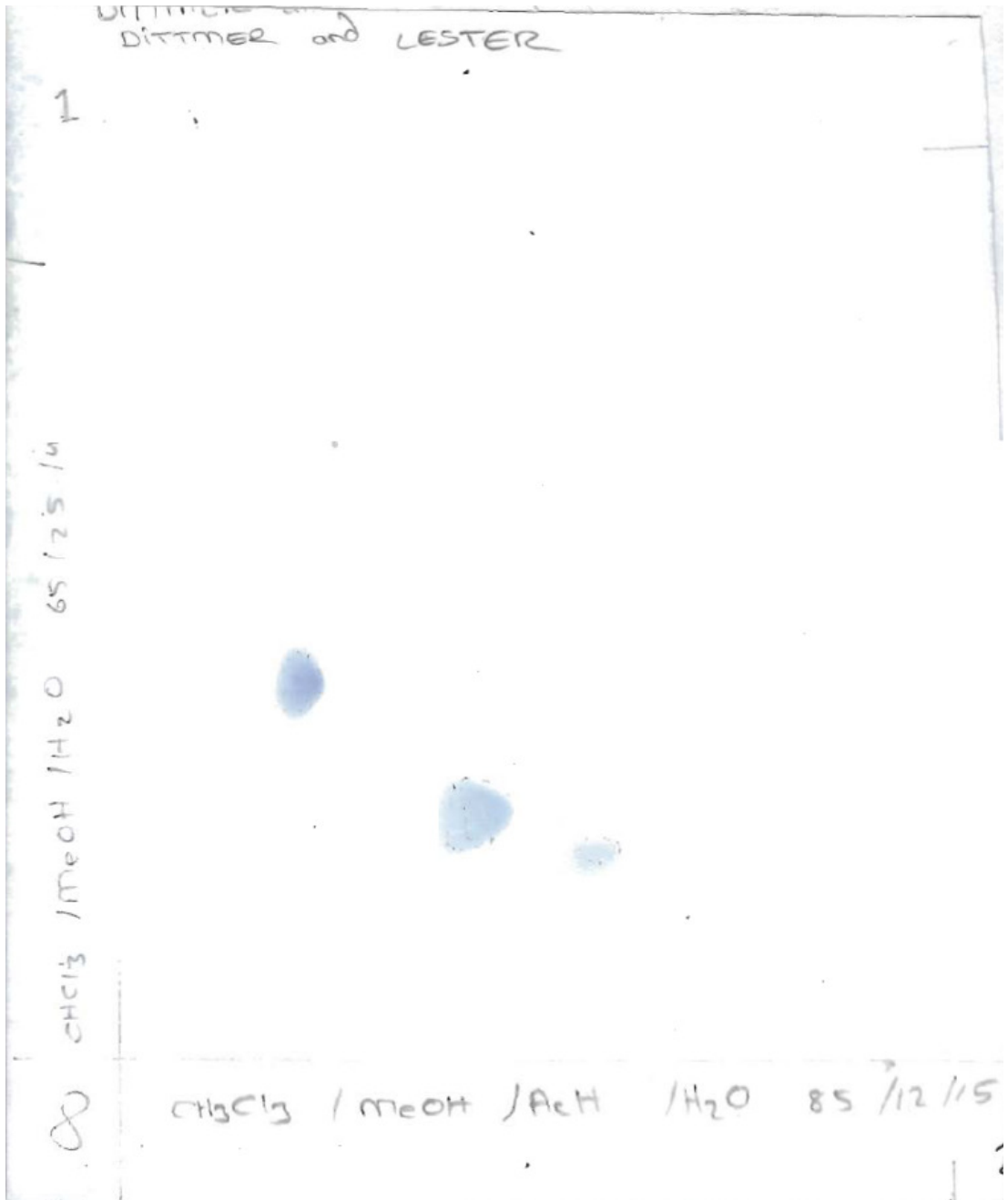
Şekil 4.51. KG5'e ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi



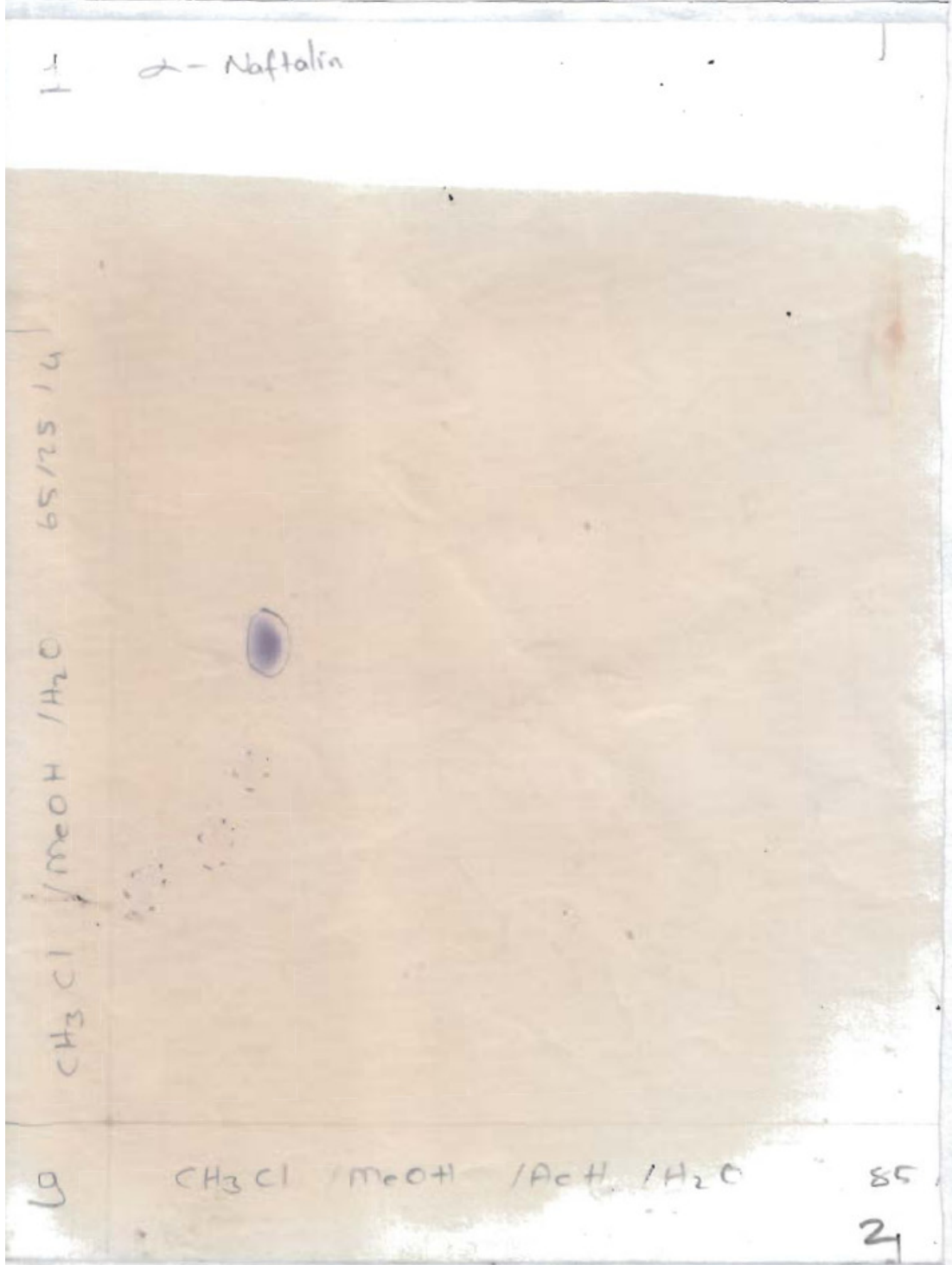
Şekil 4.52. KG5'e ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi



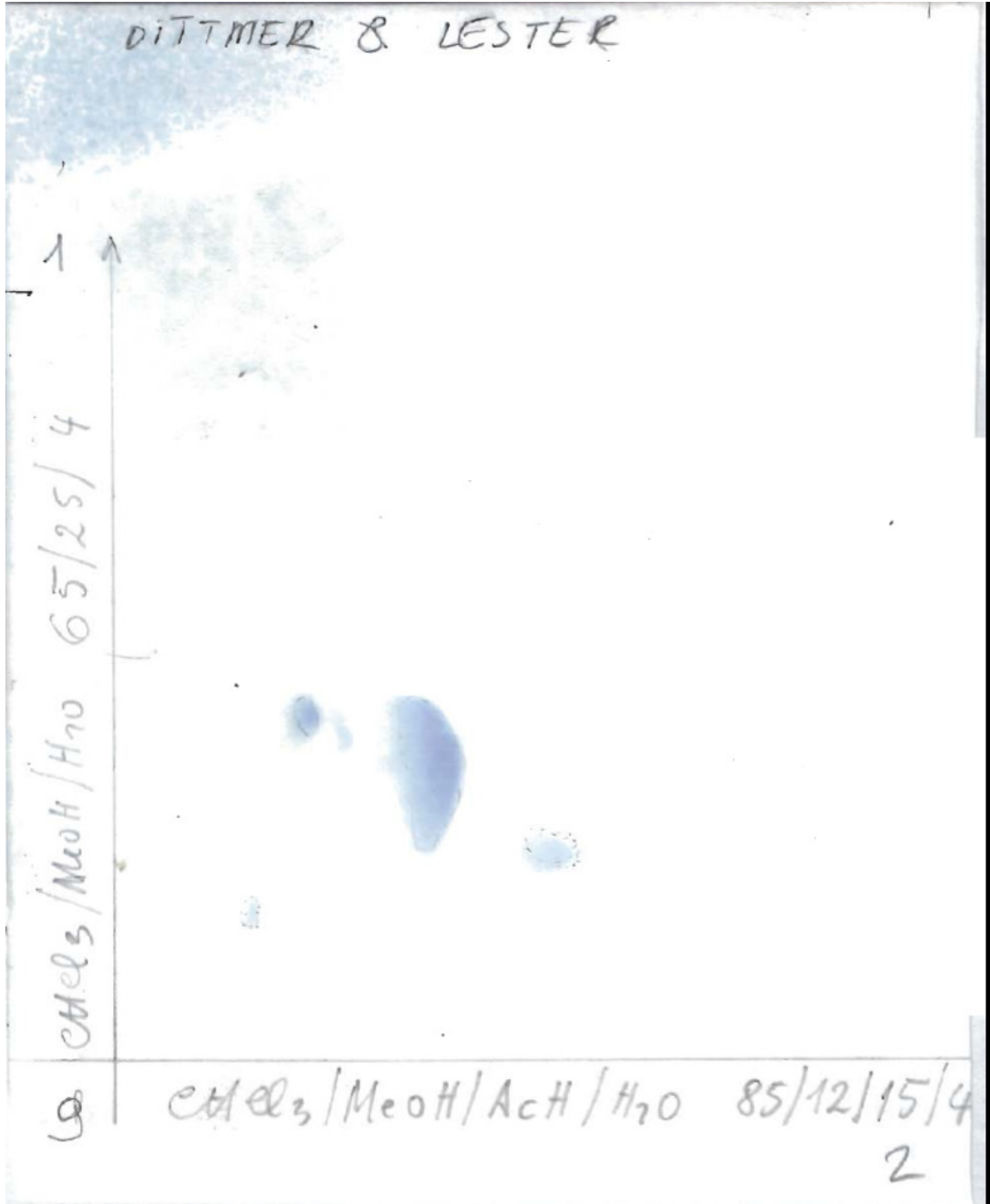
Şekil 4.53. KG8'e ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi



Şekil 4.54. KG8'e ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi

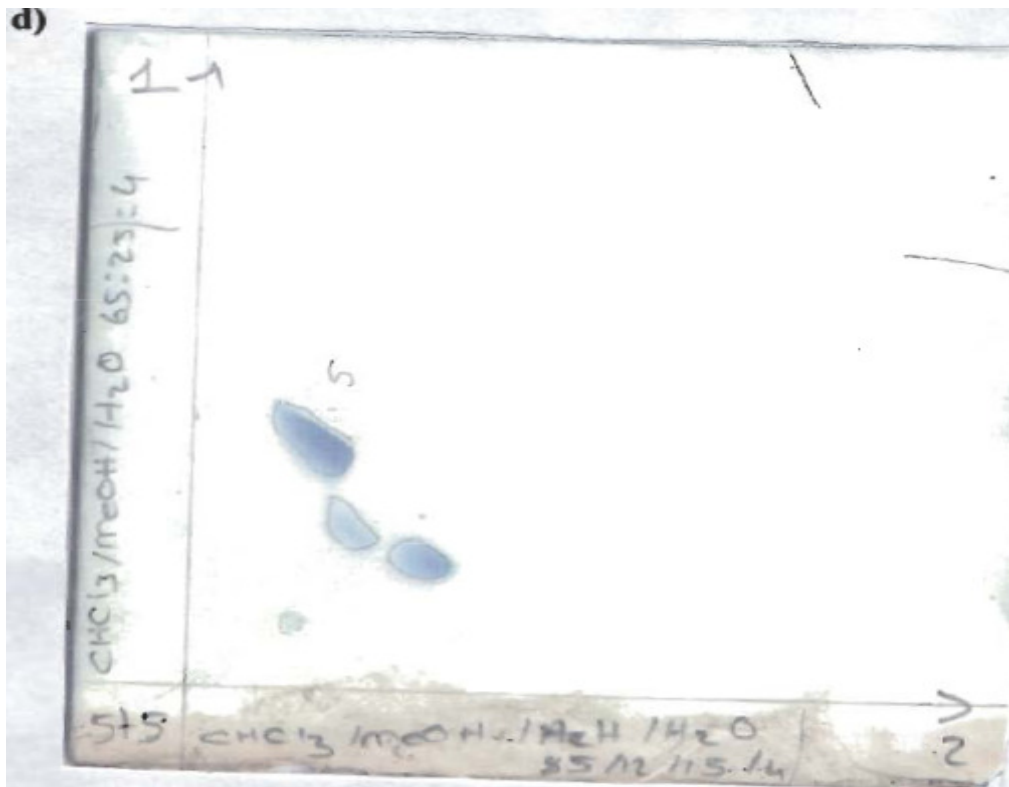
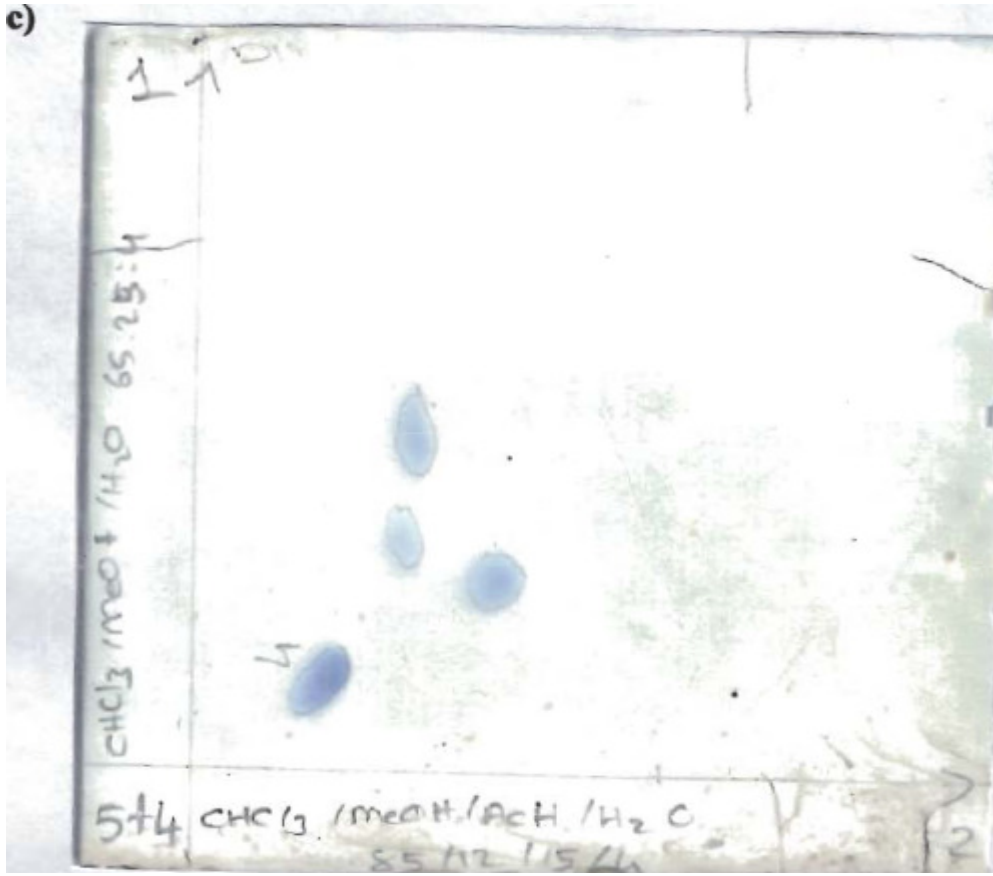


Şekil 4.55. KG9'a ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi

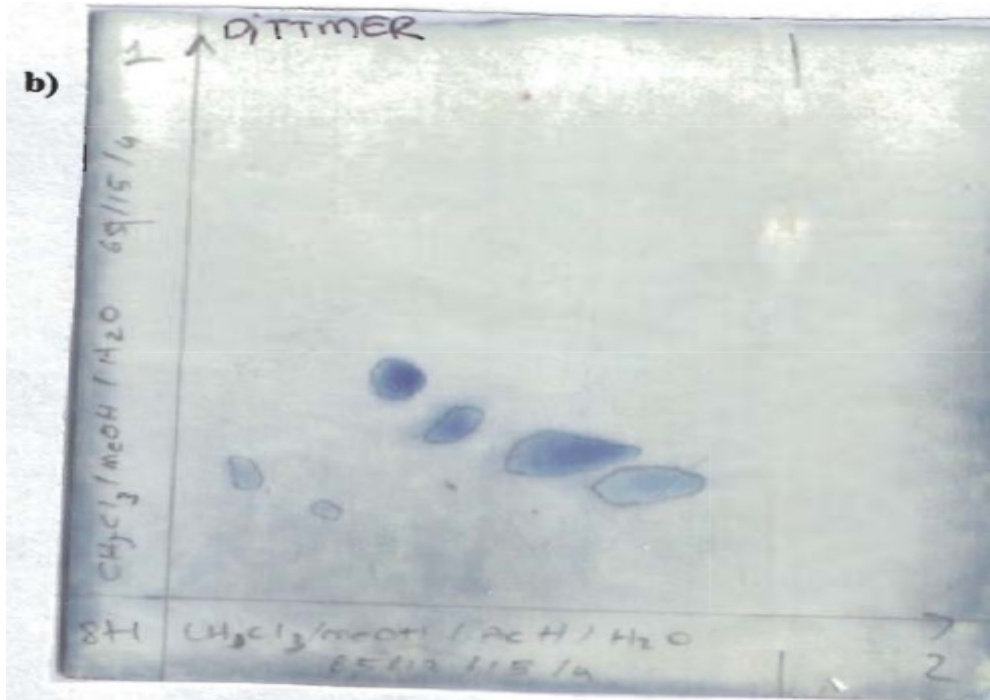
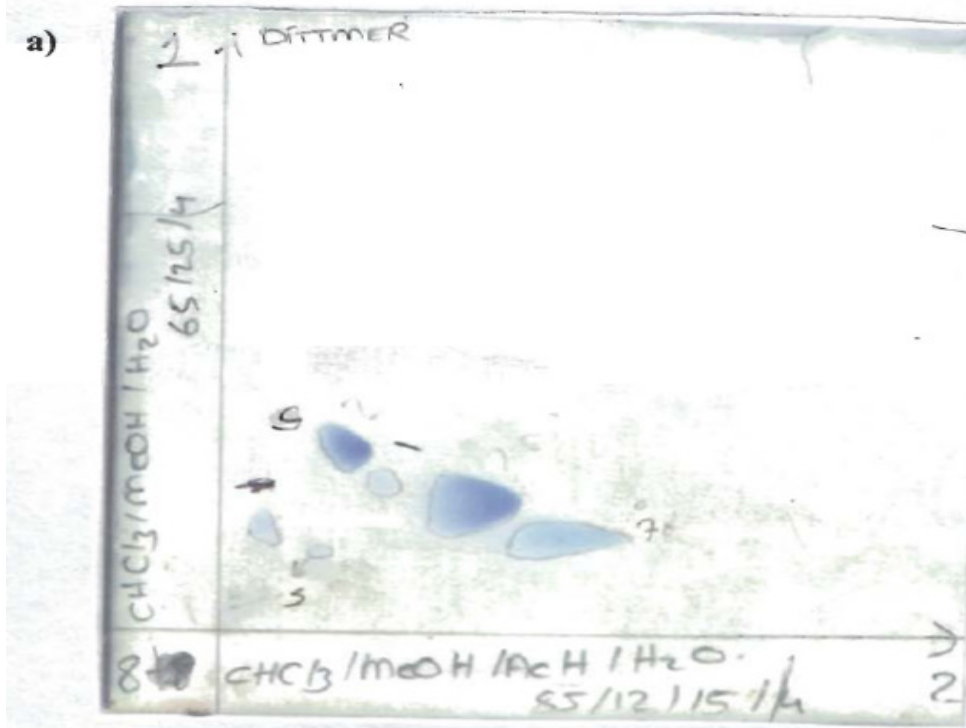


Şekil 4.56. KG9'a ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi

Sekiz tane lipid standardı kullanılarak 3 bakteri izolatın içerdiği fosfolipit çeşitleri iki yönlü TLC ile tespit edildi. KG5'in toplamda 4 fosfolipit bandı içerdiği ve bunlardan birinin minör (3-sn-fosfatidil L-serin, bovine brain) diğer üç bantın ise majör olduğu (1,3-sn-fosfatidil-rac-gliserol sodyum klorür, -rac-1,2, dipalmitol-gliserol-3-fosfoetanolamine, bir tanesi de standartlara karşılık gelmedi) tespit edildi (Şekil 4.57). KG8'in toplamda 6 bant içerdiği ve bunlardan 3 bantın minör (1,3-sn-fosfatidil-rac-gliserol sodyum klorür, 3-sn-fosfatidil L-serin (bovine brain), bir tanesi de standartlara karşılık gelmedi) 3 bantın majör olduğu (-rac-1,2, dipalmitol-gliserol-3-fosfoetanolamine, DL- α -fosfoasidik asit dipalmitol, bir tanesi de standartlara karşılık gelmedi) tespit edildi (Şekil 4.58). KG9'un ise toplamda 4 fosfolipit bandı içerdiği ve bunlardan 1 bantın minör (3-sn-fosfatidil L-serin) 3 bantın majör (cardiolipin disodyum tuzu (bovine brain), -rac-1,2, dipalmitol-gliserol-3-fosfoetanolamin, DL- α -fosfoasidik asit dipalmitol) olduğu tespit edildi (Şekil 4.59).



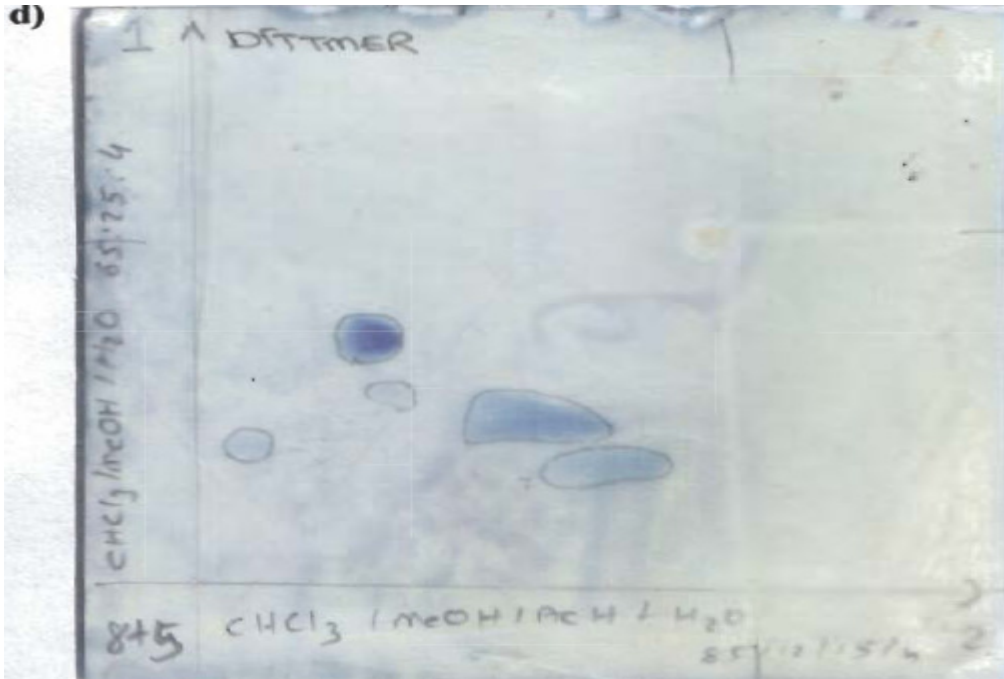
Şekil 4.58. Fosfolipit Standartları Kullanılarak KG8'e ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a, b, c, d ve e)

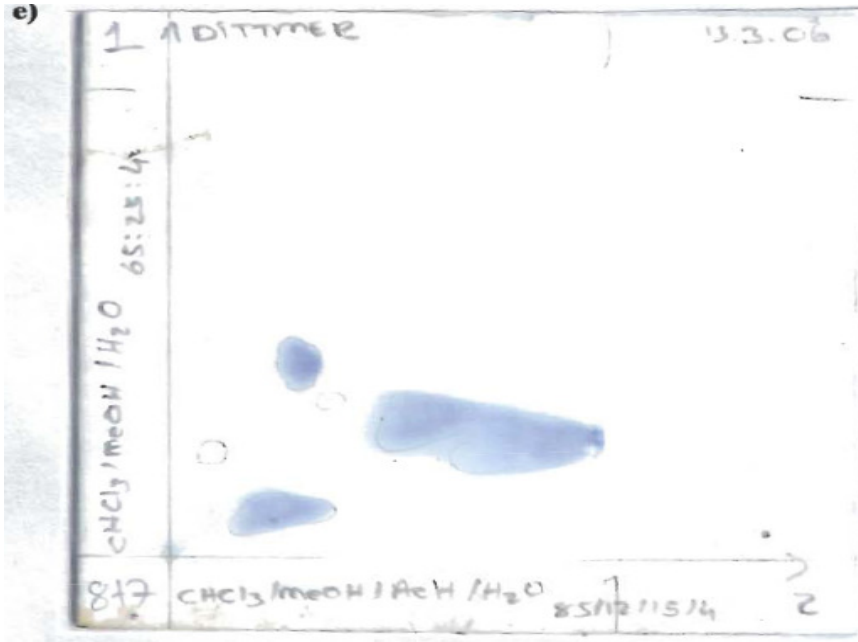


c)

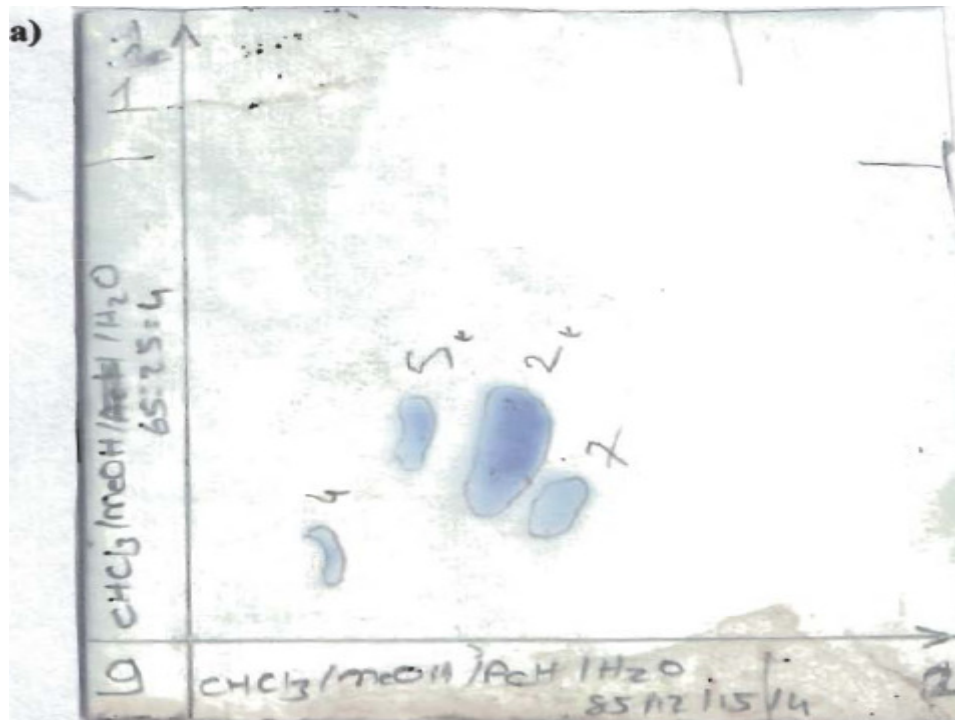


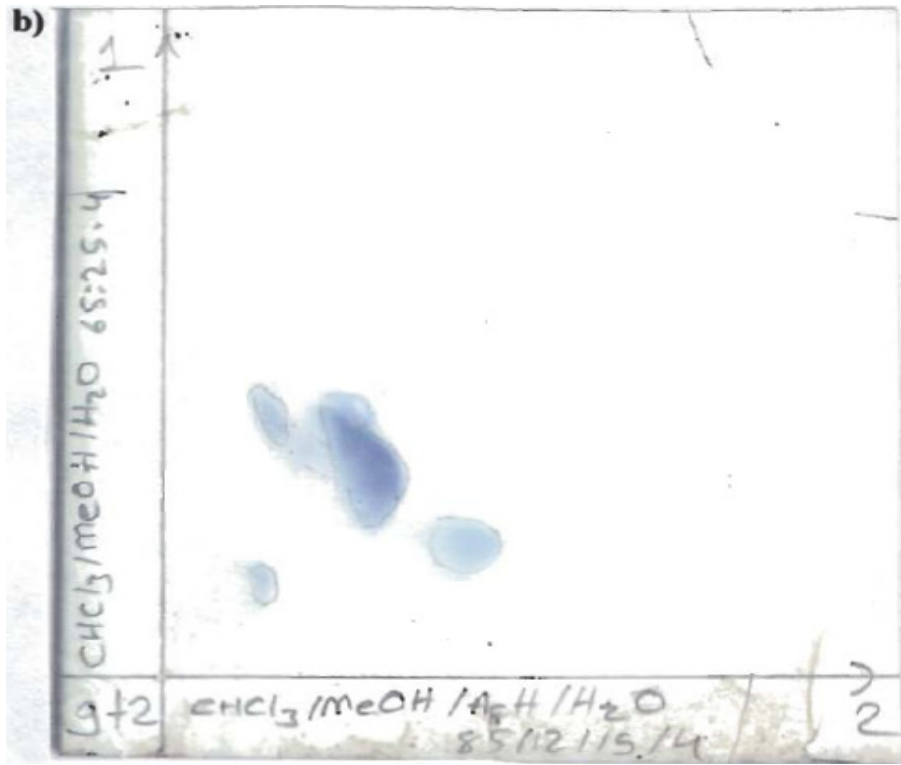
d)

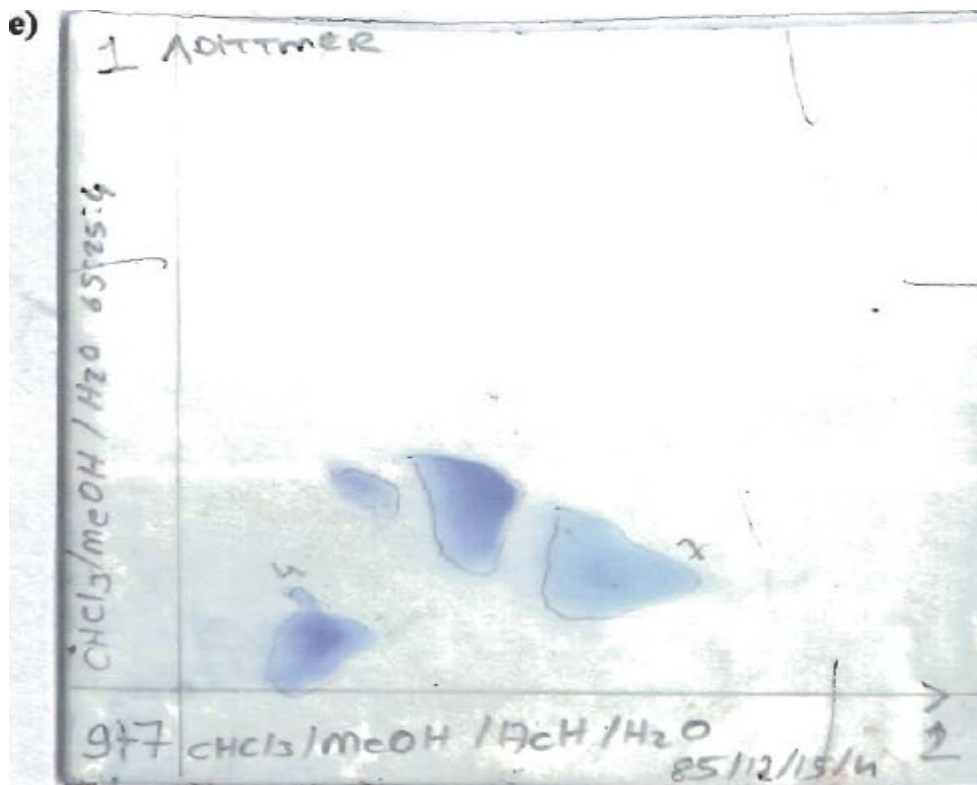
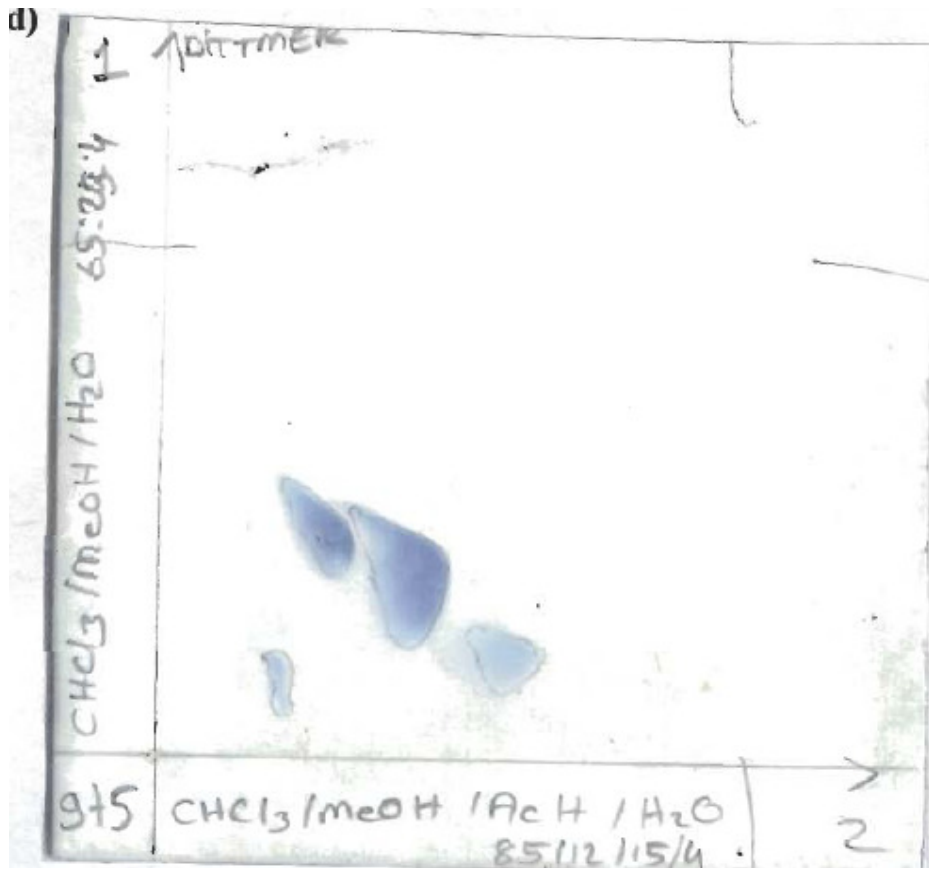




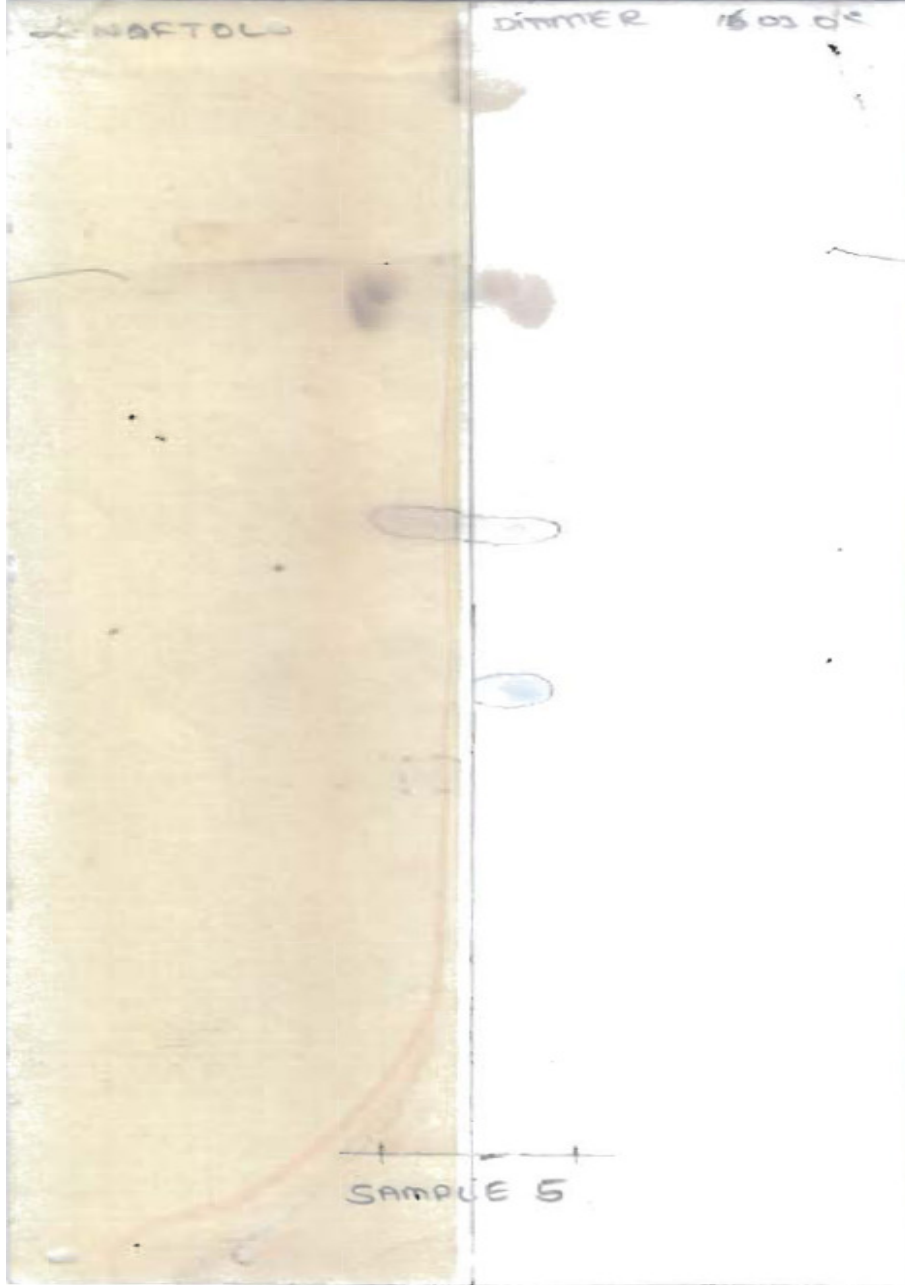
Şekil 4.59. Fosfolipit Standartları Kullanılarak KG9'a ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a, b, c, d ve e)



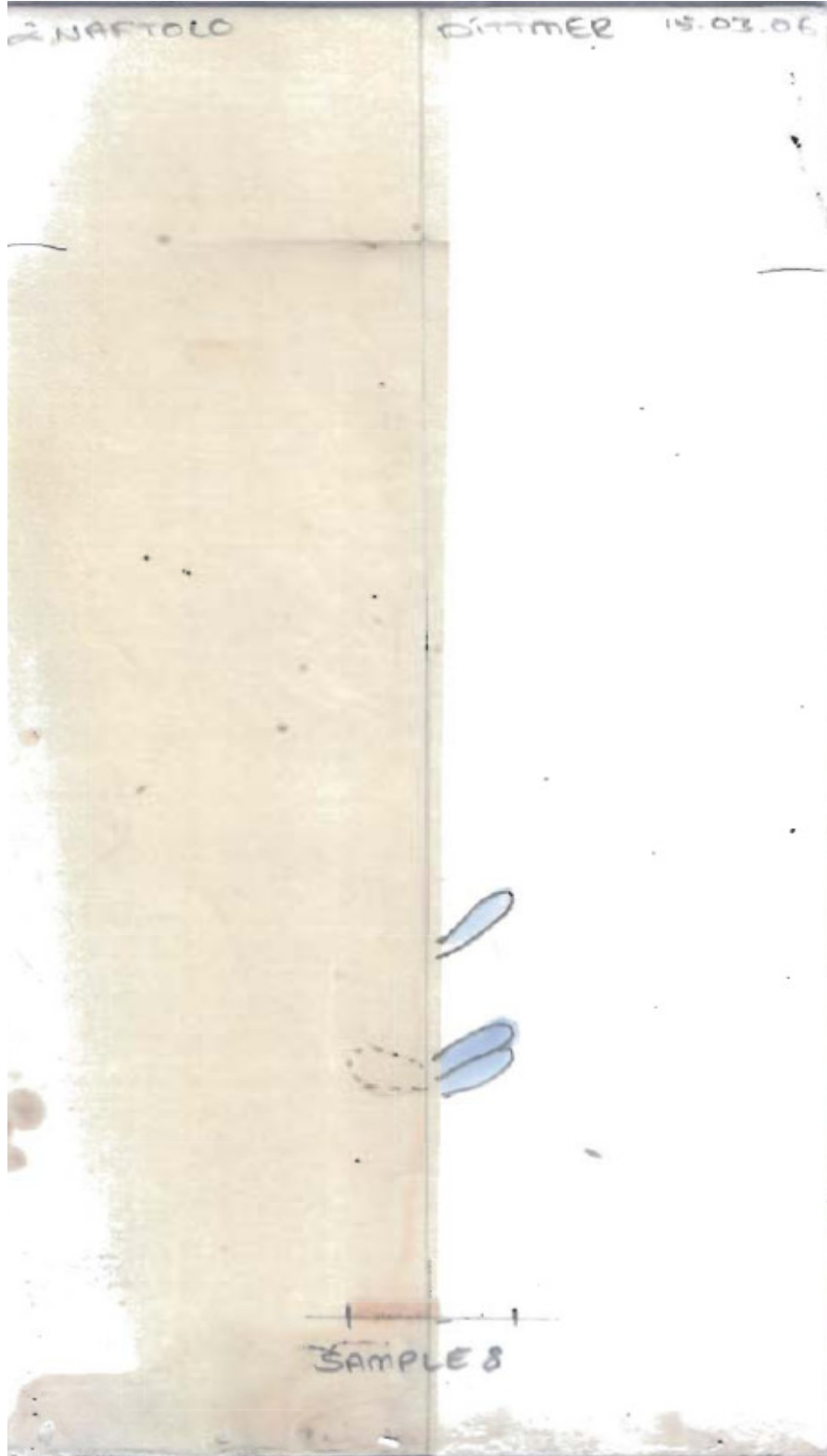




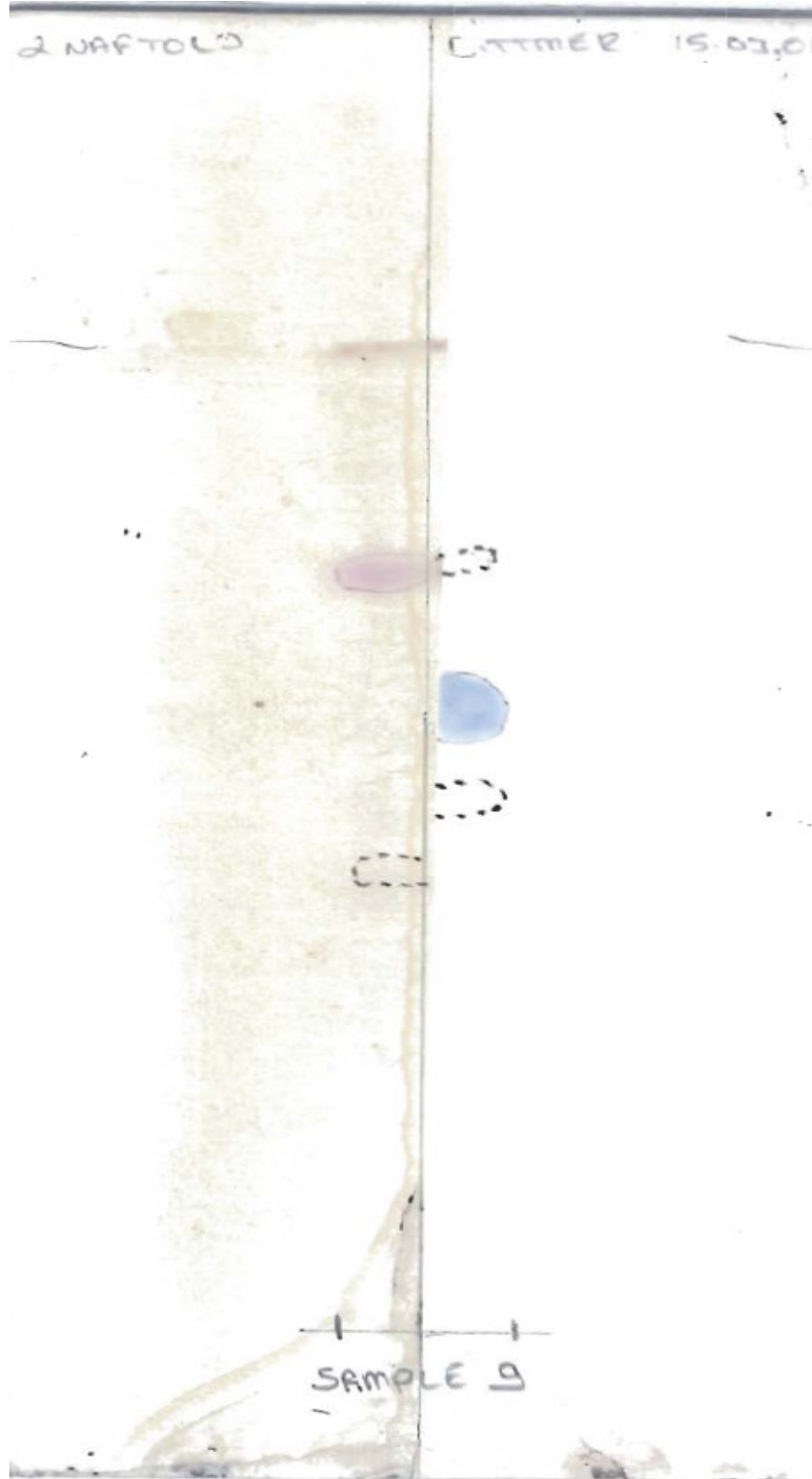
Bakterilerin tek yönlü TLC ile yapılan fosfo-glikolipit analizleri sonucunda yalnız KG5'in bir tane fosfo-glikolipit içerdiği tespit edildi. KG8 ve KG9'un ise içermediği tespit edildi (Şekil 4.60-4.62).



Şekil 4.60. KG5'e ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti



Şekil 4.61. KG8'e ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti

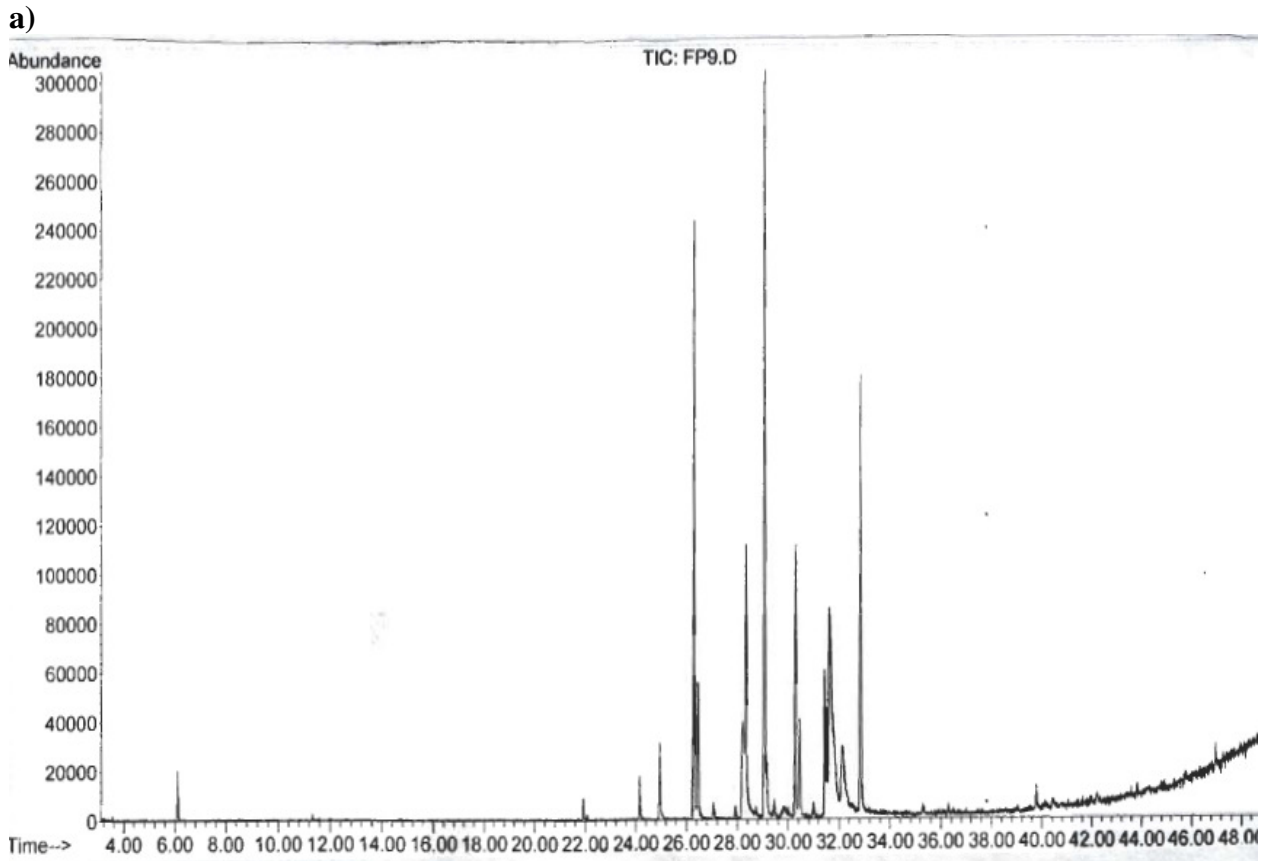


Şekil 4.62. KG9'a ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti

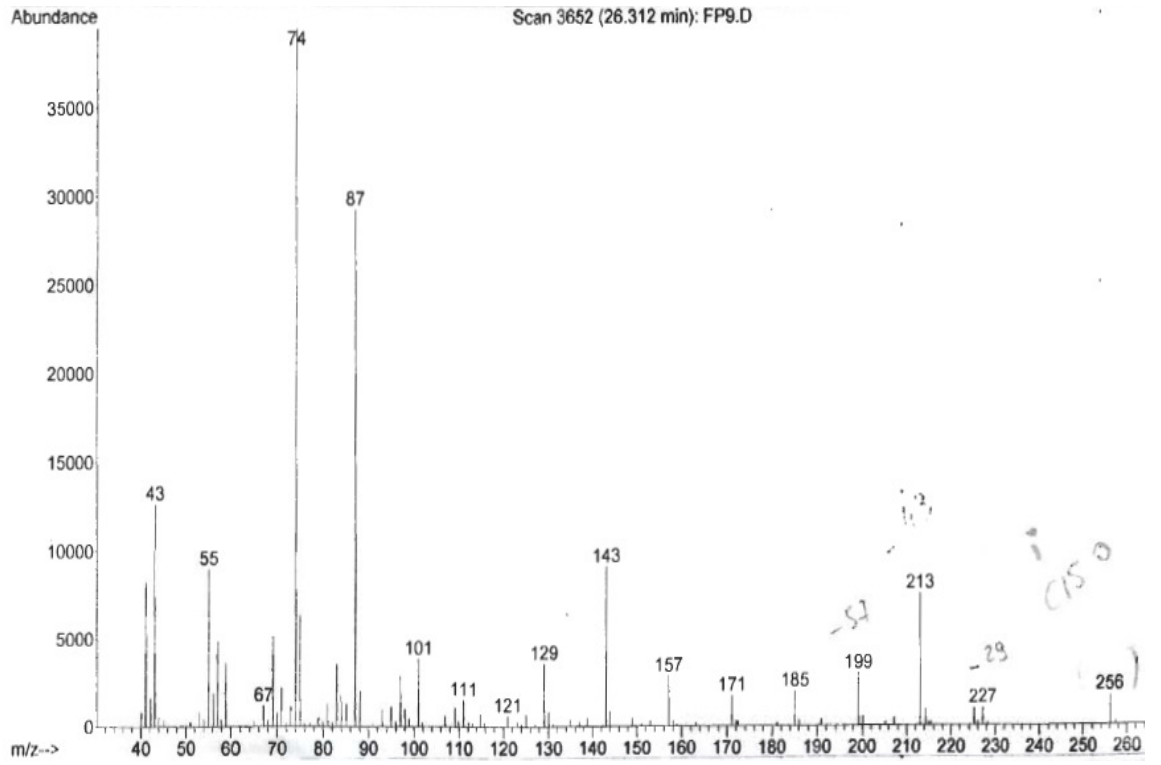
4.4.2. Yağ Asidi Analizi

GC-MS analizi sonucunda bakterilerin total hücre yağ asitlerinin çeşidi ve yüzde oranları (FAME kompozisyonu) tespit edildi. Tablo da görüldüğü gibi KG5 en fazla oranda nC16:0 (% 28) , KG8 iC15:0 (% 44.6) ve KG9 ise iC15:0 (% 37.6)' i en fazla oranda ihtiva ettiği tespit edildi. KG5, KG8 ve KG9 varyetelerine ait yağ asitlerinin GC-MS spektrumları incelenerek yağ asidi çeşitleri tespit edilmiş (Şekil 4.63-4.65), yüzde oranları ise otomatik olarak bilgisayar programından elde edilmiştir (Tablo 4.9).

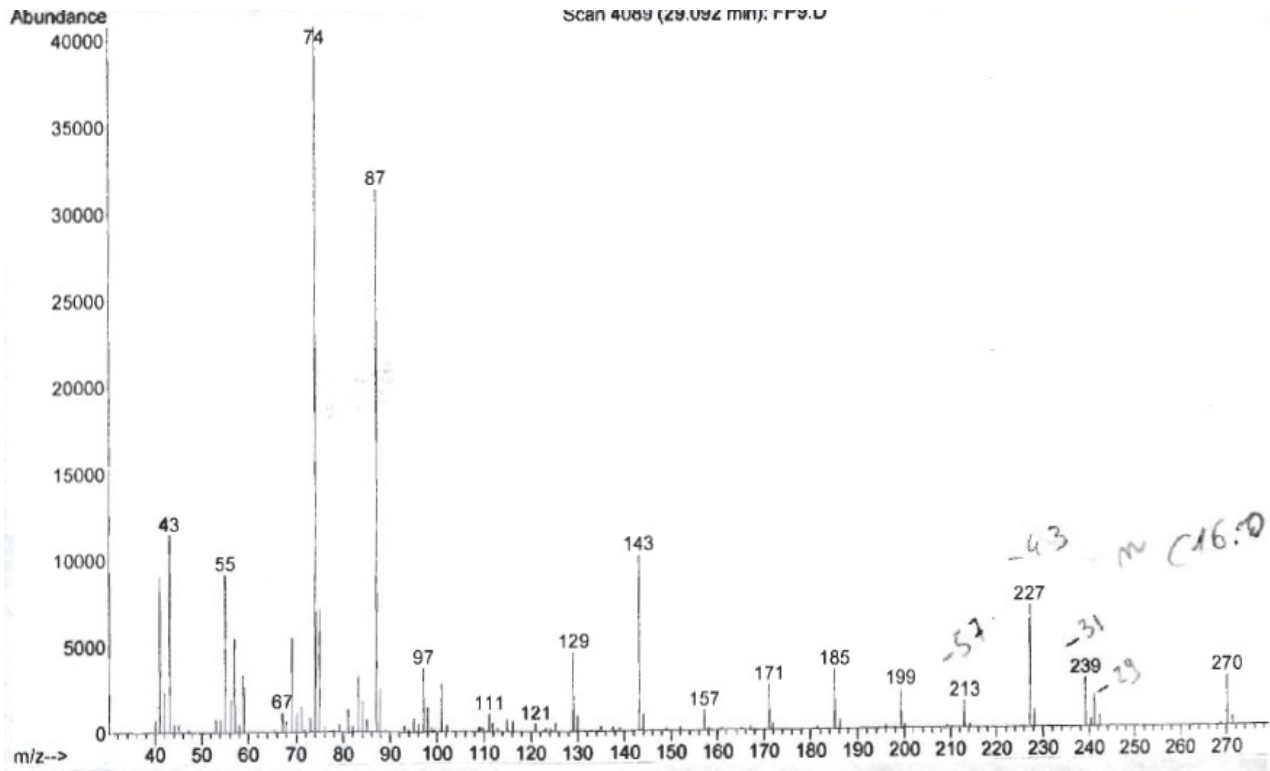
Şekil 4.63. KG5'e ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [nC16:0])



b).

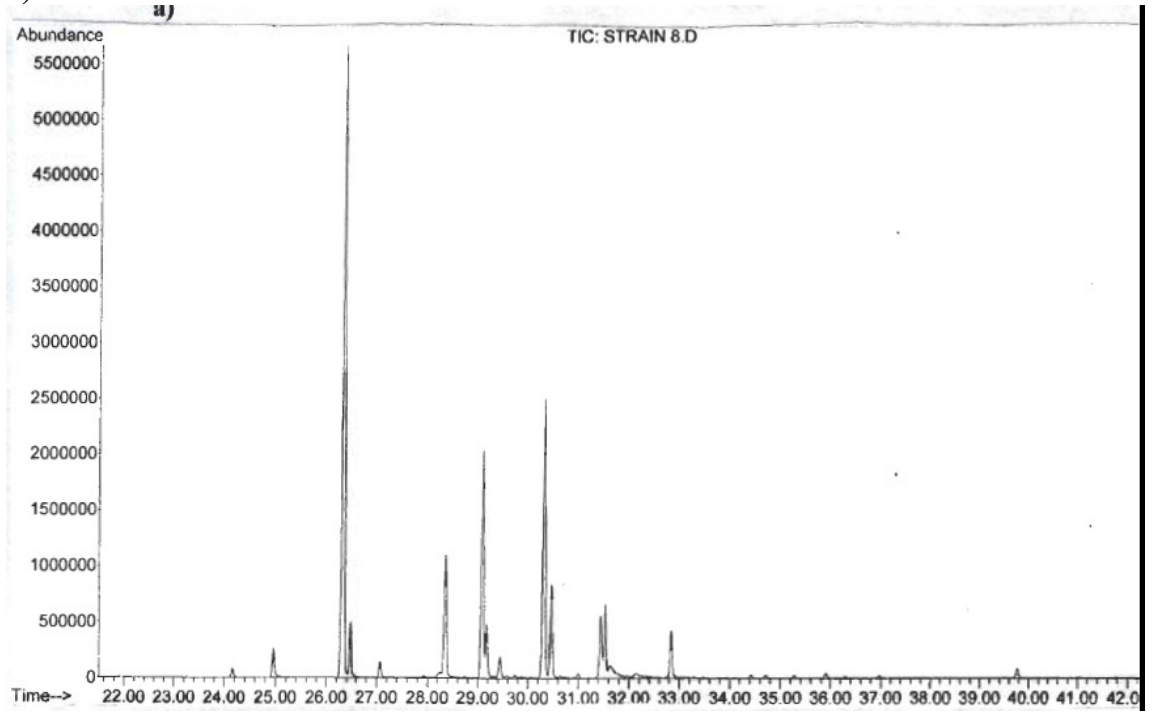


c).

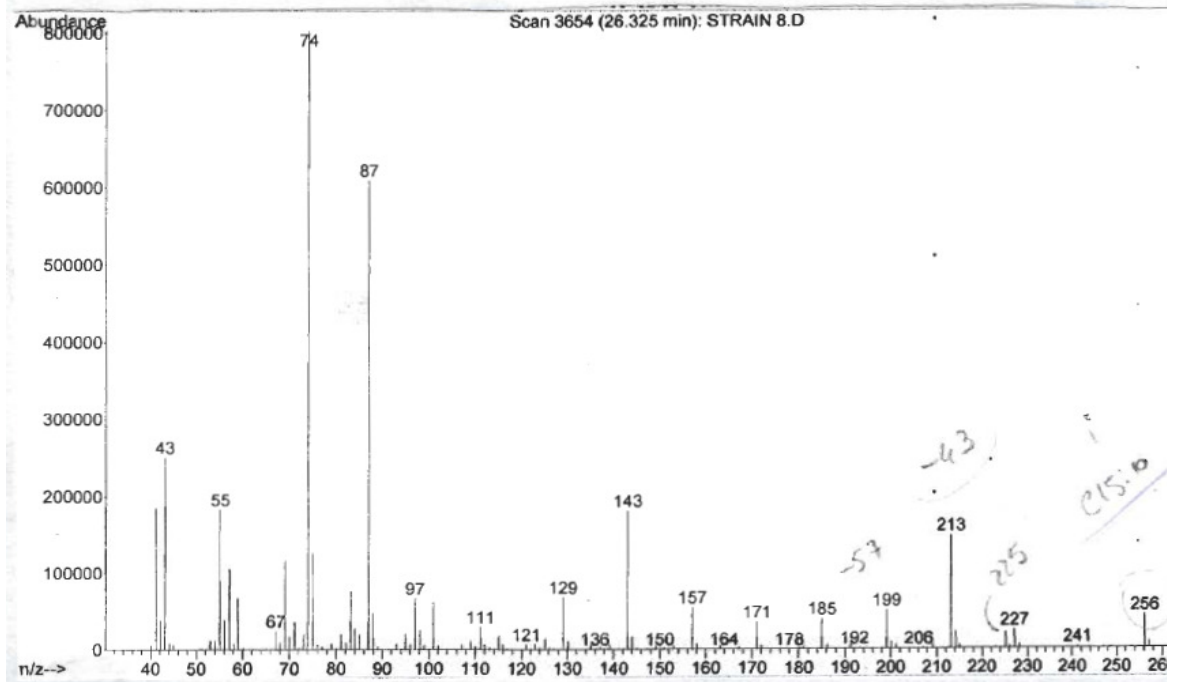


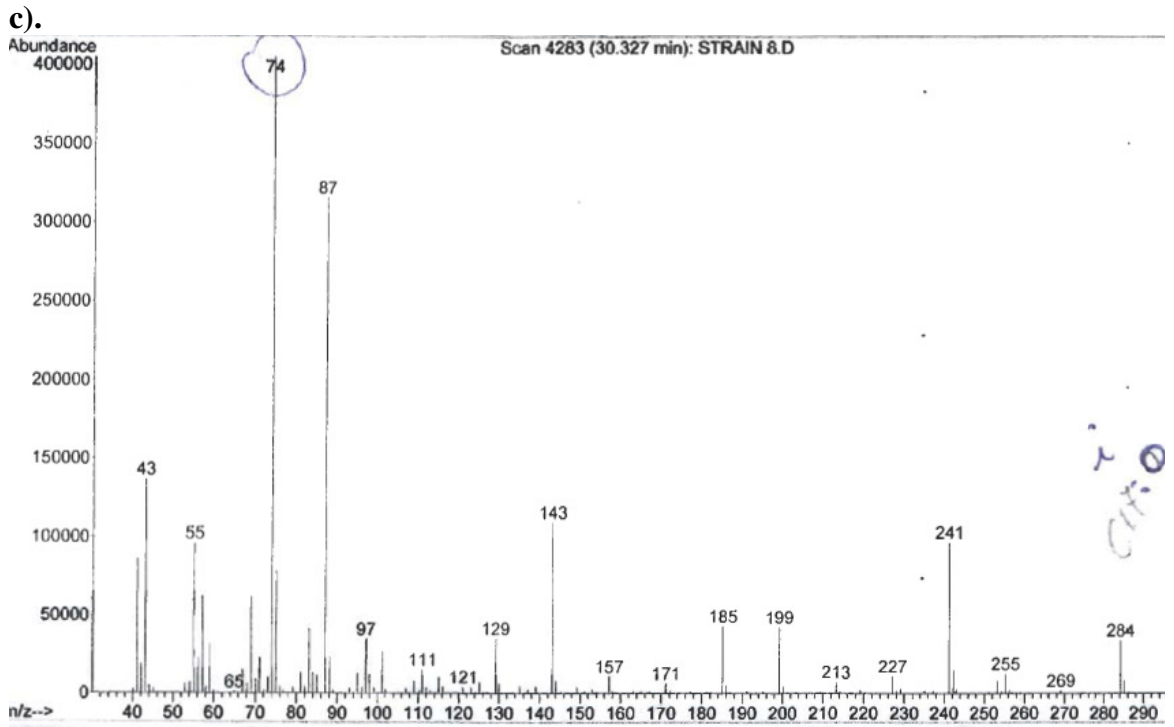
Şekil 4.64. KG8'e ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [iC17:0])

a).

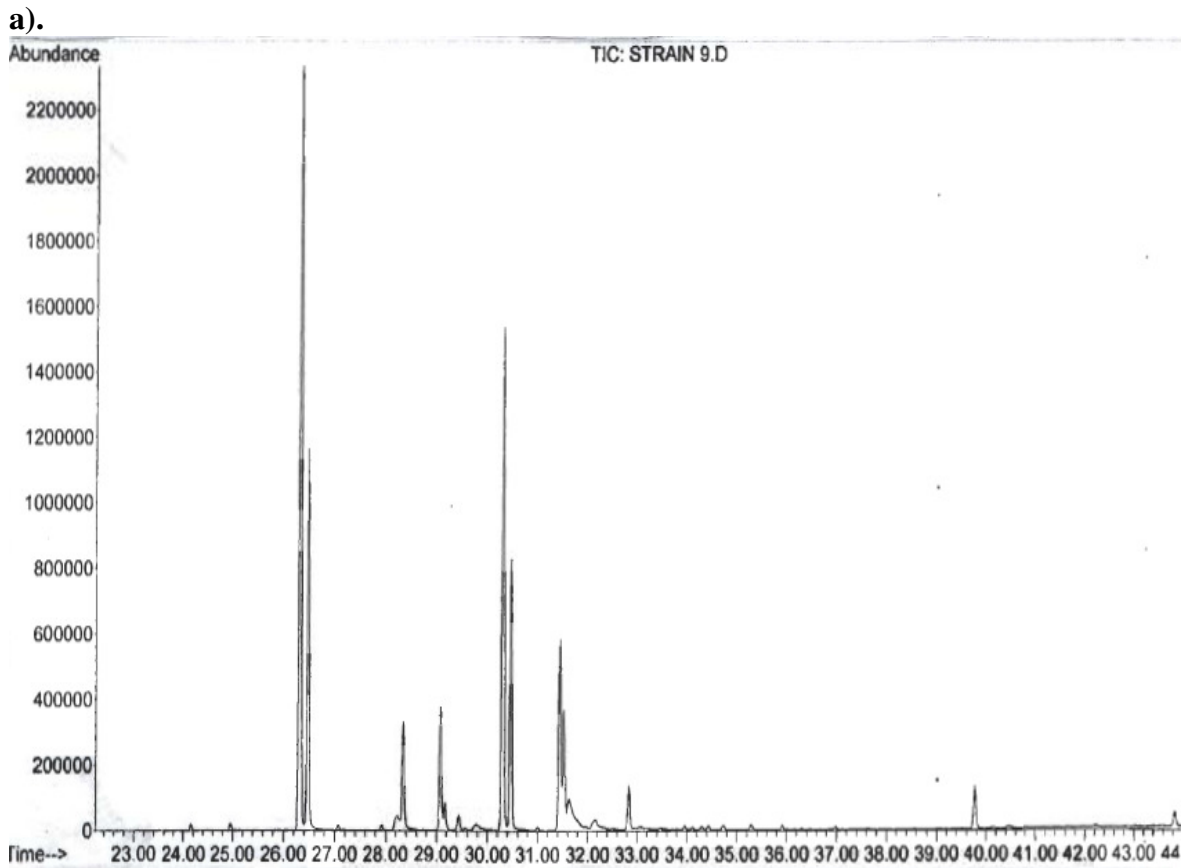


b).

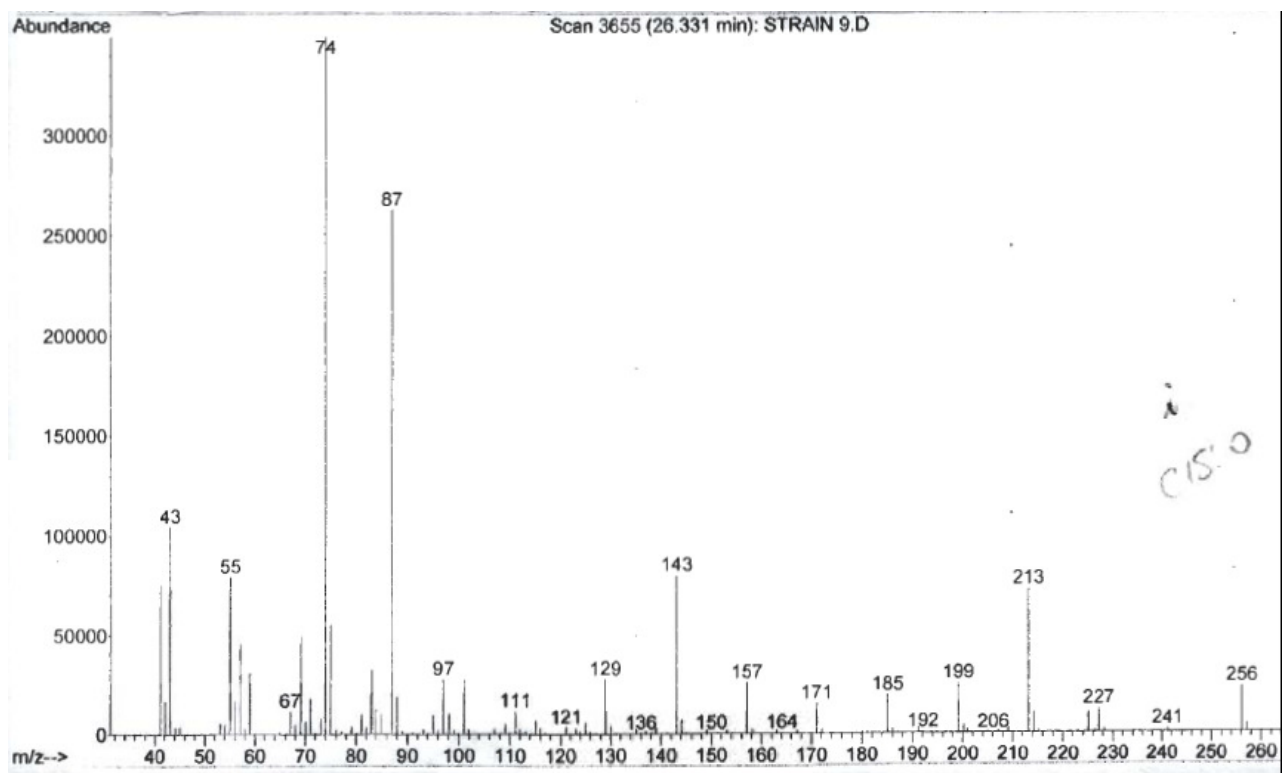




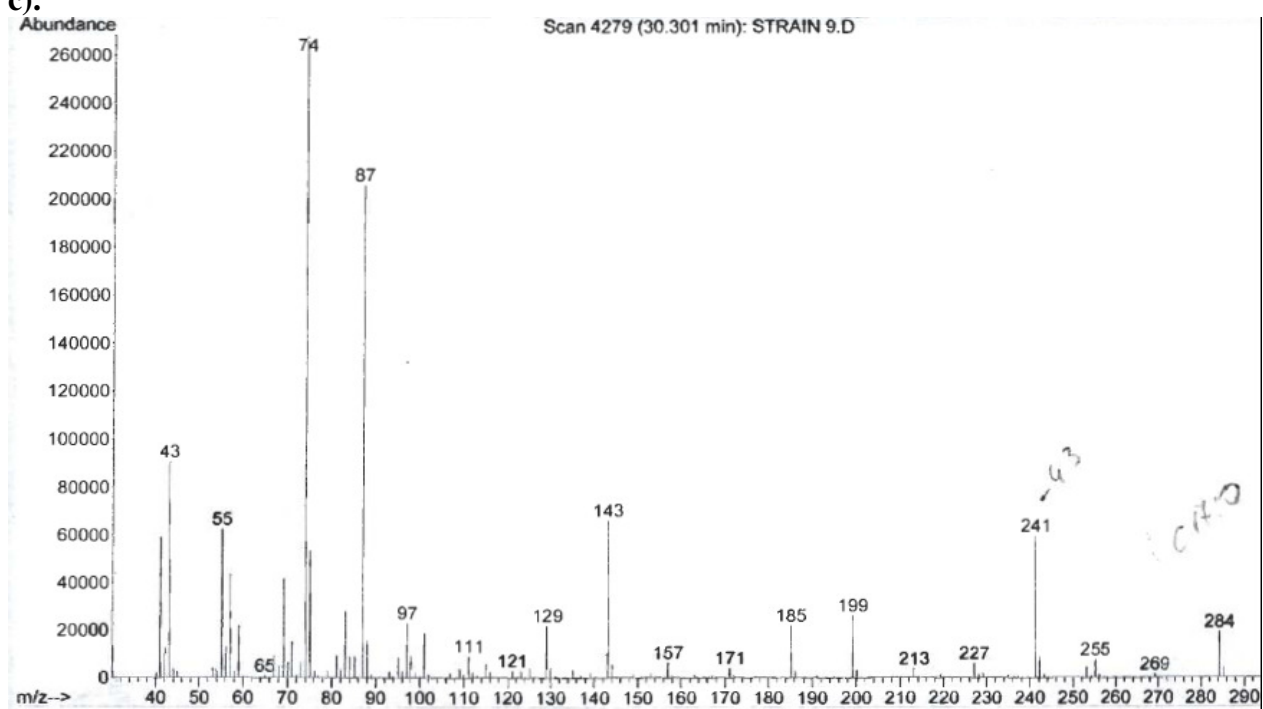
Şekil 4.64. KG9'a ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [iC17:0])



b).



c).



Tablo 4.9.KG5, KG8, KG9'un Yağ Asidi Profilleri

FAME	KG5
nC14:0	2.8%
iC15:0	22.5%
aiC15:0	5.1%
nC15:0	0.6%
iC16:0	13.8%
nC16:0	28%
nC17 :0	10%
nC18 :0	16.9%

FAME	KG8
nC14:0	2%
iC15:0	44.6%
aiC15:0	3.8%
nC15:0	1.1%
bC16:0	8.9%
nC16:0	16%
iC17 :0	20%
nC18 :0	3.3%

FAME	KG9
iC15:0	37%
aiC15:0	16.8%
nC15:0	T
nC16:0	10%
iC17 :0	22%
aiC17 :0	11.8%
nC17 :0	T
nC18 :0	2.0%

i iso ; *ai* anteiso ; *n* normal.

b dallı yağ asidi metil esteri.

T iz miktarda yağ asidi.

4.5.KİNON ANALİZİ

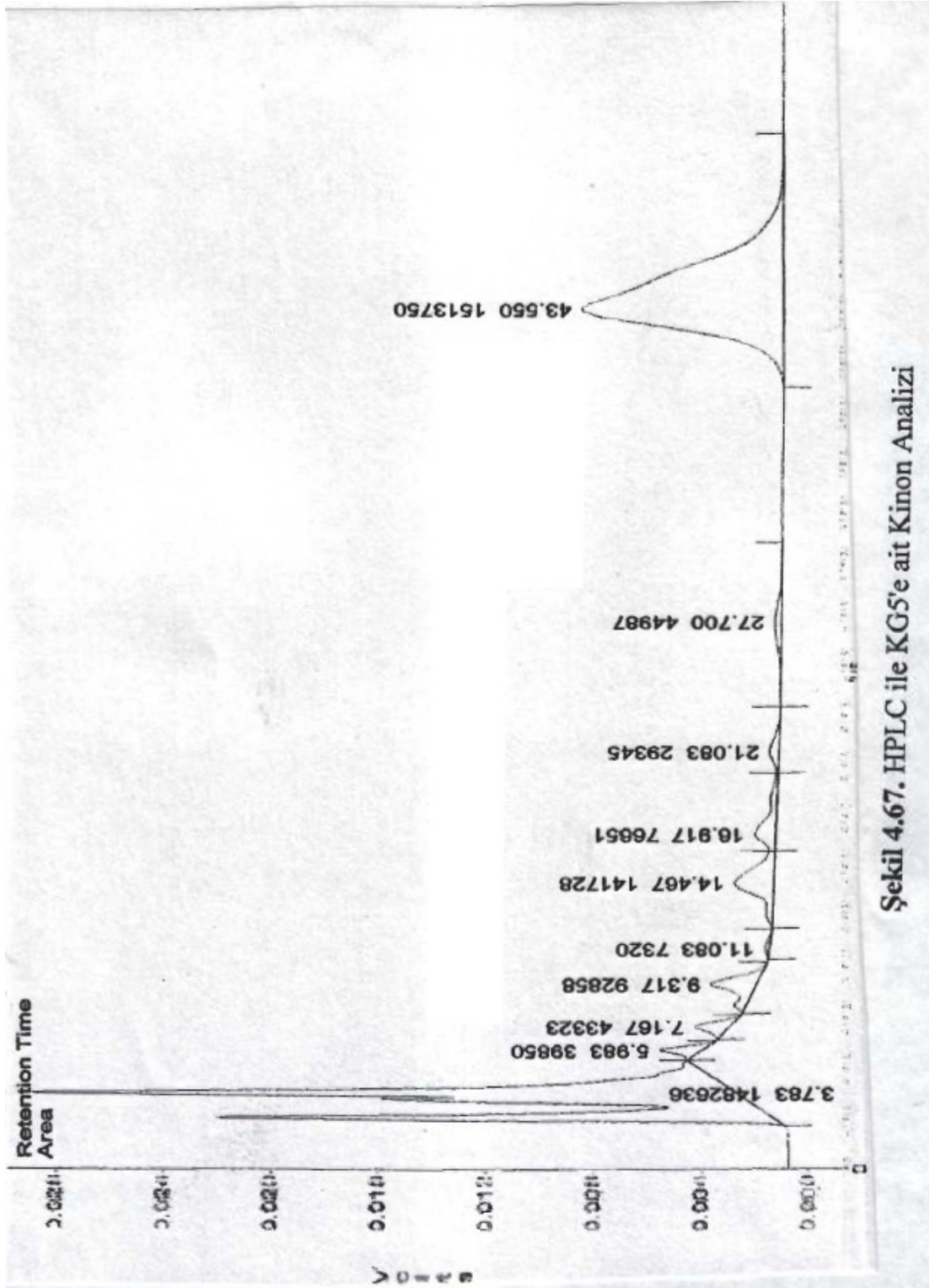
Tek yönlü TLC ile tüm bakteri varyetelerinin tek tip kinon içerdiği UV altında tespit edildi (Şekil 4.66) Preparatif TLC yöntemi ile kazınan kinon bantı, silika içeren kolondan geçirilerek saflaştırıldı. Saflığı kontrol etmek için HPLC kromatografisi yapıldı. HPLC sonucunda kinonların saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 4.67-4.69).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) kullanılarak bakterilerin içerdiği kinon tipleri tespit edildi. Analiz sonucunda bakterilerin MK tipi kinonlar içerdiği bulundu (Şekil 4.70-4.72).

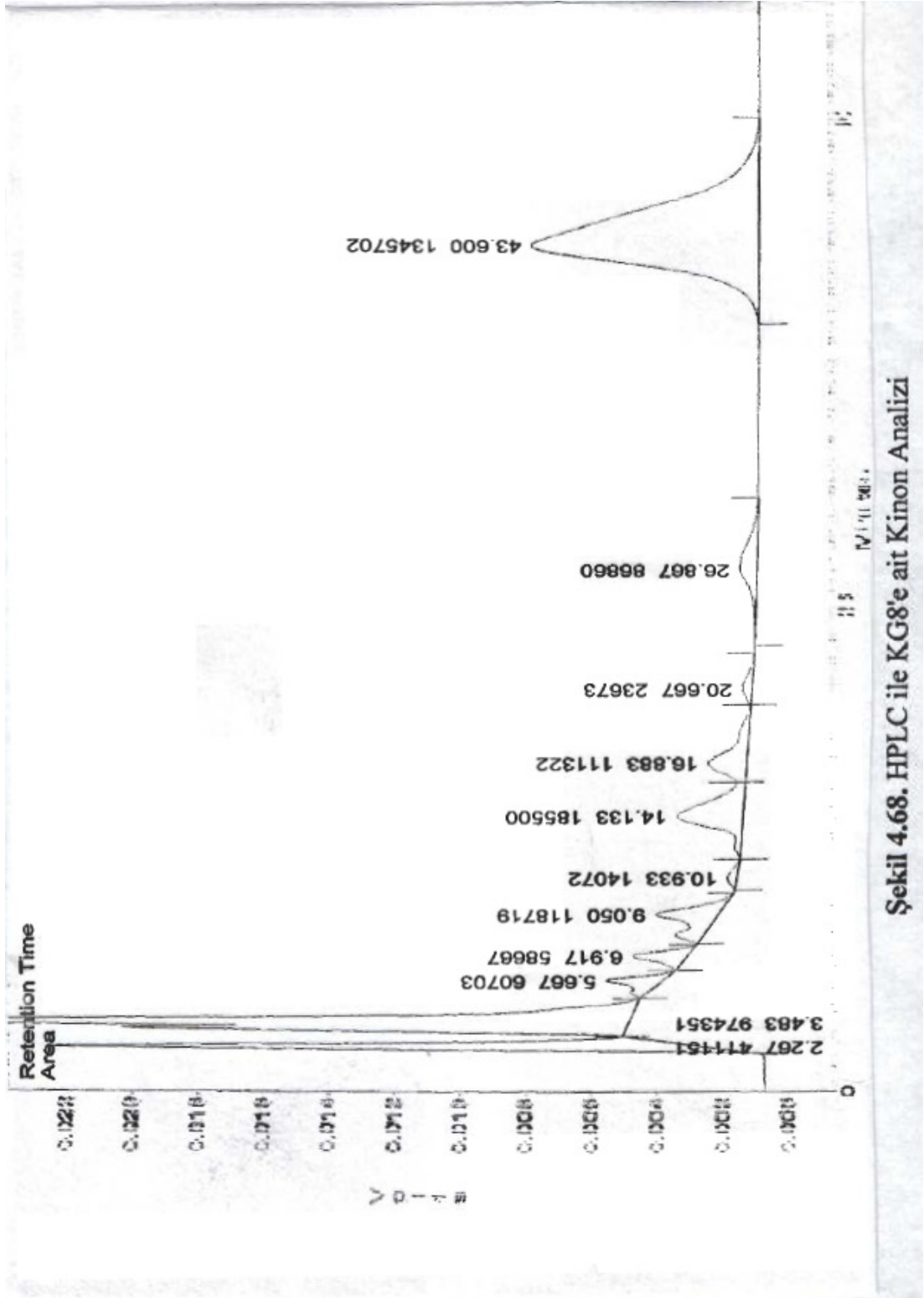
Bakteri izolatları içerisinde KG8'e ait kinon tipinin sahip olduğu isopren unite sayısı LC-MS yöntemi ile hesaplanarak MK-7 olduğu tespit edildi (Şekil 4.73.).



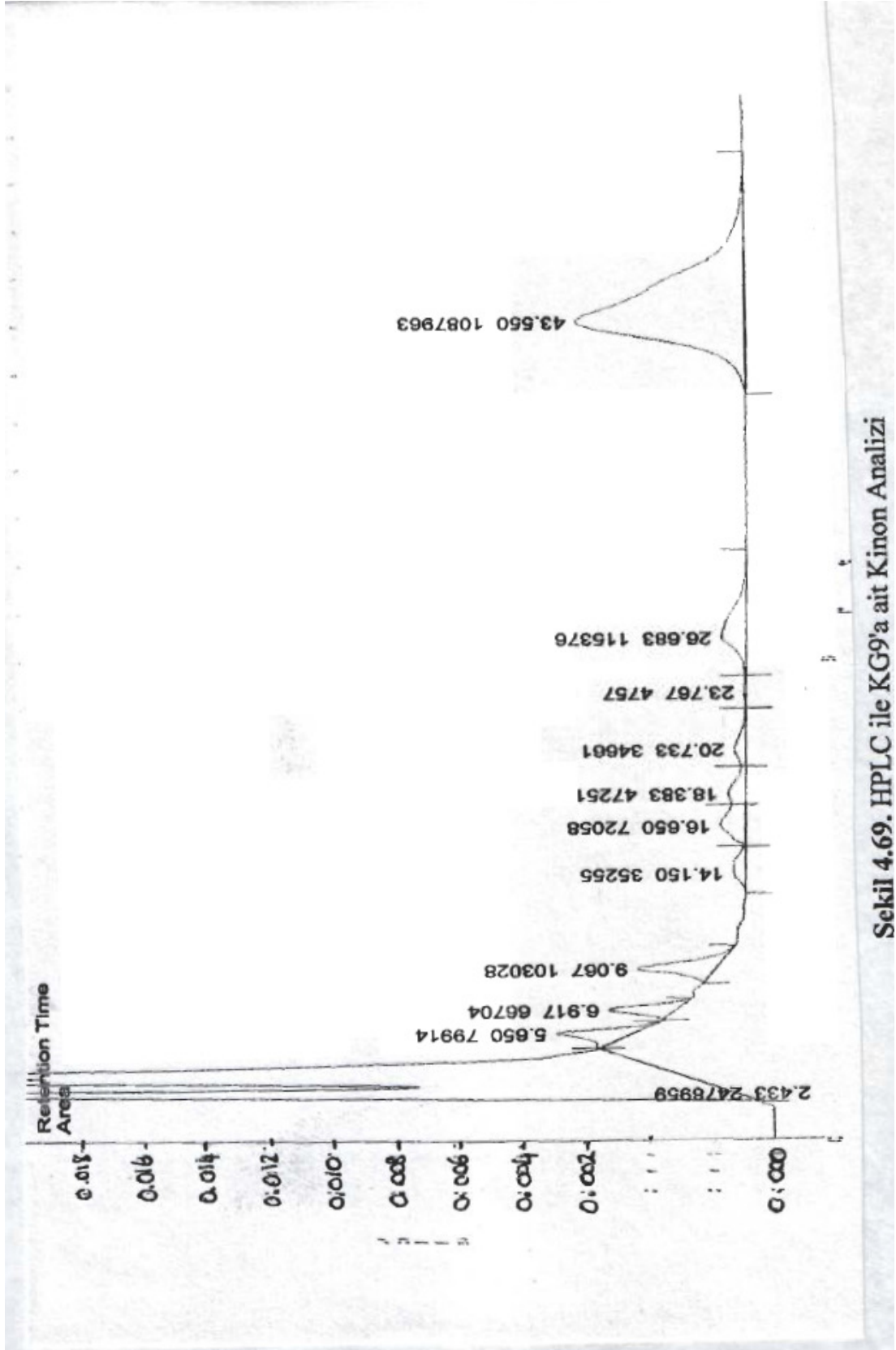
Şekil 4.66.Bakteri izolatlarının içerdiği kinonların tek yönlü TLC üzerinde UV'deki görünümü

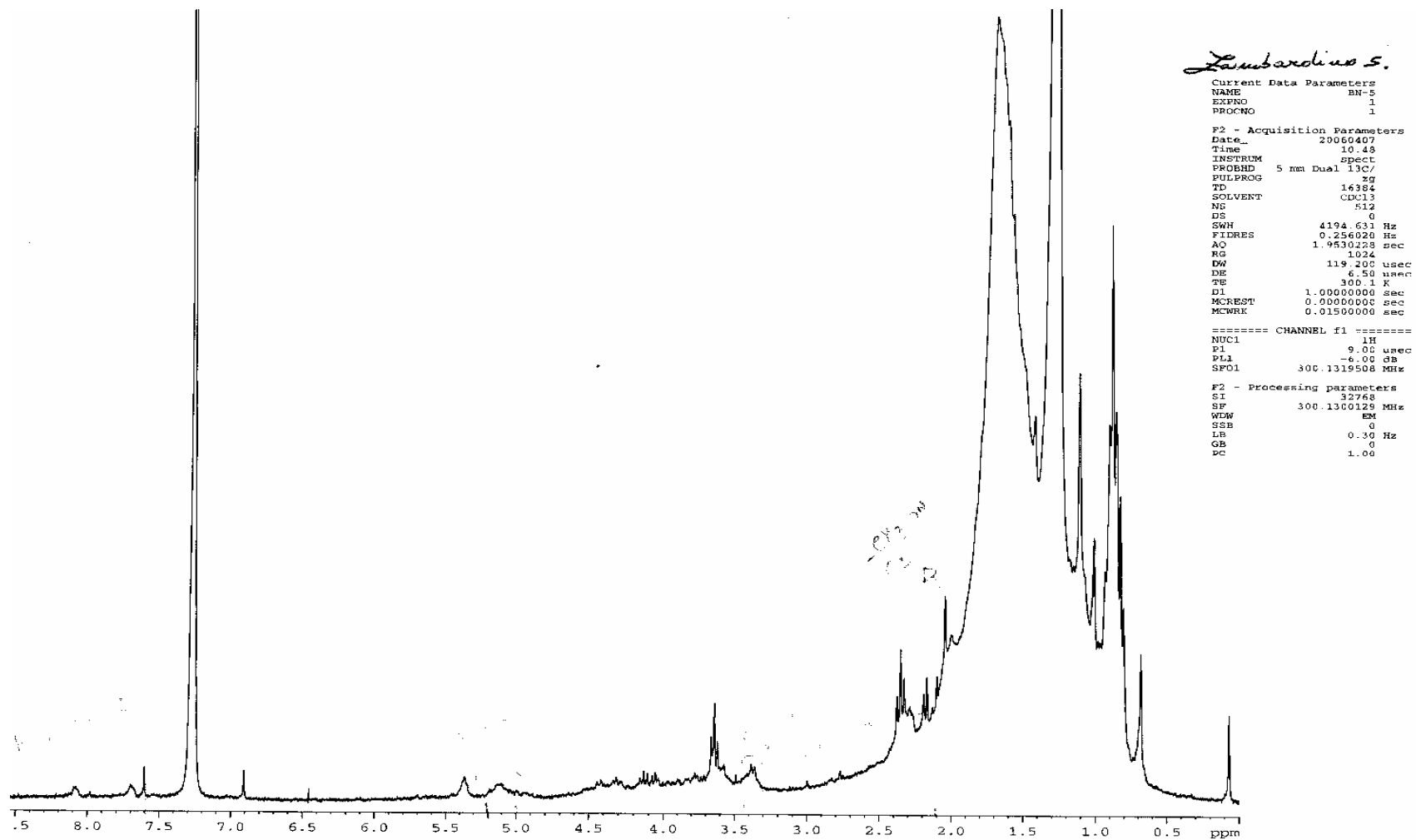


Şekil 4.67. HPLC ile KG5'e ait Kinon Analizi

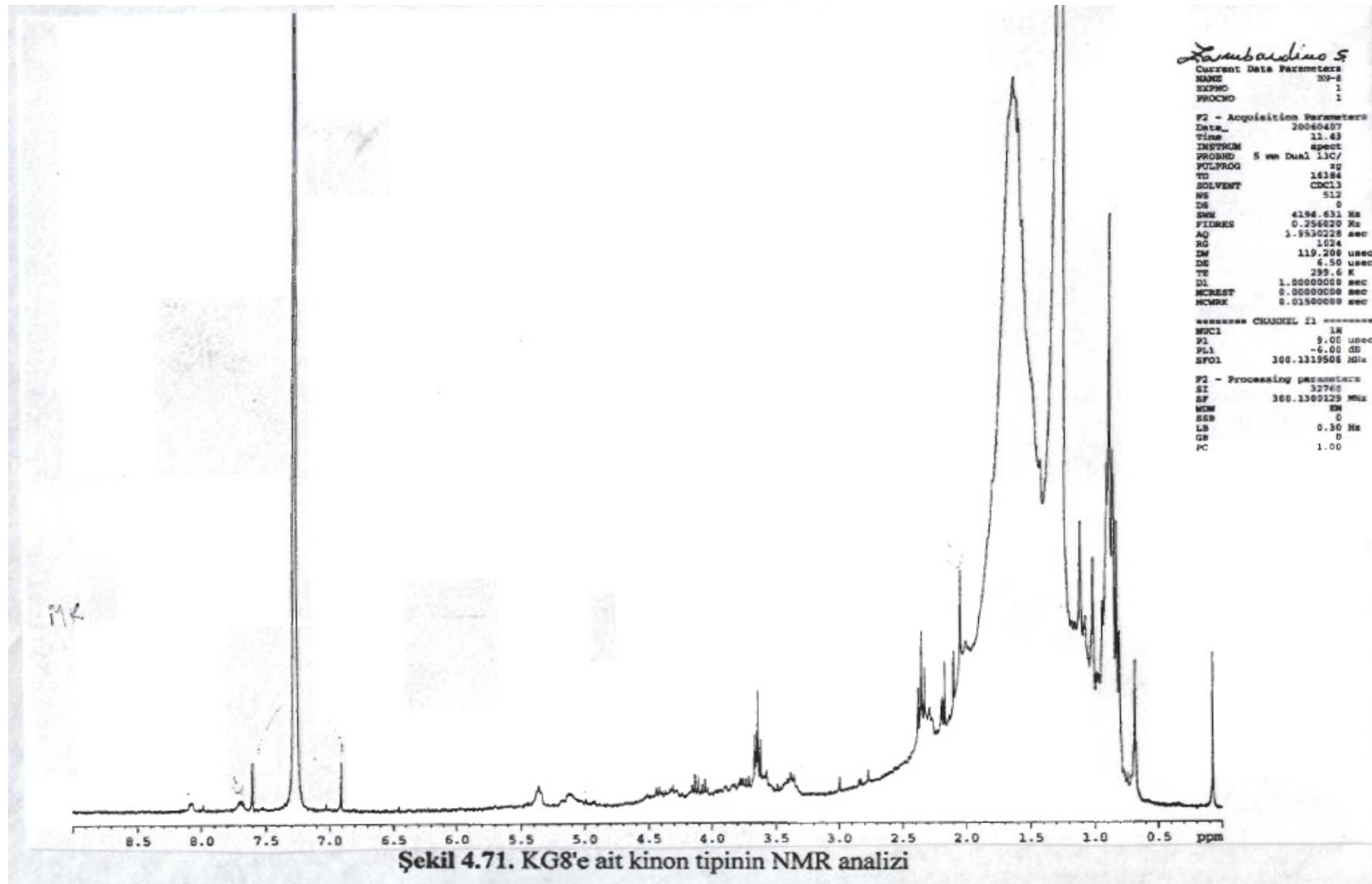


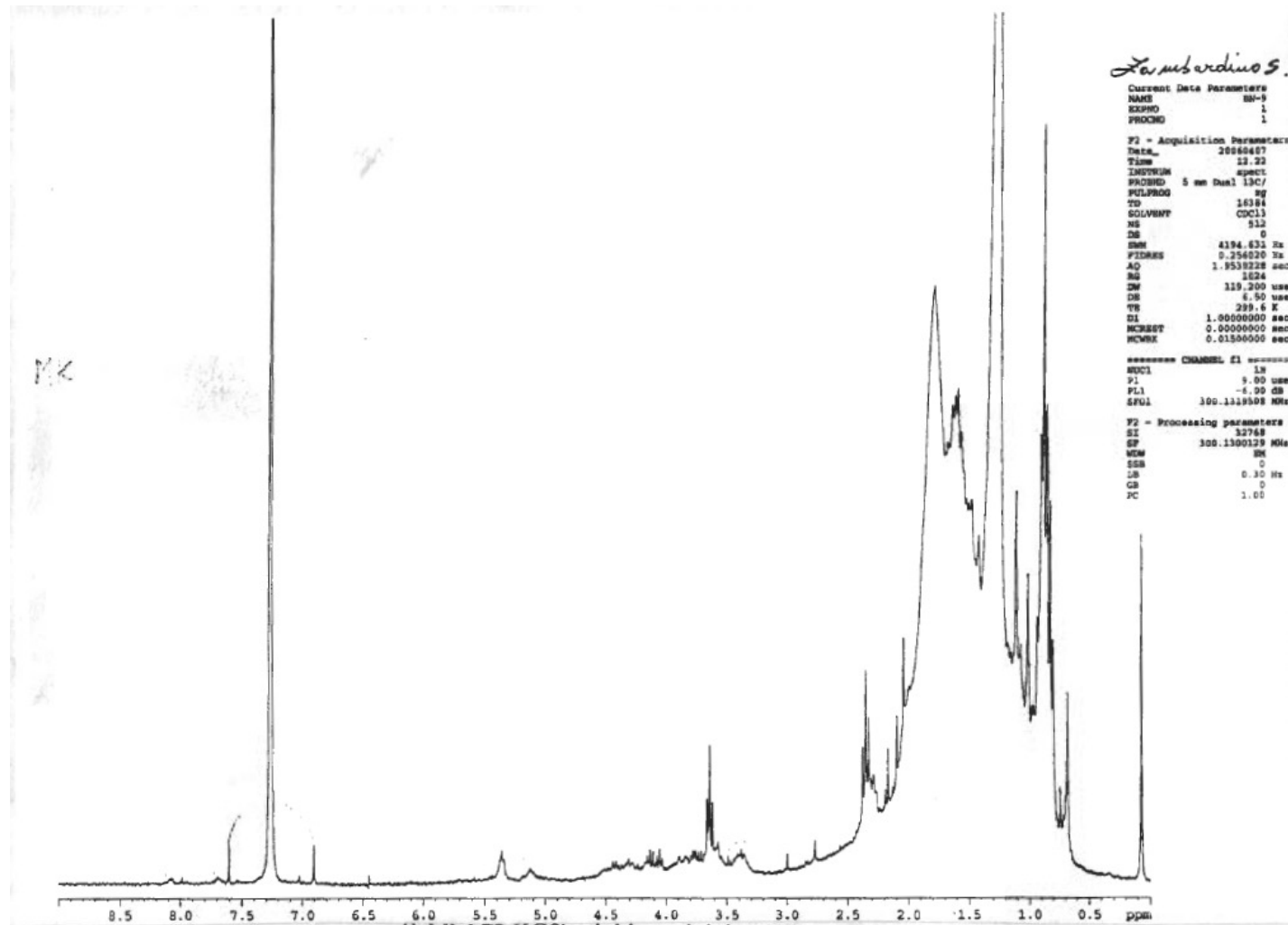
Şekil 4.68. HPLC ile KG8'e ait Kinon Analizi

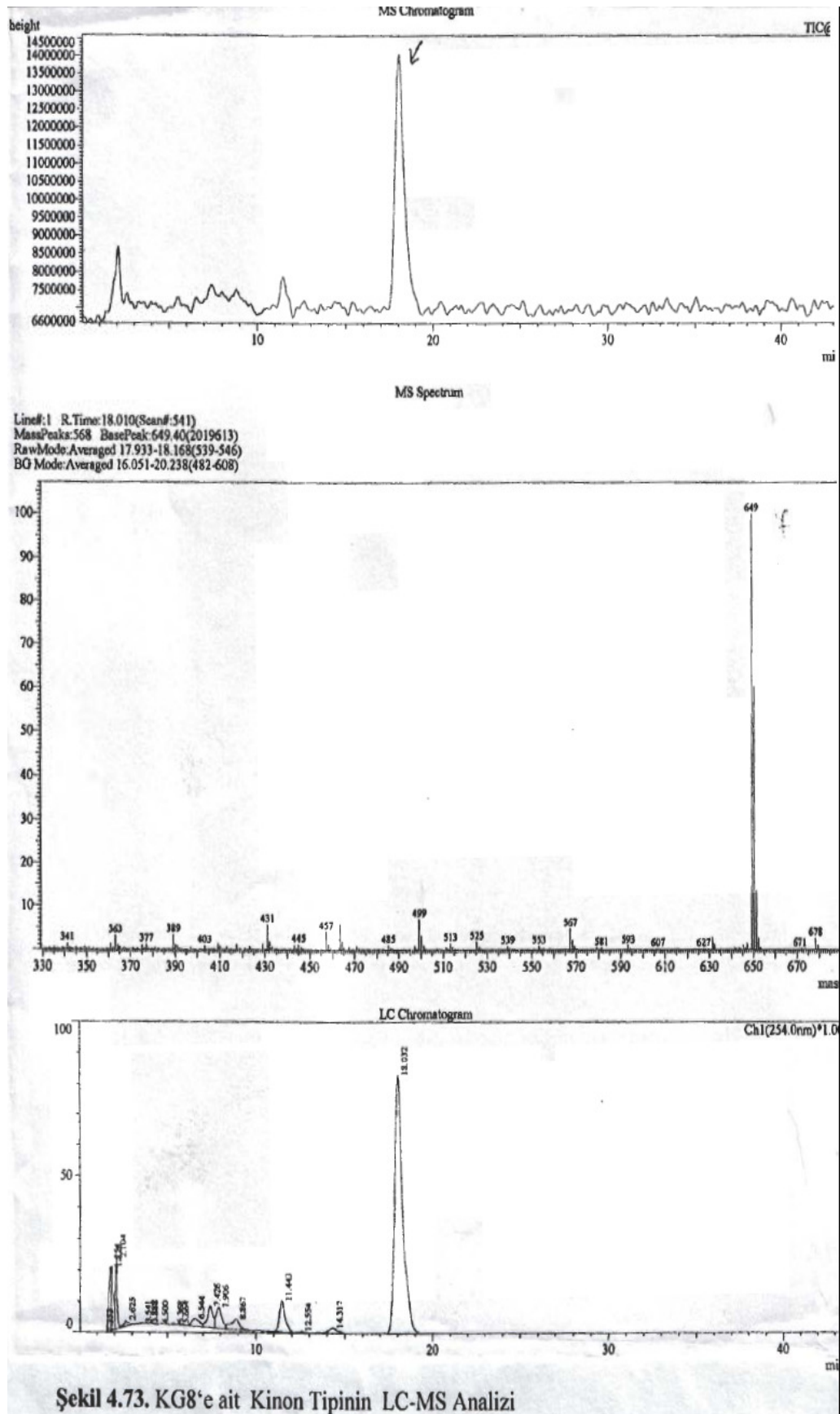




Şekil 64. KG5'e ait kinon tipinin NMR analizi







BAKTERİLERİN FİLOGENETİK POZİSYONLARININ BELİRLENMESİ

Materyal ve Metot kısmında belirtildiği gibi KG5 ve KG8'in 16S rRNA'sına ait 1500, KG9'a ait 500 nükleotit dizisi belirlendi. Bakterilerin filogenetik pozisyonlarını belirlemek için tespit edilen 16S rRNA gen dizileri (Tablo 4.10-4.12) gen bankasında (EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute) mevcut olan diğer mikroorganizmalara ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.10. KG5'in 1500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

5'-CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGA
 TTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
 CCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCG
 CATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCAT
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
 GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
 TTTCCGGTTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
 CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTA
 AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
 GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGA
 GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
 AAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT
 AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
 ACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGT
 TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
 CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGRGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGAC
 AGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC-3'

Tablo 4.11. KG8'in 1500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```

5'-CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGATT
CAAAAGCTTGCTTTTGRATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC
CCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGAAAYACGAAAGRYCGC
ATGGTCTTTGTTGAAAGRCGGCGCAAGCTGTGCTACAGGATGGGCCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCC
TTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGCAGTCACTGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAA
CCCGAGAGATCGGGCGTTCCTCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACC
TTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGGCGGTACAAAGGGTCGCGAACCOCGCGAGGGGGAGCCAATCCAAAAAGCCGCTCTC
AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGA
GAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCTTACGGGAGCCAGCCGCCGAAGGT
GGGGCAAATGATTGGGGTGAA-3'

```

Tablo 4.12. KG9'un 500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rRNA Baz Dizilimi

```

5'-GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
AGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTT
TCAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC
GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAATAGCCACG-3'

```

KG5 ve KG8'in tespit edilen 1500 Baz uzunluğundaki 16S rRNA gen dizileri gen bankasında (EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute) mevcut olan diğer mikroorganizmalara ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmış, KG5'in % 100 oranında *B. cereus*'a, % 99.9 oranında *B. thuringiensis*'e ve % 99.8 oranında *B. anthracis*'e benzediği bulunmuştur. KG8'in 16S rRNA dizileri karşılaştırıldığında *Anoxybacillus kamchatkensis*'e % 99, *A. flavithermus*, *A. ayderensis* ve *A. gonensis*'e % 98 ve *A. pushchiensis*'e ise % 97 oranında homolojiye sahip olduğu bulunmuştur.

KG9'un tespit edilen kısmi 500 baz dizisinin karşılaştırılması sonucunda bu izolatın *Bacillus licheniformis*'e büyük bir benzerlik (%99'dan daha fazla) gösterdiği bulunmuştur.

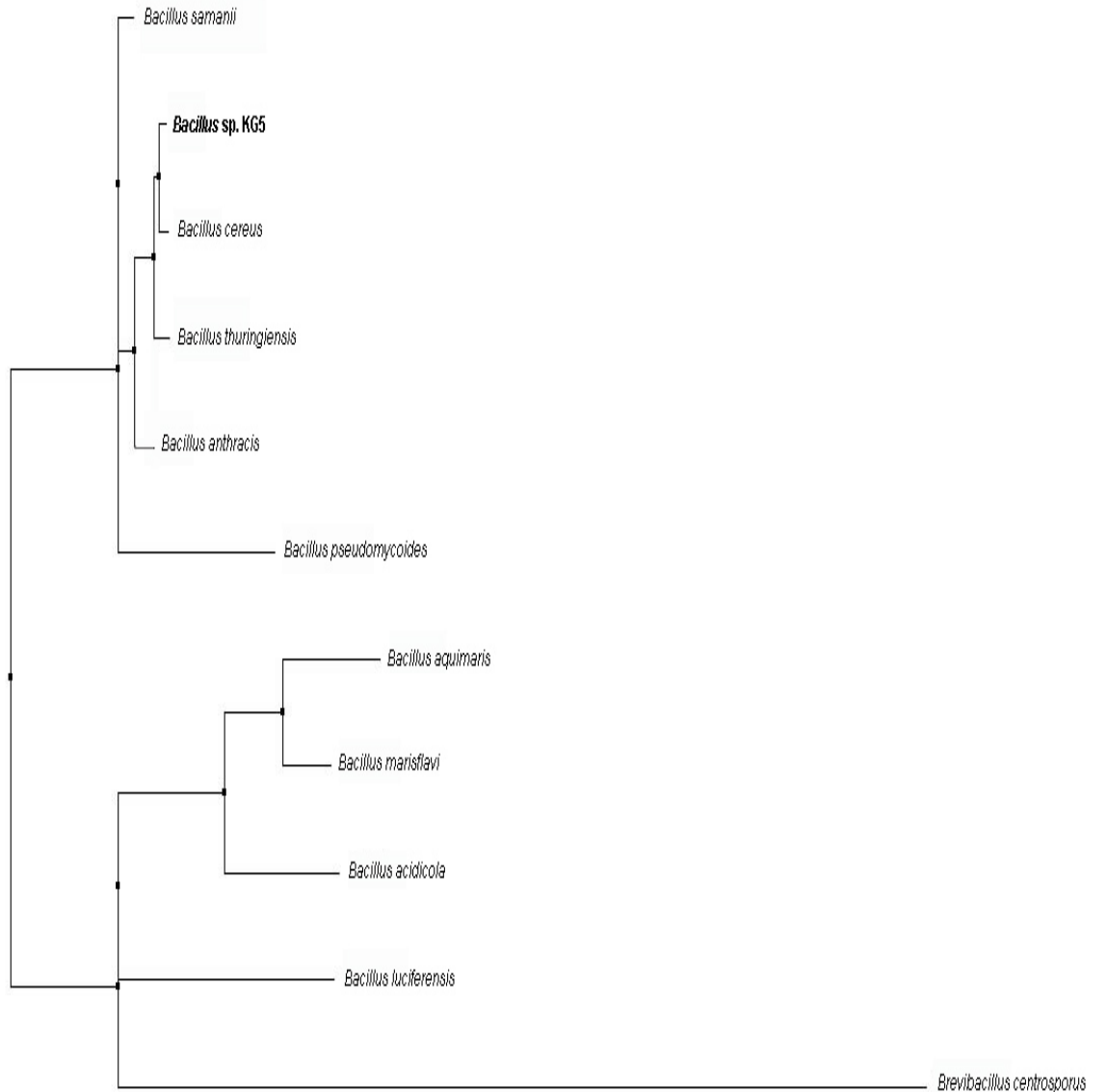
Almanya'daki DSMZ-Alman Mikroorganizma ve Hücre Koleksiyonu Merkezi'ne depolanmak üzere gönderilen, morfolojik ve 16S rRNA dizi analizi ile doğrulukları tekrar teyit edilen bakteri varyetelerine aşağıda gösterilen DSM giriş kod numaraları (accession number) verilmiştir.

DSM 18475: *Anoxybacillus* sp. KG8

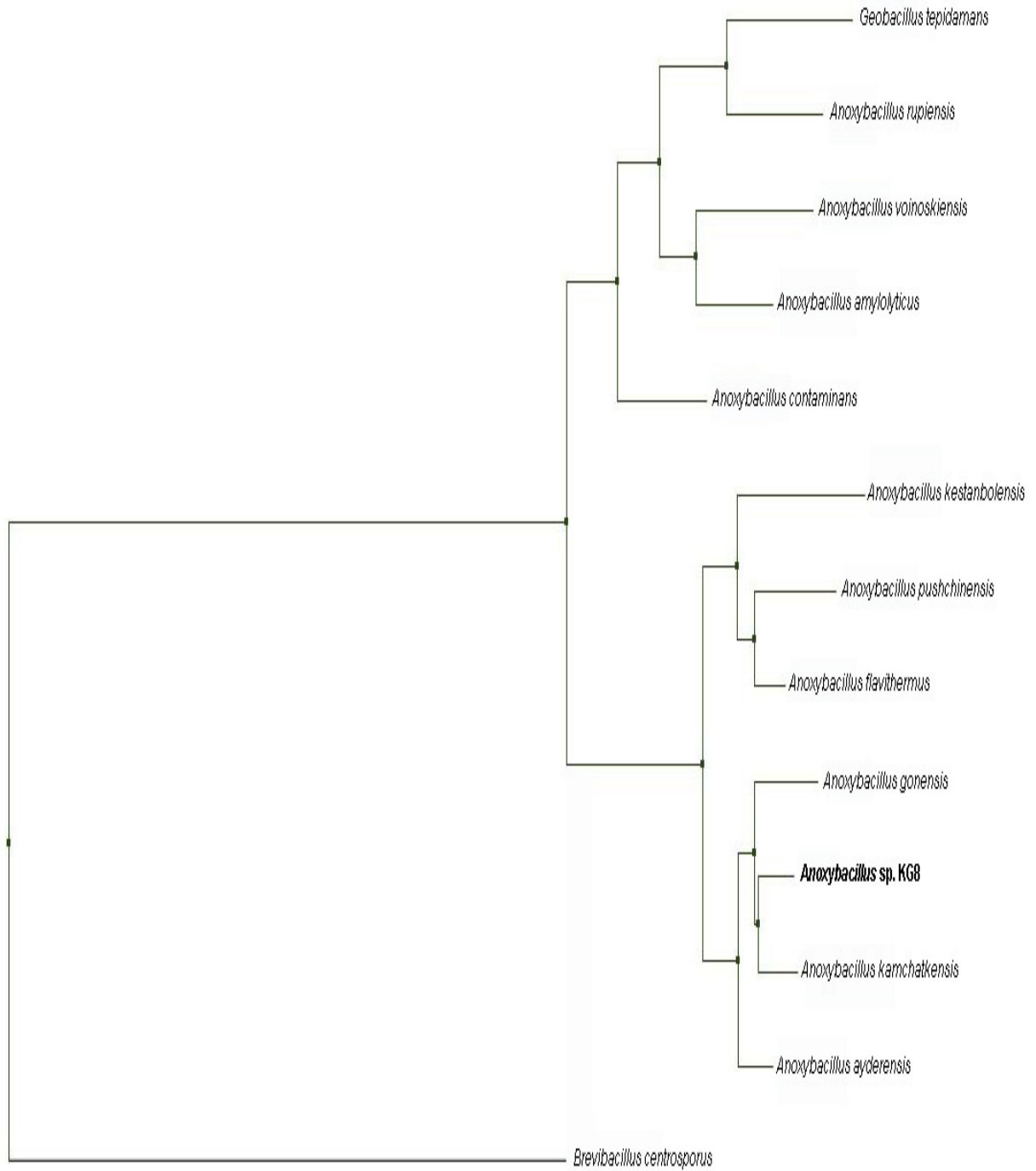
DSM 18502: *Bacillus* sp. KG5 (*B. cereus* grubu üyesi)

DSM 18503: *Bacillus* sp. KG9 (*B. licheniformis* benzeri)

Materyal ve Metot kısmında belirtildiği gibi JUKES ve CANTOR (1969) yöntemiyle mesafe matrisi hesaplandıktan sonra filogenetik ağaç neighbour-joining metodu ile çizildi. Şekil 4.74 ve 4.75'te sırasıyla *Bacillus* sp. KG5 ve *Anoxybacillus* sp. KG8' in pozisyonunu gösteren filogenetik dendrogramlar görülmektedir. *Bacillus* sp. KG9'a ait 500 baz dizisi filogenetik dendrogram çizimi için yeterli olmadığından filogenetik ağaç oluşturulamadı.



Şekil 4.74. KG5' in Filogenetik Pozisyonu



Şekil 4.75. KG8' in Filogenetik Pozisyonu

4.7. *ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS* SUBSPECİES *RİTMANNİİ*'NİN β -GALAKTOZİDAZ ENZİM SAFLAŞTIRILMASI

4.7.1. Bakterilerin İntrasellüler β -Galaktozidaz Enzim Üretimi için Kültüre Alınması

Daha önce yaptığımız çalışmalarda *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin konstitüf intrasellüler β -galaktozidaz enzimini ürettiğini, laktoz ve diğer bazı indükleyiciler yardımıyla enzim üretiminin artabileceği bulunmuştur (GÜVEN, 2004). Bu nedenle, 56 gr yaş MR1 varyetesi % 1'lik laktoz içeren besi yerinde üretilmiştir.

4.7.2. Enzim Saflaştırma Aşamaları

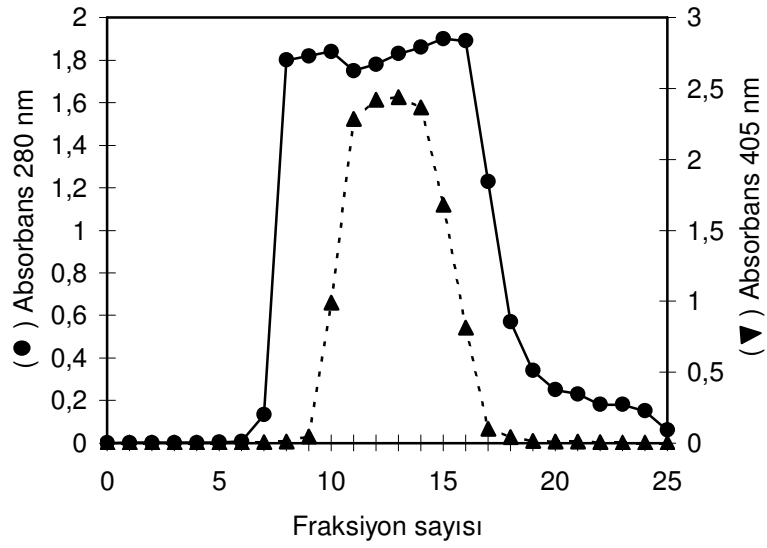
Enzim saflaştırma aşamaları sırasıyla amonyum sülfatla çöktürme, jel filtrasyon, iyon-değişim ve afinite kromatografileri ve en sonunda preparatif elektroforezi kapsar.

A-Ham ekstrakt, Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrasında enzim spesifik aktivitesi ve verimlilik

56 gr Yaş MR1 varyetesinin sonikasyonu sonucunda ham ekstraktta total protein, total enzim aktivitesi ve spesifik aktivite oranları sırasıyla 2187 mg, 1514 U ve 0.692 U/mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.13). Amonyum sülfat (% 50) çöktürmesi ve diyaliz sonrasında ise total protein, total enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma (kat; fold) oranları sırasıyla 630 mg, 828.3 U, 1.31 U/mg ve 1.90 olarak bulunmuştur. Verimlilik ise % 100'den % 54.6'ya inmiştir.

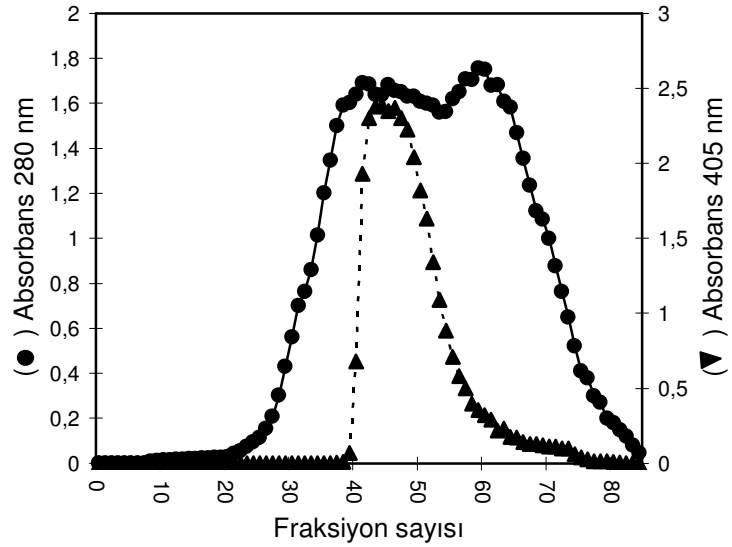
B-Jel Filtrasyon Kromatografisi

Şekil 4.76’da, jel Filtrasyon (permeation) kromatografisine ait elüsyon profili görülmektedir. Fraksiyonlarda 280 nm’de protein analizi ve 405 nm ‘de enzim aktivite ölçümü yapılarak deneyler gerçekleştirildi. Enzimce aktif fraksiyonlar toplandıktan sonra diyaliz gerçekleştirildi ve sonrasında total protein, total enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma (kat; fold) oranları sırasıyla 320 mg, 559.5 U, 1.75 U/mg ve 2.53 olarak bulunmuştur. Verimlilik ise % 36.9 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.76. Gel Filtrasyon Kromatografisinde Elüsyon Profili

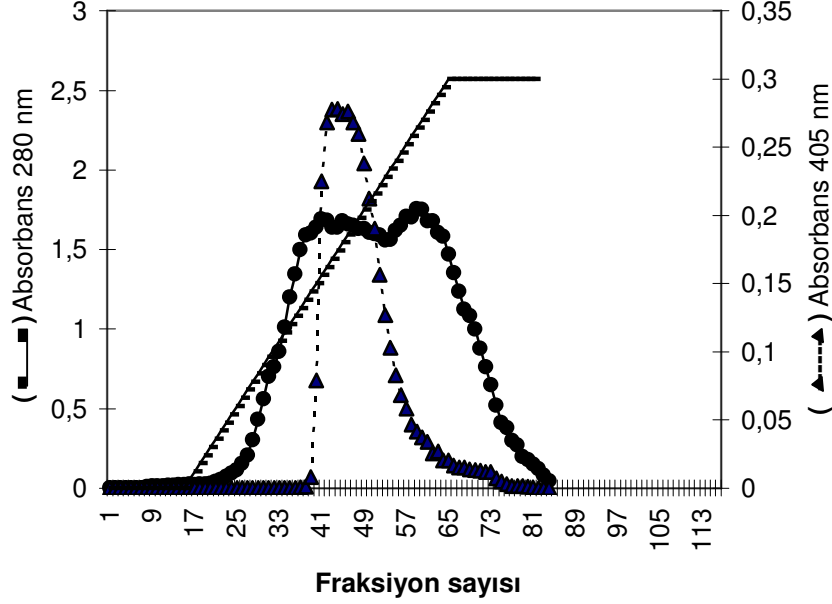
C-DEAE-Selüloz Kromatografisi



Şekil 4.77. DEAE-Selüloz Kromatografisinde Elüsyon Profili

Şekil 4.77'de, DEAE-selüloz kromatografisine ait elüsyon profili görülmektedir. 0-0.3 M NaCl'nin bir lineer gradiyenti ile yıkama (elüsyon) programı uygulandı. 0.16 M NaCl konsantrasyonunda enzimin kolondan yıkandığı bulundu. Fraksiyonlarda 280 nm'de protein analizi ve 405 nm'de enzim aktivite ölçümü yapılarak deneyler gerçekleştirildi. Enzimce aktif fraksiyonlar toplandıktan sonra diyaliz gerçekleştirildi ve sonrasında total protein, total enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma (kat; fold) oranları sırasıyla 186.5 mg, 510 U, 2.73 U/mg ve 3.95 olarak bulunmuştur. Verimlilik ise % 33.6 olarak hesaplanmıştır.

D-Afinite Kromatografisi



Şekil 4.78 . Afinite Kromatografisinde Elüsyon Profili. Şekildeki paralel çizgi 0-1 M NaCl'nin lineer bir gradiyentini göstermektedir.

Şekil 4.78'de, afinite kromatografisine ait elüsyon profili görülmektedir. 0-1 M NaCl'nin lineer bir gradiyenti ile yıkama programı uygulandı. Fraksiyonlarda 280 nm'de protein analizi ve 405 nm'de enzim aktivite ölçümü yapılarak deneyler gerçekleştirildi. Elüsyon program sonrasında 10 ve 100 mM borat tamponu ile 1 ml/dak akış hızı ile kolon yıkandı, fakat önemli oranlarda enzim aktivitesi elde edilemedi. Enzim kolondaki liganta bağlanmadığından veya çok zayıf bağlandığından daha sonra borat tamponu yerine % 7.5'lik laktoz ve düşük tuz konsantrasyonu gibi alternatifler de kullanılarak proteinin saflaştırma derecesi artırılmak istendi fakat bu denemeler olumlu sonuçlanmadı.

Kolonda tutulmayan ve toplanan enzimce aktif fraksiyonlar diyalize alındı ve sonrasında total protein, total enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma (kat; fold) oranları sırasıyla 26.2 mg, 218.2 U, 8.30 U/mg ve 11.99 olarak bulunmuştur. Verimlilik ise % 14.4 olarak hesaplandı.

E-Preparatif Elektroforez

Homojen enzim elde etmek için preparatif PAGE kullanıldı. Afinite kromatografisinden elde edilen enzim solüsyonu nativ PAGE ile çözünürleştirildi. Nativ jelin her iki köşesinden ince şeritler halinde kesitler alınarak BNG boyama ile enzimin yeri belirlendikten sonra β -galaktozidaza denk gelen enzim bandı geri kalan jelden koparıldı. Kesilen jel parçası F tamponunda manuel olarak öğütüldü. Daha sonra jelden elute edildi. Enzim saflığı sonra hem nativ hem de SDS-PAGE ile kontrol edildi. Enzimin total protein, total enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma (kat; fold) oranları sırasıyla 1.10 mg, 124 U, 112.7 U/mg ve 162.9 olarak bulunmuştur. Verimlilik ise % 8.20 olarak hesaplandı.

Tablo 4.13. *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' nin β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırma Adımlarının Bir Özeti. *

Saflaştır. adımı	Total protein (mg)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma (kat; fold)	Verim (%)
Ham ekstrakt	2187	1514	0.692	0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme					
+ Diyaliz	630	828.3	1.31	1.90	54.6
Gel Filtrasyon	320	559.5	1.75	2.53	36.9
DEAE	186.5	510	2.73	3.95	33.6
Afinite	26.2	218.2	8.30	11.99	14.4
Preparatif elektroforez	1.10	124	112.7	162.9	8.20

* 56 g yaş bakteri pelleti (24 saat % 1 lik laktoz içeren besi yerinde kültüre alınmıştır). Bu sonuçlar, iki ayrı numunelerden elde edilen ortalama verileri temsil etmektedir

Tablo 4.13'te görüldüğü gibi en sonunda 112.7 U/mg spesifik aktiviteye sahip, 162.9 kat ve % 8.2'lik bir verimle homojen enzim elde edilmiştir. β -Galaktozidaz enziminin afinite kromatografisine bağlanmaması veya zayıf bağlanması nedeniyle preparatif elektroforez aşaması saflaştırma işleminde uygulanmıştır.

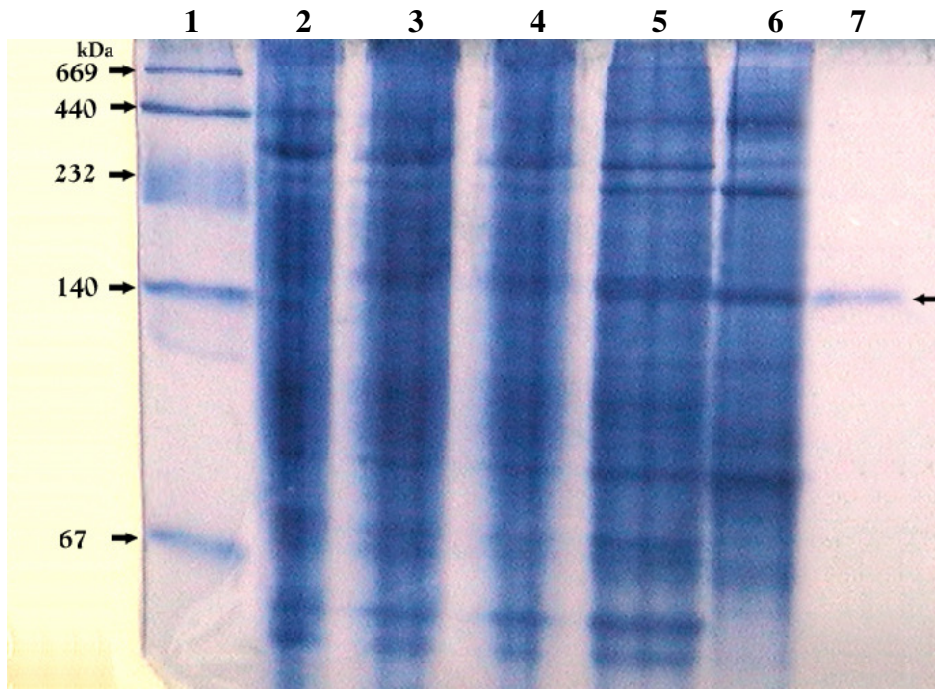
4.7.3. Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi

A-Elektroforetik Analiz

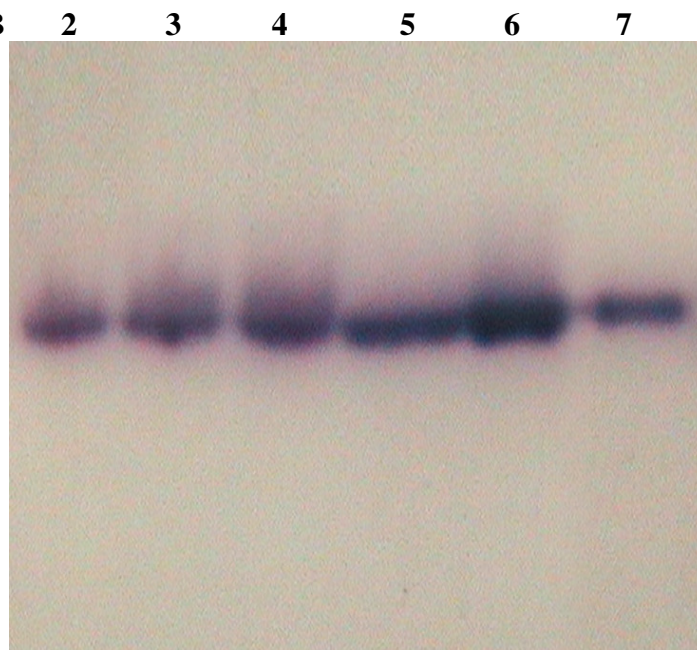
Şekil 4.79, tüm saflaştırma safhalarından enzim preparasyonlarının nativ (non-denatüre) ve SDS-PAGE analizi göstermektedir. Şekil 4.79 A ve B'de iki paralel koşulan non-denatüre jel görülmektedir. Şekil 4.79A'da Commassie Brilliant Blue R-250 ile protein boyaması, B'de ise BNG ile enzim aktivite boyaması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.79C'de ise saflaştırılan homojen enzimin denatüre SDS-PAGE ile analizi görülmektedir. Her iki durumda da (Şekil 4.79A bant 7 ve Şekil 4.79C bant 2) enzimin saf olarak elde edildiği görülmektedir. Bütün kromatografik aşamalar (jel filtrasyon, DEAE ve afinite) homojen saf enzim eldesi için gerekli olup, son adım olan preparatif elektroforezin kolaylıkla uygulanmasına yardımcı olmaktadır.

Şekil 4.79. . *A.acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' nin β - Galaktozidaz Enziminin Nativ ve SDS-PAGE Elektroforezi.

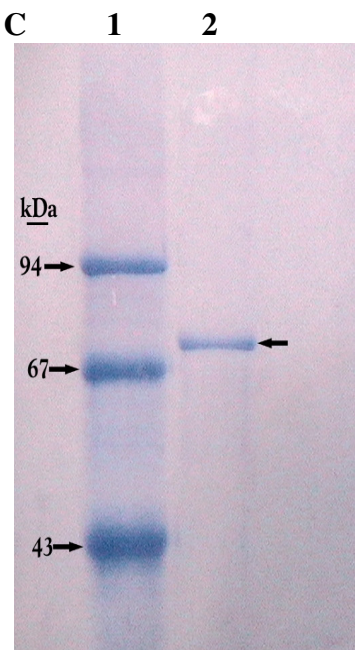
A



B



C



B-Enzimin Moleküler Ağırlığının Hesaplanması (FPLC ile jel filtrasyonu ve SDS-PAGE)

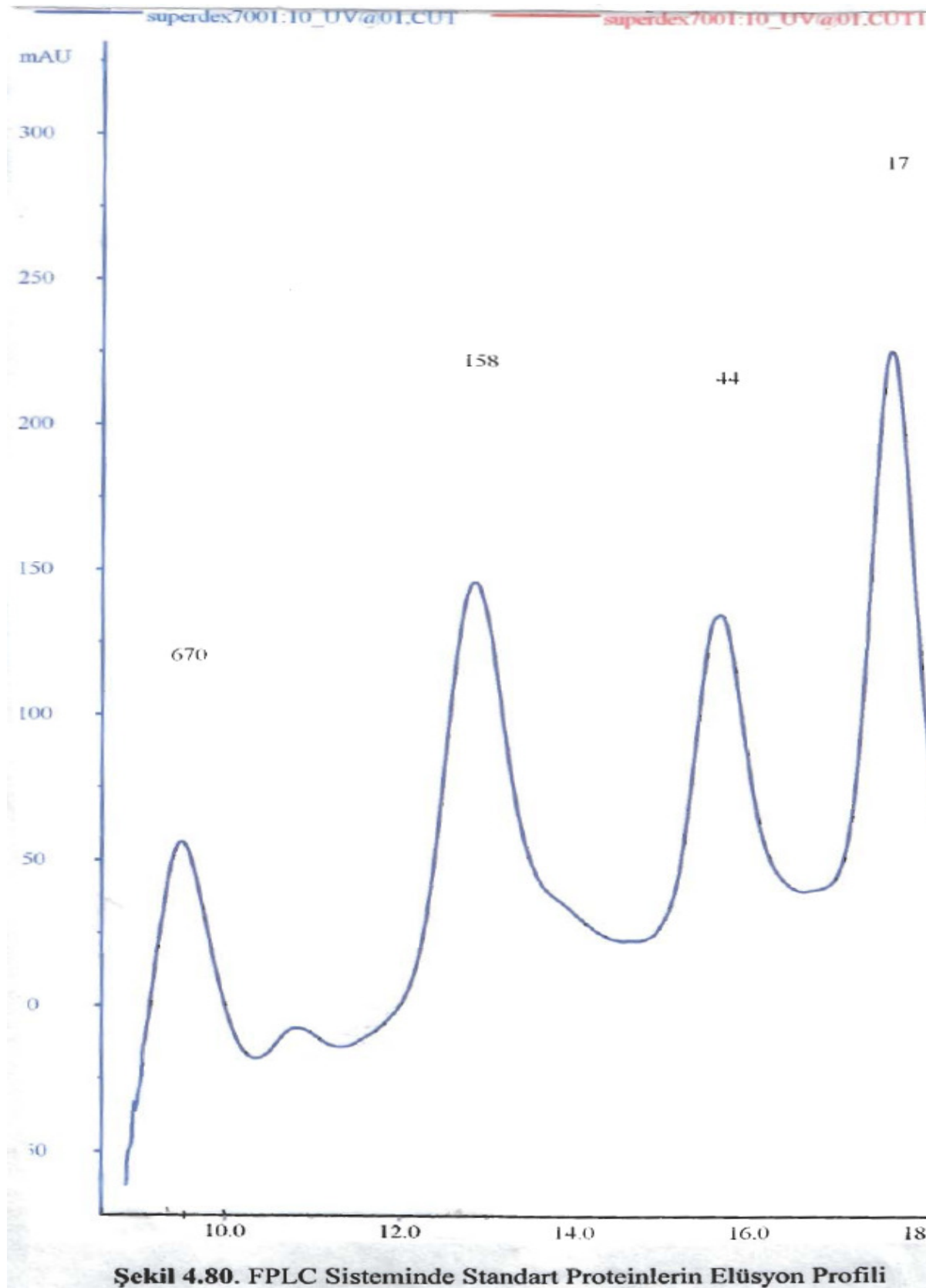
Saflaştırılan enzimin denatüre şartlar altında standart proteinler yardımıyla yapılan SDS-PAGE analizinde enzimin 76 kDa'luk monomerlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.79C).

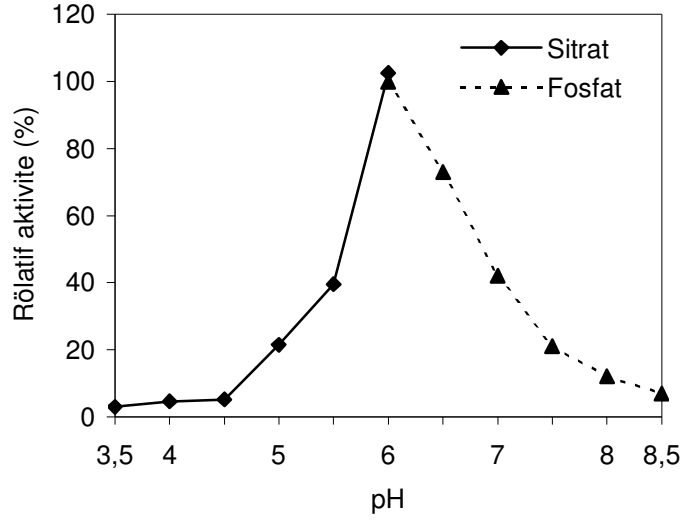
Ayrıca non-denatüre şartlarda protein standartları kullanılarak yapılan moleküler ağırlık hesaplanması için yüksek performans kolonu (Superdex) üzerinde gerçekleşen jel filtrasyon kromatografisi (FPLC sistemi) kullanılmıştır. Kullanılan standartlar (thyroglobulin (669 kDa), γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), miyoglobulin (17 kDa), vitamin B12 (1.34 kDa) ve bunların elusyon volumü (V_e ; yani proteinlerin yıkandığı fraksiyon hacmi) Şekil 4.80'de gösterilmiştir. Kolona enjekte edilen saf enzimin elusyon volumü (V_e) yaklaşık 12 ml'de gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Non-denatüre protein standartlarının ve saf enzimin elusyon volumü (V_e ; yani proteinlerin yıkandığı fraksiyon) bilgisayar uyumlu FPLC aleti (Amersham-Biosciences) ile 280 nm'de absorbansın ölçülmesiyle belirlenirken, β -Galaktozidaz'ın V_e 'si ise hem 280 nm'de absorbans ölçümüyle hem de aktivite ölçümü ile teyit edilmiştir. β -Galaktozidazın non-denatüre (nativ) moleküler ağırlığı, her bir standart proteinin moleküller ağırlıklarının ilgili V_e 'ye karşı grafiğe geçirerek kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır (PISANI ve ark., 1990). β -Galaktozidaz enziminin non-denatüre moleküler ağırlığı 165 kDa olarak belirlenmiştir. Böylece saflaştırılan enzimin oligomerik (birden fazla alt birim) olduğu, ya dimerik ya da trimerik yapıda olabileceği tespit edilmiştir.

C- β -Galaktozidaz Üzerine Ph Etkisi

Şekil 4.81'de görüldüğü gibi geniş pH aralıklarında gerçekleştirilen çalışmada saflaştırılan β -galaktozidaz enziminin optimum pH'sı 6 olarak tespit edilmiştir (hem sodyum fosfat hem de sodyum sitrat tamponu kullanıldığında)

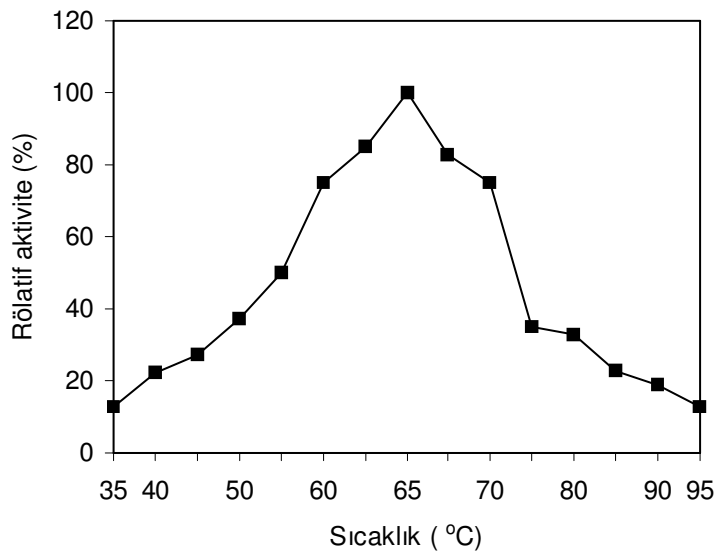




Şekil 4.81. β-Galaktozidaz Üzerine pH'nın Etkisi

C- β-Galaktozidaz Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.82' de görüldüğü gibi geniş sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilen çalışmada saflaştırılan β-galaktozidaz enziminin optimum sıcaklığı 65 °C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.82. β-Galaktozidaz Üzerine Sıcaklığın Etkisi

D- β -Galaktozidazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Kinetik parametre, 0.1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 6.0) 0.1-50 mM arasında değişen ONPG konsantrasyonları kullanılarak 65 °C'de ölçüldü. Km değeri Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanarak elde edilmiştir. ONPG substratı için Km değeri 8.9 mM olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan bakteriler Taşlıdere-Batman ve Kös-Bingöl kaplıcalarından identifikasyon amaçlı olarak izole edilmiştir. Bu kaplıcalardan beş bakteri varyetesi izole edilmiş (KG5-KG9) ve bunlar içerisinde birbirinden farklı olduğu tespit edilen 3 izolat (KG5, KG8 ve KG9) üzerinde çalışmalar sürdürülmüştür. İzole edilen bu bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipit ve yağ asidi içerikleri, kinon tipleri ve 16S rRNA dizi analizleri yapılarak identifikasyonları yapılmıştır. Ayrıca Antartika'dan izole edilmiş diğer bir termofilik basil olan *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin biyoteknolojik öneme sahip olan β -galaktozidaz enzimi saflaştırılmış ve saf enzimin bazı özellikleri çalışılmıştır.

Son yıllarda yapılan bir çok çalışma sıcak su kaynakları gibi ekstrem şartlardan izole edilen bakterilerin tanımlanması ve bunların önemli ürünleri üzerinde yoğunlaşmıştır (POLI ve ark. 2006). Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmişlerdir. Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85 °C). Ayrıca ekstrem derecede asidik ve alkali şartlar gibi denatüranlara ve de proteolize dayanıklıdırlar (KRISTJANSSON ve ASGEIRSSON, 2002; HAKI ve RAKSHIT, 2003). Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin en önemli özelliği ekstrem şartlara dayanıklı enzimlere sahip olmasıdır ve bu da onları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır (NIEHAUS ve ark.,1998; DEMIRJIAN ve ark., 2001).

Kös-Bingöl kaplıcasından izole edilen ve KG5 olarak adlandırılan izolat, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" de *Bacillus* cinsi için verilen özelliklere uygunluk göstermektedir (HOLT ve ark. 1994). Bu bakteri çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob ve hareketlidir. Endosporları oval şekilli olup, sentral konumludur. KG5 için üreme sıcaklık aralığı 15-45 °C (optimum 40 °C)

olarak bulunduğundan, mezofilik karakterde bir bakteri olarak tanımlanabilir. Tablo 5.1’de görüldüğü gibi KG5 birçok özellik bakımından iki *B. cereus* varyetesine benzerlik göstermektedir. KG5’in sadece katalaz ve glukoz kullanımının negatif olması nedeniyle, *B. cereus*’un diğer iki varyetesinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus veya ona yakın cinslere bağlı türlerin jelatinaz dahil proteazlar ürettikleri bilinmektedir. Çalışılan izolatlardan sadece KG5’in jelatini hidrolize ettiği bulunmuştur (DE CLERCK ve DE VOS, 2002).

Tablo 5.1. KG5’in fenotipik özelliklerinin diğer *B. cereus* varyeteleri ile karşılaştırılması

Özellikler	<i>B. cereus</i> R1 ¹	<i>B. cereus</i> ²	KG5
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Gram reaksiyonu	+	+	+
Spor şekli; elipsoid-oval şekilli, sentral konumlu	+	+	+
Hareket	+	+	+
Katalaz	+	+	-
Oksidaz	-	-	-
Anaerobik gelişim	+	+	+
Büyüme sıcaklığı (°C) maksimum	35	35-45	45
% 0.001 lizozimde büyüme	+	+	+
% 5’lik NaCl ‘de gelişme	-	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+	+
Sitrat kullanımı	-	+	-
NO ₃ ü NO ₂ ye indirgeme	+	+	+
<i>Kazein</i>	+	+	+
Tirozin ayrışması	+	+	+
Glukoz kullanımı	+	+	-

+ pozitif; - negatif

¹MATSUMOTO ve ark. 2002

²YILMAZ, 2002

Tablo 5.2’de görüldüğü gibi, KG5 ile *B. cereus* varyetesi arasında yağ asidi profili bakımından benzerlik vardır. Her iki bakteride de nC16:0 majör yağ asidi, iC15:0 ise ikinci büyük yağ asididir. KG5’te nC18:0 yağ asidinin *B. cereus*’tan çok daha fazla oranlarda bulunması (16.9) dikkat çekicidir.

Tablo 5.2. KG5 varyetesi ve diğer *B. cereus* varyetesine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması

Yağ asidi	<i>B. cereus</i> BR5-529 ¹	KG5
iC13:0	0.7	-
aC13:0	0.1	-
iC14:0	1.8	-
nC14:0	2.9	2.8
iC15:0	21.4	22.5
aC15:0	6.0	5.1
nC15:0	1.8	0.6
iC16:0	12.5	13.8
nC16	24.0	28.0
iC17:0	17.5	-
aiC17:0	7.9	-
nC17:0	0.5	10
iC18:0	0.1	-
nC18:0	1.1	16.9

i iso ; *ai* anteiso ; *n* normal.

Değerler her bir varyete için toplam yağ asitleri yüzdesi olarak verilmiştir.

¹ HAQUE VE RUSSELL, 2005

KG5’in 16S rRNA dizisinin veri tabanlarında mevcut olan diğer organizmalara ait 16S rRNA dizileri ile karşılaştırıldığında, KG5 % 100 oranına yakın *B. cereus*’a, % 99.9 oranında *B. thuringiensis*’e ve % 99.8 oranında *B. anthracis*’e benzediği bulunmuştur. Bu benzerlik oranlarından yararlanarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

B. cereus grubu üyeleri aerobik endospor oluşturan bakterilerin diğer üyelerinden kolayca ayırt edilmesine rağmen, kendi aralarında fenotipik ve genotipik olarak yakın akraba olduklarından kolayca ayırt edilememektedirler (Manzano ve ark. 2003). 16S rRNA dizileri karşılaştırıldığında, bu yüksek orandaki benzerliklere rağmen, tür tanımlanmasında kesin veri oluşturan DNA-DNA hibridizasyon oranları % 50-60 gibi tatmin etmeyen benzerlikler göstermiştir. Bu yüzden, *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* bir türün alttürleri olarak ele alınması gerektiğini savunanların yanında, bunların ayrı ayrı ele alınması gerektiğini savunanlar da vardır (FRITZE, 2004; PIRTTIJARVI ve ark. 2000; MANZANO ve ark. 2003). Tam bir tür teşhisi için KG5 ile *B.cereus* grubu üyeleri arasında DNA-DNA hibridizasyonu yapılmalıdır.

Taşlıdere-Batman kaplıcasından izole edilen ve KG9 olarak adlandırılan izolat da *Bacillus* cinsi için verilen özelliklere uygunluk göstermektedir. Bu bakteri çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob ve hareketlidir. Endosporları oval şekilli olup, subterminal konumludur. KG9 için üreme sıcaklık aralığı 30-55 °C (optimum 50 °C) olarak bulunduğundan, ılımlı termofil karakterde bir bakteri olarak tanımlanabilir. Tablo 5.3’de görüldüğü gibi KG9 birçok özellik bakımından *B. licheniformis* varyetesine benzerlik göstermektedir. KG9’un bazı karbon kaynaklarını kullanma özellikleri bakımından farklılık gösterdiği bulunmuştur. KG9’un en önemli özelliklerden bir tanesi yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans göstermeleridir (% 15). KG9 için üreme pH aralığı pH 5-10.5, optimum pH ise 7.5 olarak tespit edildi. KG9, minimum pH 7’den küçük maksimum pH 9.5’tan büyük ve optimum pH 8.5’tan küçük değerlere sahip olduğu için alkalitolerant olarak adlandırılabilir (PIKUTA ve ark. 2000).

Sıcak su kaplıcasından izole edilen *B. licheniformis* st.603’ün bazı özelliklerinin KG9 varyetesiyle benzer olduğu tespit edildi. İki varyete de maksimum 55 °C’de ürettiği % 15 oranında NaCl’ü tolere ettiği ve iki varyetenin de pH 5-10 arasındaki değerlerde ürettiği tespit edildi. Ancak *B. licheniformis* st. 603, 15 ile 55°C sıcaklık aralığına sahipken, KG9, 30-55 °C aralığına sahiptir (BATRAKOV ve ark. 2003).

Tablo 5.3. KG9'in fenotipik özelliklerinin diğer *Bacillus licheniformis* varyeteleri ile karşılaştırılması

Özellikler	<i>B. licheniformis</i> ¹	KG9
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk
Gram reaksiyonu	+	+
Spor	Elipsoid sentral	Oval subterminal
Hareket	+	+
Katalaz	+	+
Oksidaz	N.D.	-
Anaerobik gelişim	+	+
Büyüme sıcaklığı (°C)	15-55	30-55
%0.001 lizozimde büyüme	-	w
%7'lik NaCl 'de gelişme	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+
Jelatin hidrolizi	-	-
Sitrat kullanımı	+	-
NO ₃ ü NO ₂ ye indirgeme	+	+
Kazein	+	+
Tirozin ayrışması	-	-
Glukoz kullanımı	+	w
Arabinoz kullanımı	+	-
Ksiloz kullanımı	+	+
Propiyonat kullanımı	+	-
Hippurat kullanımı	-	-

+ pozitif; - negatif; w zayıf; N.D. test edilmemiş
¹YILMAZ, 2002

Yağ asidi profiline göre (Tablo 5.4) KG9 ve *B. licheniformis*'lerde majör yağ asidi iC15:0'tir. Diğer bir yağ asidi olan nC18:0'nin KG9'da bulunması diğer varyetelerde bulunmaması dikkat çekmiştir.

Tablo 5.4. KG9 varyetesi ve diğer *B. licheniformis* varyetelerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması

Yağ asidi	<i>B. licheniformis</i> ¹	<i>B. licheniformis</i> st. 603 ²	KG9
nC13:0	-	T	-
iC13:0	-	2	-
aiC13:0	-	1	-
aC14:0	-	3	-
iC14:0	T	12	-
nC14:0	T	2	-
iC15:0	38.1	39	37
aC15:0	24.8	7	16.8
nC15:0	T	2	T
iC16:0	5.5	16	-
aC16:0	T	3	-
nC16:0	3.1	3	10
nC16:1	T	-	-
aC17:0	13.0	1	11.8
iC17:1	T	-	-
nC17:0	T	3	T
iC17:0	15.6	6	22
nC18:0	-	-	2

i iso ; *ai* anteiso ; *n* normal; T iz oranlarda.

Değerler her bir varyete için toplam yağ asitleri yüzdesi olarak verilmiştir. T, iz miktarda bulunur

¹ SHEN ve ark., 1970

² BATRAKOV ve ark. 2003

KG9'in 16S rRNA dizisinin veri tabanlarında mevcut olan diğer organizmalara ait 16S rRNA dizileri ile karşılaştırıldığında, KG9 % 99 oranında *B. licheniformis*'e benzediği tespit edilmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterler, yağ asidi kompozisyonu ve kinon analizine göre *Bacillus* cinsine ait olduğu saptanan KG5 ve KG9'un 16S rRNA dizi analizi bu izolatların sırasıyla *B. cereus* ve *B. licheniformis*' e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

45-70 °C optimum sıcaklık aralığına sahip termofilik aerobik spor oluşturan bakteriler *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Sulfobacillus* ve *Thermobacillus* gibi cinsler içerisinde yer alır. 16S rRNA dizilerinden yola çıkarak termofilik türlerin çoğu *Bacillus* genetik grup 1 ve 5'e dahil edilmiştir. *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* gibi termofilik türler 1. gruba dahil edilmiştir. Grup 5'te ise *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus thermoleovorans* gibi termofilik basiller yer alır (NAZINA ve ark. 2001). Son çalışmalarla endospor oluşturan termofilik basillere *Anoxybacillus* cinsi de dahil edilmiştir (PIKUTA ve ark. 2000; BELDUZ ve ark. 2003; DÜLGER ve ark. 2004; YUMOTO ve ark. 2004; CLERCK ve ark. 2004; POLI ve ark. 2006).

Taşlıdere-Batman kaplıcasından izole edilen ve KG8 olarak adlandırılan izolat Tablo 5.5'te gösterildiği gibi, dört farklı *Anoxybacillus* türleri ile karşılaştırılmıştır. Bu bakteri çubuk şekilli, Gram-pozitif, fakültatif anaerob ve hareketlidir. Endosporları oval şekilli olup, subterminal konumludur. KG8 için üreme sıcaklık aralığı 35-65 °C (optimum 55 °C) olarak bulunduğundan, ılımlı termofil karakterde bir bakteri olarak tanımlanabilir. Tablo 5.5'te görüldüğü gibi KG8 birçok özellik bakımından *Anoxybacillus* türlerine benzerlik göstermektedir.

Tablo 5.5. KG8'in fenotipik özelliklerinin diğer *Anoxybacillus* türleri ile karşılaştırılması

Özellikler	1	2	3	4	5
Hücre morfolojisi	Çubuk	Kıvrık-Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Gram Boyama	+	v	+	+	+
Oksijen ihtiyacı	Aerob/fakült. anaerob	Aerob/fakült. anaerob	Anaerob/fakült. aerob	Aerob/fakült. anaerob	Aerob/fakült. anaerob
Sıcaklık aralığı (°C)	45-65	50-60	30-64	30-72	35-65
Optimum Sıcaklık (°C)	61	50	54	60-65	55
pH aralığı	5.0-6.5	4.5-10.0	7.0-8.0	5.5-9.0	5.5-9.5
Optimum pH	5.6	7.0	7.0-8.0	7.0	7.5
Hareket	+	+	-	+	+
NaCl(3%, w/v)	-	+	-	-	+
Nitrat indirgeme	-	+	+	+	+
Jelatin hidrolizi	-	+	-	-	-
Nişasta hidrolizi	+	+	-	+	+
Oksidaz	-	-	+	+	-
Glukoz kullanımı	+	+	+	-	-
Xylose kullanımı	-	+	+	-	-
Trehaloz kullanımı	+	+	-	N.D.	-

+ pozitif; - negatif; v değişken; N.D. test edilmemiş.

1, *Anoxybacillus amylolyticus* ; 2, *Anoxybacillus contaminans* ; 3, *Anoxybacillus voinovskiensis*; 4, *Anoxybacillus flavithermus*; 5, KG8 varyetesi.

Tablodaki veriler CLERCK ve ark. 2004; YUMOTO ve ark. 2004; POLI ve ark. 2006'dan elde edilmiştir.

Tablo 5.6'da görüldüğü gibi, *Anoxybacillus*'un tanımlanan türlerinde ve KG8'de majör yağ asidi komponenti iC15:0'dır. Bunu çoğunlukla diğer majör yağ asidi olan iC17:0 izlemektedir. Yağ asidi profilleri KG8 izolatının *Anoxybacillus* cinsinin üyesi olduğu çok açık bir şekilde göstermektedir.

Tablo 5.6. KG8 varyetesi ve *Anoxybacillus* türlerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması

Yağ asidi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nC12:0	-	-	-	-	-	6.9	-	-	-
iC13:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iC14	-	-	1.3	-	1.25	-	-	0.88	-
nC14	-	3.0	1.3	2.0	1.18	7.3	1.02	1.29	2.0
iC15:0	41.2	52.0	54.7	54.8	65.19	38.7	48.17	68.6 2	44.6
aiC15:0	2.13	7.0	8.0	1.2	2.64	2.0	3.58	3.56	3.8
nC15:0	0.1	-	-	2.9	1.12	0.9	0.83	1.11	1.1
iC16:0	7.0	5.0	7.1	11.1	5.99	0.3	7.47	6.37	8.9
aiC16:0	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-
nC16:0	6.3	11.0	1.9	-	2.38	14.5	9.10	3.47	16
iC17:0	31.6	12.0	3.9	6.1	11.96	0.8	20.62	9.51	20
C17:0 anteiso- A	-	-	-	17.7	0.82	-	-	-	-
aiC17:0	8.4	7.0	-	-	3.29	0.1	9.22	3.69	-
nC17:0	0.7	-	-	-	-	0.5	-	-	-
aiC17:1	-	-	7.1	-	-	-	-	-	-
C17:1	-	-	2.6	-	-	-	-	-	-
iC18:0	0.09	-	-	-	-	-	-	-	-
aiC18:0	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-
nC18:0	1.9	-	-	-	-	10.4	-	-	3.3

i iso ; *ai* anteiso ; *n* normal.

1, *Anoxybacillus amylolyticus* ; 2, *Anoxybacillus contaminans* ; 3, *Anoxybacillus voinovskiensis*; 4, *Anoxybacillus flavithermus*; 5, *Anoxybacillus gonensis*; 6, *Anoxybacillus pushchinoensis*; 7, *Anoxybacillus ayderensis*; 8, *Anoxybacillus kestanboliensis*; 9, KG8 varyetesi.

Değerler her bir varyete için toplam yağ asitleri yüzdesi olarak verilmiştir. Tablodaki veriler PIKUTA ve ark. 2000; BELDUZ ve ark. 2003; DULGER ve ark. 2004; YUMOTO ve ark. 2004; DE CLERCK ve ark. 2004; POLI ve ark. 2006' den elde edilmiştir.

KG8'in diğer *Anoxybacillus* türlerine ait 16S rRNA dizileri ile karşılaştırıldığında *A. kamchatkensis*'e % 99, *A. flavithermus*, *A. ayderensis* ve *A. gonensis*' e % 98 ve *A. pushchiensis*'e ise % 97 oranında benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu benzerlik oranlardan yola çıkarak KG8' in filogenetik pozisyonunu göstermek amacıyla filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

KG8 izolatının 16S rRNA dizi analizine göre % 99 oranda benzerlik gösterdiği *A. kamchatkensis*, katalaz negatif, nişasta hidrolizi negatif, optimum üreme sıcaklığı 60 °C iken, KG8, katalaz (+), nişasta hidrolizi (+), ve optimum üreme sıcaklığı 55 °C olarak tespit edilmiştir. İki bakteri arasındaki yüksek oranda 16S rRNA dizi benzerliğine rağmen bu gibi farklılıkların görülmesi KG8'in ayrı bir tür olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca tür teşhisinde kullanılan kinon tipleri çalışılmış, tüm çalışılan izolatların menakinon içerdiği ve KG8 için yapılan ileri çalışmada da bu menakinon tipinin MK-7 olduğu bulunmuştur. Ancak NAZINA ve arkadaşları (2001)'nin da belirttiği gibi MK-7 tipi menakinonların *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Anoxybacillus* ve *Thermobacillus* gibi termofilik basil cinslerini ayırt etmede kullanılması güçtür.

İzole edilen bakterilerin yeni bir tür veya alt tür olduğunu tespit etmek için morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yanı sıra yağ asidi analizi, lipid analizi ve kinon analizi ilk etapta yapılması gereken test ve analizlerdir. Daha güvenilir tür tayini yapmak için ise bakterilerin 16S rRNA dizi analizlerini yaparak bakterilerin hangi türlere yakın olduğu tespit edilir. Yakın türlerin benzerlik oranlarından yararlanarak filogenetik pozisyon belirlenir.

Yukarıda açıklanan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterler, yağ asidi kompozisyonu ve kinon analizine göre endospor oluşturan termofilik basillerin oluşturduğu gruba ait olduğu saptanan KG8'in 16S rRNA analizine göre *Anoxybacillus* türlerine % 99 oranında benzerlik göstermesi, bu izolatın *Anoxybacillus* türü olduğunu açıkça göstermektedir. *A. kamchatkensis* türü ile DNA-

DNA hibridizasyonu sonucunda elde edilecek homoloji ile bu izolatın yeni bir tür veya alt tür olduğu ortaya çıkacaktır.

KG9'un nişasta hidrolizi pozitif, katalaz pozitif ve kazein hidrolizi pozitif, KG5'in kazein ve jelatin pozitif, KG8'in ise nişasta hidrolizi pozitif olması endüstriyel açıdan önemli olan enzimlerin (amilaz, proteaz vs.) kaynağı olmaları açısından önem arz etmektedirler. KG8 ve KG9'un termofilik karakterde olmaları bunları önemli kılmaktadır.

Ekstrem şartlara dayanıklı türlerin enzim kaynağı olarak kullanılma potansiyelleri nedeniyle, Antartika'dan izole edilen ve tür teşhisi daha önce yapılan *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin endüstriyel açıdan öneme sahip β -galaktozidaz enzimi saflaştırılmıştır.

Tablo 4.13 tüm enzim saflaştırma adımlarını göstermektedir. Amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve DEAE-selüloz kromatografisinden sonra enzim sırasıyla 1.9, 2.53 ve 3.95 kat saflaştırılmıştır. Bununla beraber, bunları izleyen afinite kromatografisinde bir çok alternatife rağmen, saflaştırma düzeyini yeteri oranda artırmadı (yaklaşık 12 kat). Oysa bu afinite kolonu (*p*-aminobenzyıl 1-thio- β -d-galactopyranoside, Sigma) *Aspergillus nidulans*, *Escherichia coli*, ve *Bacillus megatherium*' a ait olanlar dahil, bir çok β -galaktozidazın hızlı bir şekilde saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır (NAGY ve ark. 2001). *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin β -galaktozidaz enzimi afinite kolonuna ya bağlanamamakta ya da zayıf bağlandığı görülmektedir, çünkü düşük NaCl konsantrasyonlarında bile kolondan yıkanmaktadır (normalde 1 M NaCl de bile yıkanma kolay gerçekleşmez). Bundan dolayı uyguladığımız preparatif elektroforez tekniğiyle büyük oranlarda homojen enzim elde ettik (113 U/mg protein spesifik aktivite, 163 kat saflaştırma ve % 8'lik verimle).

NAGY ve ark. (2001) de *Penicillium chrysogenum*'un β -galaktozidaz enzimini bu agaroz kolona uygulamış ve benzer şekilde saflaştırma elde edememiştir.

HOLMES ve ark. (2000) ekstrem halofilik bir Archaea olan *Haloferax alicantei*'nin β -galaktozidaz enzimini çalışmışlar, afinite kromatografisi sonucunda bu enzimi saflaştırılamamışlar ve preparatif elektroforezle saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığını tespit etmişlerdir.

FPLC sistemini kullanarak β -galaktozidazın nativ (non-denatüre) molekül ağırlığı hesaplanmış olup, elde edilen değer 165 kD'dur. 76 kD'lük moleküler ağırlığa denk gelen tek bir protein bant ise denatüre şartlar altında PAGE elektroforezi ile elde edildi. Çok değişik β -galaktozidaz enzimleri düşünüldüğünde, bu enzimin çok düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu görülmektedir. Örneğin, *E. coli* (116 kDa), *Thermus aquaticus* (144 kDa; termofilik enzim), *Bacillus stearothermophilus* (120 kDa). PISANI ve ark (1990) ekstrem termoasidofilik archaea bakterisi *S. solfataricus*'un denatüre olmamış β -galaktozidaz enziminin moleküler ağırlığını aktivite jeli içerisinde 240 kD olarak tespit etmiş ve bunların benzer ve 60 kD'luk bir tetramer yapı sergilediğini bulmuşlardır. VETERE ve PAOLETTI (1998) *Bacillus circulans*'da 212 kD, 145 kD ve 86 kD moleküler ağırlığa sahip üç izoformun varlığını gösterdiler. VIKHA ve ark (1987) *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri β -galaktozidaz'ın SDS-PAGE ile 105 kD, jel filtrasyonu ile 215 kD'luk moleküler ağırlığa sahip dimerik bir yapıda olduğunu gösterdiler. Şunu ifade etmek gerekir ki *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* nin β -galaktozidaz enzimi ekstrem derecede halofilik olan archaea *Haloferax alicantei*'nin enzimine çok benzer olduğu bulunmuştur. Afinite kromatografisine bağlanamama özelliği de benzer olan bu enzim 180 kD ağırlığa sahip iki monomerden (78 kD) oluştuğu bulunmuştur (HOLMES ve ark.1997). Benzer şekilde bir psikrofilik antarktika izolatu olan *Planococcus*' a ait β -galaktozidaz (tuza dirençli GH-42 glikozil hidrolaz ailesi üyesi) enziminin SDS-PAGE ile analizi moleküler ağırlığının 75 kD, jel filtrasyonla yapılan analiz sonucunda aktif formun ise 155 kD ağırlığa sahip olduğu, böylece bu enzimin dimer yapıda olabileceği sonucuna varılmıştır (SHERIDAN ve BRENHLEY, 2000). Saflaştırdığımız enzimin alt ünite molekül ağırlığı ayrıca *Klebsiella varyetesinin* galaktozidaz III ile *B. stearothermophilus*'un izoenzim I (sırasıyla 68 and 70 kD; 31), *Thermus* sp A4 ve *B. licheniformis*'in termostabil β -galaktozidaz enzimlerine

(sırasıyla 70 ve 80 kD) de yakın olduğu bulunmuştur (OHTSU ve ark.1998; PHANTRAN ve ark. 1998).

A. acidocaldarius subsp. *rittmannii*' den saflaştırılan β -galaktozidaz ın molekül ağırlığına, izole edildiği organizmaya ve afinite kromatografisine bağlanamama veya zayıf bağlanma yeteneğine bakıldığında büyük bir ihtimalle GH-42 ailesinin bir üyesi olduğu çok açıktır. GH-2 grubuna üye olan enzimler 120 kD gibi büyük polipeptidlere sahip dimer yapı sergilemesine rağmen, GH-42 üyeleri 75 kD'luk polipeptit içeren trimer yapıya sahiptir. GH-2'ler afinite ile kolayca saflaştırılırken, GH-42 üyeleri afinite kolonuna bağlanamadığı için saflaştırılamamaktadır. Afinite kromatografisine bağlanamama sebebi şu şekilde izah edilmektedir; enzime ait aktif merkezin protein yapısında büyük bir çukur paket içerisinde yer aldığı, dolayısıyla trimerik yapıda dış yüzeyde yer alamadığından dolayı afinite kromatografisindeki bağlanma bölgeleri ile temas kuramamaktadır (HIDAKA ve ark. 2002). GH-42'ye üye olan β -galaktozidaz'ların (*Thermus* sp. A4' den elde edilen dahil) çoğu, hesaplanan moleküler ağırlıkları (genelde 150 kD) denatüre olanından yaklaşık iki kat fazla çıktığı için dimer oldukları zannediliyordu. Bununla beraber, *Thermus* sp. A4' den elde edilenin bir trimer olduğu ortaya çıkarılmıştır (HIDAKA ve ark. 2002). Bu çalışmada elde edilen Jel filtrasyon ve SDS-PAGE'in sonuçları *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin β -galaktozidazı benzer veya aynı alt ünitelerden (76 kD) oluşan oligomerik (dimer veya trimer; non-denatüre moleküler ağırlık 165 kD) bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Eğer *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin β -galaktozidazı kompakt globüler bir yapıya sahipse saflaştırdığımız enzim *Thermus* sp. A4'ün enzimine benzer şekilde trimerik bir yapıya sahiptir. Şunu da unutmamak gerekir ki enzim dimer bir yapıya da sahip olabilir. Bunun için X-ışınları kırınım metoduyla üç boyutlu yapısının incelenmesi gerekir.

Yapılan kinetik çalışmada bu enzimin Lineweaver-Burk metodundan faydalanarak Km değeri 8.9 mM olarak hesaplanmıştır. Bu enzimin yüksek Km değeri, diğer GH-42 üyelerine nazaran ONPG substratına olan zayıf ilgisini göstermektedir: *Thermus* sp. A4'ün (OHTSU ve ark. 1998) ve *Planococcus*

izolatının β -galaktozidazları sırasıyla Km 5.9 ve Km 4.9 değerlerine sahip (SHERIDAN ve ark. 2000).

Bu enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6 ve 65 °C olarak bulunmuştur. Bu elde edilen pH değeri *E. coli* ve *S. solfataricus*'a yakın, ama *Thermus aquaticus*'dan elde edilenden biraz fazla olduğu görülmektedir (PISANI ve ark. 1990). KRULWICH ve ark. (1978) *Bacillus acidocaldarius*'un sitoplazmik pH'sı, dış ortamın pH'sı 2.0 ile 4.5 arasında olmasına rağmen, 5.85 ve 6.31 arasında korunduğu bulunmuştur. MATZKE ve ark. (2000-b) *A. acidocaldarius*'un hücre özütlerindeki neopullulanaz aktivitesinin optimum pH'sının sitoplazmanın pH'sına yakın bir değerde olduğunu bulmuşlardır. Bu sitoplazmik enzimin optimum sıcaklığı da 55-57 °C olarak bulunmuştur. İlginç olarak, bu bulunan optimum değerler mevcut çalışmada saflaştırılan *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin sitoplazmik β -galaktozidazına çok yakın benzerlik göstermektedir.

Termostabil enzimler genelde endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalara sahiptir (DEMIRJIAN ve ark.2001; HAKI VE RAKSHIT, 2003). Özellikle, termostabil β -galaktozidazlar laktoz ihtiva eden sıvıların endüstriyel işlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada saflaştırılan *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* β -galaktozidazının optimum pH ve sıcaklığının uygunluğu, hem kendiliğinden sentezlenen hem de sentezi artırılabilen (indüklenebilen) özelliklerinden dolayı, süt ve peynir altı suyu laktozunun hidrolizinde uygun bir kullanım alanına sahip olabileceğini göstermektedir. Bundan dolayı, bu enzimin endüstride kullanılabilirliğinin ileri seviyede test edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

ALEXANDER, S.K., STRETE, D., 2001. Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory, Addison Wesley Longman, Inc. p.193.

ANWARUL, H., NICHOLAS, J. R., 2005. Phenotypic and Genotypic Characterisation of *Bacillus cereus* Isolates from Bangladeshi Rice, International Journal of Food Microbiology. 98,23-24.

APPEL, S.H., ALPERSI, D. H., TOMKINS, G. M., 1965. Multiple Molecular Forms of β -Galactosidase, J.Mol.Biol. 11, 12-22.

ARDA, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Serisi no:46, ANKARA.

ASH, C., FARROW, J.A.E., WALLBANKS, S., COLLINS, M.D., 1991. Phylogenetic Heterogeneity of the Genus *Bacillus* Revealed by Comparative Analysis of Small-Subunit-Ribosomal RNA, Lett. Appl.Microbiol. 13, 202-206.

BATRA, N., SINGH, J., BANERJEE, UC., PATNAIK, PR., SOBT, RC., 2002. Production and Characterization of a Thermostable Beta-Galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS53, Biotechnol Appl Biochem. 36,1-6.

BATRAKOV , S.G., RODIONOVA , T.A., ESIPOV, S.E., POLYAKOV, N.B., SHEICHENKO, V.I., SHEKHOVTSOVA, N.V., LUKIN, S.M., PANIKOV, N.S., NIKOLAEV, Y.A., 2003. A Novel Lipopeptide , an Inhibitor of Bacterial Adhesion , from the Thermophilic and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* Strain 603, Biochimica et Biophysica Acta., 1634, 107-115.

BECERRA, M., CERDAN, E., GONZALEZ, SISO MI., 1998. Dealing with Different Methods for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase Purification, Biol Proced Online. 1, 48-58.

- BELDUZ, A.O., DULGER, S., DEMIRBAG, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. Nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53,1315-1320.
- BERBER , İ., 2004. Characterization of *Bacillus* Species by Numerical Analysis of Their SDS-PAGE Protein Profiles, Journal of Molecular Biology. 3, 33-37.
- BISWAS, I., KAYASTHA, AM., SECKLER, R., 2003. Purification and Characterization of a Thermostable β -Galactosidase from Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14, J Plant Physiol.160, 327–37.
- BROCK, T. D., 1971. Biomodial Distribution of pH Values of Thermal Springs of the world. Bull. Geol. Soc. Am. 82, 1393-1394.
- BROCK, TD.(ed) 1986. Introduction: An Overview of Thermophiles: In: Brock TD (ed) *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*. Wiley, New York, 1-15.
- BRUINS, M.E., JANSEN, A.E.M., BOOM, R. M., 2001. Thermozyms and Their Applications, Applied Biochemistry and Biotechnology. 90, 155-186.
- CASTANHA, E.R, FOX, A., FOX, K.F., 2006, Rapid Discrimination of *Bacillus anthracis* from Other Members of the *B. cereus* group by Mass an Sequence of “intact “ Small Acid Soluble Proteins (SASPs) Using Mass Spectrometry, Journal of Microbiology methods. 67, 230-240.
- CHAO, W.L., HSU, S.F., 2004. Response of Soil bacterial Community to the Addition of Toluene - Degrading Bacteria, Soil Biology and Biochemistry. 36, 479-487.

CHRISTIE, W.W., 1989. Gas Chromatography and Lipids, Oily Press, Bridgwater.

CIESLINSKI, H., KUR, J., BIALKOWSKA, A., BARAN, I., MAKOWSKI, K., TURKIEWICZ, M., 2005. Cloning, Expression, and Purification of a Recombinant Cold-Adapted β -Galactosidase from Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22B, Protein Exp Purif. 39,27–34.

CLERCK, D.E., RODRIGUEZ-DIAZ, M., VANHOUTTE, T. HEYRMAN, J. LOGAN, A.N. VOS, D.P., 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp.nov., and *Bacillus gelatini* sp.nov., Isolated from Contaminated Gelatin Batches, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54,941-946.

COHN, M. and MONOD, J., 1951. Purification de la β - Galactosidase (Lactase) D'*Escherichia coli*, Biochimica et Biophysica Acta. 7, 153-173.

COKER, J.A., SHERIDAN, P.P., LOVELAND-CURTZE, J., GUTSHALL, K.R., AUMAN, A.J., BRENCHLEY, KR., 2003. Biochemical Characterization of a β -Galactosidase with a Low Temperature Optimum Obtained from an Antarctic *Arthrobacter* Isolate, J Bacteriol. 185, 5473–82.

COLLINS, M.D., JONES, D., 1981. Distribution of Isoprenoid Quinone Structural Types in Bacteria and Their Taxonomic Implication, Microbiological Reviews. 45, 316-354.

COWAN, S. T., STEEL, R.J., 1974. Manual for Identification of Medical Bacteria. (2nd ed.) Cambridge University Press. UK.

ÇOLAK, A., SISIK, D., SAGLAM, N., GUNER, S., CANAKCI, S., BELDUZ, A.O., 2005, Characterization of a Thermoalkalophilic Esterase from a Novel Thermophilic Bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2, Bioresource Technology. 96, 625-631.

DE CLERCK, E., DE VOS, P., 2002. Study of the Bacterial Load in a Gelatine Production Process Focussed on *Bacillus* and Related Endosporeforming Genera, Systematic and Applied Microbiology ., 25, 611-617.

DE SOUZA , A.N., MARTINS , M.L.L., 2001, Isolation, Properties and Kinetics of Growth of a Thermophilic *Bacillus*, Brazilian Journal of Microbiology. 32 , 271-275.

DEMIRJIAN, DC., MORIS-VARA, F., CASSIDY, CS., 2001. Enzymes from Extremophiles, Curr Opin Chem Biol. 5,144–51.

DULGER, S., DEMIRBAG, Z., BELDUZ, A.O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. Nov., and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54,1499-1503.

EICHLER, J., 2001. Biotechnological Uses of Archaeal Extremozymes, Biotechnology Advances. 19, 261-278.

FELSENSTEIN, J., 1993.PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5.1., Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

FITTER , J., HERMANN , R., DENCHER, N.A., BLUME, A., and HAUSS, T., 2001. Activity and Stablitiy of a Thermostabl alpha-Amylase Compared to Its Mesophilic Homologue, Mechanism of Thermal Adaptation. Biochemistriy. 40, 10723-10731.

FITZ-JAMES, P. C., YOUNG, E., 1959. Comparision of Species and Varieties of the Genus *Bacillus*, Structure and Nucleic Acid Content of Spores, Journal of Bacteriology. 78 (6),743-754.

FOGEL, S., SYPHERD, PS.1968. Extraction and Isolation of Individual Ribosomal Proteins from *Escherichia coli*, J. Bacteriol .96,358–64.

FOLMSBEE, M., DUNCAN, K., HAN, S.O., NAGLE, D., JENNINGS, E., McINERNEY, M., 2006. Re-Identification of the Halotolerant, Biosurfactant-Producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2, Systematic and Applied Microbiology, 29, 645-649.

FRITZE, D., 2004. Taxonomy of Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria, The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. Symposium, The American Phytopathological Society, 94,1245-1248.

FUJIWARA, S., 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 518-525.

GALVANI, C., TERRY, J., ISHIGURO, E. E., 2001. Purification of the RelB and RelE Proteins of *Escherichia coli*: RelE Binds to RelB and to Ribosomes, J Bacteriol 183,2700–3.

GIFFEL, M.C., BEUMER, R.R., KLIJN, N., WAGENDORP, A., ROMBOUTS, F.M., 1997. Discrimination Between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Using Specific DNA Process Based on Variable Regions of 16S rRNA, FEMS Microbiology Letters, 146, 47-51.

GOODMAN, S.R., MARRS, B.L., NARCONIS, R.J., OLSON, R.E., 1976. Isolation and Description of a Menaquinone Mutant from *Bacillus licheniformis*, Journal of Bacteriology, 125,282-289.

GORDON, R.H.W.C., PANG, C.H.N., 1973. The Genus *Bacillus*, Department of Agriculture, Washington, DC, USA.

GOTO, K., MOCHIDA, K., ASAHARA, M., SUZUKI, M., KASAI, H., YOKOTA, A., 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a Novel Thermo-Acidophilic, Endospore forming Bacterium that does not Possess ω -alicyclic Fatty Acids, and

Emended Description of the Genus *Alicyclobacillus*., Int J Syst Evol Microbiol. 53,1537–44.

GUVEN, K., DE POMERAI, DI., 1995. Differential Expression of HSP Proteins in Response to Heat and Cadmium in *Caenorhabditis elegans*, J Thermal Biol. 20,355–63.

GUVEN, K., DUCE, JA., DE POMERAI, DI., 1994. Evaluation of a Stress-Inducible Transgenic Nematode Strain for Rapid Aquatic Toxicity Testing, Aquatic Toxicol. 29,119–37.

GÜVEN, R., 2004. *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *ritmannii*'nin β -Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, DİYARBAKIR.

HAKI, GD., RAKSHIT, SK., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresour Technol. 89,17–34.

HALEBIAN, B., HARRIS, B., FINEGOLD, S.M., ROLFE, R.D., 1981. Rapid Method that Aids in Distinguishing Gram-positive from Gram-negative Anaerobic Bacteria, J. Clin. Microbiol. 13,444-448.

HAQUE, A., RUSSELL, N., 2005. Phenotypic and Genotypic Characterisation of *Bacillus cereus* Isolates from Bangladeshi Rice, International Journal of Food Microbiology 98, 23-24.

HENRISSAT, B., 1991. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid Sequence Similarities, Biochem J. 280,309–16.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A., 1996. UpdatIng a Sequence Based Classification of Glycosyl Hydrolases, Biochem J. 316,695–6.

HEYRMAN, J., SWINGS, J., 2001. 16S rRNA Sequence Analysis of Bacterial

Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain), System. Appl. Microbiol., 24, 417-422.

HIDAKA, M., FUSHINOBU, S., OHTSU, N., MOTOSHIMA, H., MATSUZAWA, H., SHOUN, H., 2002. Trimeric Crystal Structure of the Glycoside Hydrolase Family 42 β -Galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the Structure of its Complex with Galactose, J Mol Biol. 322, 79-91.

HIRAISHI, A., MASAMUNE, K., KITAMURA, H., 1989. Characterization of the Bacterial Population Structure in an Anaerobic - Aerobic Activated Sludge on the Basis of Respiratory Quinone Profiles, Applied and Environmental Microbiology. 55,897-901.

HOLMES, M.L., DYALL-SMITH, M.L., 2000. Sequence and Expression of a Halobacterial β -Galactosidase Gene, Mol Microbiol . 36:114-22.

HOLT, G.J., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T., 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, USA.

HUANG, X-W., NIU, Q.-H., ZHOU, W., ZHANG, K-Q., 2005. *Bacillus nematocida* sp. nov., a Novel Bacterial Strain with Nematotoxic Activity Isolated from Soil in Yunnan, China, Systematic and Applied Microbiology. 28, 323-327.

HULSMANN, A., LURZ, R., SCHEFFEL, F., SCHNEIDER, E., 2000. Maltose and Maltodextrin in the Thermoacidophilic Gram-Positive Bacterium Alicyclobacillus Acidocaldarius is Mediated by a High-Affinity Transport System that Includes a Maltose Binding Protein Tolerant to Low PH, J. Bacteriol. 182,6292-301.

JUKES, T.H., CANTOR, C.R., 1969. Evolution of Protein Molecules, In: H.N.Munro (ed.) Mammalian Protein Metabolism, Akademic Press. New York, 21-132.

KAMFER, P., 1994. Limits and Possibilities of Total Fatty Acid analysis for Classification and Identification of *Bacillus species*, Systematic and Applied Microbiology. 17, 86-98.

KANEDA, T., 1968. Fatty Acids in the Genus *Bacillus*, Journal of Bacteriology, 95, 2210-2216.

KANEDA, T., 1977. Fatty Acids in the Genus *Bacillus*: an Example of Branched-Chain Preference, Bacteriol.Rev. 41, 391-418.

KANEDA, T., 1991. Iso and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance, Microbiological Review. 55- 288-302.

KARASOVÁ-LIPOVOVÁ, P., STRNAD, H., SPIWOK, V., MALÁ, S., KRÁLOVÁ, B., RUSSELL, NJ., 2003. The Cloning, Purification and characterisation of a Cold-Active β -galactosidase from the Psychrotolerant Antarctic Bacterium *Arthrobacter* sp. C2, Enzyme Microbiol Technol.33, 836-44.

KEVBRIN, V.V., ZENGLER, K., LYSENKO, A.M., WIEGEL, J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. Nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka, Extremophiles. 9, 391-398.

KOVACS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanae* by the Oxidate Reaction, Nature . 66, 24-26.

KRIEG, A., 1970. In Vitro Determination of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, and Related Bacilli, Journal of Invertebrate Pathology. 15, 313-320.

KRISTJANSSON, M.M. AND ASGEIRSSON, B., 2002. Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology, Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p.77-99.

- KRULWICH, TA., DAVIDSON, LF., FILIP, SJ. JR., ZUCKERMAN, RS., GUFFANTI, AA., 1978. The protonmotive force and beta-galactoside transport in *Bacillus acidocaldarius*, *J. Biol Chem.* 253 (13) , 4599-603.
- KURISU, F., SATOH, H., MINO, T., MATSUO, T., 2002. Microbial Community Analysis of Thermophilic Contact Oxidation Process by Using Ribosomal RNA Approaches and the Quinone Profile Method, Water Research .36, 429-438.
- KURZ, G. And WALLENFELS, K., 1974. Lactose and Other β -D- Galactosidase in Methods of Enzymatic Analysis (edited by Bergmeyer H.U.) Verlag Chemie Weinheim, Academic Press inc.New York and London, 3, 1180-83.
- LADERO, M., SANTOS, A., GARCIA, JL., CARRASCOSA, AV., PESSELA, BC., GARCIA-OCHOA, F., 2002. Studies on Activity and the Stability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*, Enzyme Microbiol Technol .30, 392–405.
- LAEMMLI, UK., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature .227,680–5.
- LANYI., 1987., Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria, Methods Microbiol.19, 1-67.
- LAWRENCE, D., HEITEFUSS, S., SEIFERT, S. H., 1991. Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by Gas Chromatographic Whole- Cell Fatty Acid Analysis, Journal of Clinical Microbiology . 29, 1508-1512.
- LEMMA, E., HAGERHALL, C., GEISLER,V., BRANDT, U., JAGOW, G.V., KROGER,A., 1991.Reactivity of the *Bacillus subtilis* Succinate Dehydrogenase Complex with Quinones, Biochimica et Biophysica Acta. 1059,281-285.

LINEWEAVER, H., BURK, D., 1934. Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56, 656-8.

LOPEZ, C.A., ALIPPI, A. M., 2007. Phenotypic and Genotypic Diversity of *Bacillus cereus* Isolates Recovered from Honey, *International Journal of Food Microbiology* (in press).

MACIUNSKA, J., CZYZ, B., SYNOWIECKI, J., 1998. Isolation and Some Properties of β -Galactosidase from the Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus*, *Food Chem.* 63,441-5.

MANZANO, M., COCOLIN, L., CANTONI, C., COMI, G., 2003. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* Differentiation Using a PCR-RE Technique, *International Journal of Food Microbiology.* 81, 249-254.

MATSUBARA, H., GOTO, K., MATSUMARA, T., MOCHIDA, K., IWAKI, M., NIWA, M., 2002. *Alicyclobacillus acidophilus* sp. nov., a Novel Thermo-Acidophilic, Omega Alicyclic Fatty Acid-Containing Bacterium Isolated from Acidic Beverages, *Int J Syst Evol Microbiol.* 52,1681-5.

MATSUMOTO, M, DE BONT, J.A.M., ISKEN, S., 2002. Isolation and Characterization of the Solvent-Tolerant *Bacillus cereus* Strain R1, *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 94,45-51.

MATZKE, J., SCHWERMANN, B., BAKKER, EP., 1997. Acidostable and Acidophilic Proteins: the Example of the α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Comp Biochem Physiol.* 118,475-9.

MATZKE, J., HERMAN, A., SCHNEIDER, E., BAKKER, EP., 2000. Gene Cloning, Nucleotide Sequence and Biochemical Properties of a Cytoplasmic Cyclomaltodextrinase (neopululanase) from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, Reclassification of a Group of Enzymes, *FEMS Microbiol Lett.* 183, 55-61.

MATZKE, J., SCHNEGELSBERG, B., SCHMID, R. H'ULSMANN, A., SCHNEIDER, E., BAKKER, EP., (2000-a). Amylopullulanase, Cyclodextrinase and Type II α -Glucosidase from the Thermoacidophilic Bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*: Glycohydrolases with a Different Sub-Cellular Location. In: Carbohydrate Enzymes and Basic Experimental Techniques (Park, K.H., Ed.), Suwon, South Korea, 85–99.

MINNIKIN, D.E., DONNELL, A.G.O., GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., ATHALYA, M., SCHAAL, A., PARLETT, J.H., 1984. An Integrated Procedure for the Extraction of Bacterial Isoprenoid Quinones and Polar Lipids, Journal of Microbiology Methods, 2, 233-241.

MORA, D., FORTINA, M.G., NICASTRO, G., PARINI, C., MANACHINI, P.L., 1998. Genotypic Characterization of Thermophilic Bacilli: a Study on New Soil isolates and Several Reference Strains, Re. Microbiol., 149, 711-722.

MORACCI, M., NUCCI, R., FEBBRAIO, F., VACCARO, C., VESPA, N., LA CARA, F., 1995. Expression and Extensive Characterization of a β -Glycosidase from the Extreme Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli*: Authenticity of the Recombinant Enzyme, Enzyme Microbiol Technol. 17, 992–7.

NAGY, Z., KISS, T., SZENTIRMAI, A., BIRO, S., 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. Protein Expr. Purif. 21, 24-9.

NAZINA, T.N., TOROVA, T.P., POLTARUS, 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., 2001. 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 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. 51, 433-446.

NICOLAUS, B., LAMA, L., ESPOSITO, E., MANCA, M. C., DI PRISKO, G., GAMBACORTA, A., 1996. *Bacillus thermoantarcticus* sp. Nov., from Mount Melbourne, Antarctica : a Novel Thermophilic Species, Polar Biol., 16, 101-104.
Antarctica:Mount Rittmann, Polar Biol. 19,133–41.

NICOLAUS, B., IMPORTA, R., MANCA, MC., LAMA, L., ESPOSITO, E., GAMBACORTA, A., 1998. *Alicyclobacillus* from an Unexplored Geothermal Soil in
NICOLAUS, B., MANCA, M. C., LAMA, L., ESPOSITO, E., GAMBACORTA, A., 2001. Lipid Modulation by Environmental Stresses in Two Models of Extremophiles Isolated from Antarctica, Polar Biol.24, 1-8.

NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER , M., ANTRANIKIAN, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel enzymes for Industrial Application, Appl Microbiol Biotechnol. 51, 711-729.

NIELSEN, P., RAINEY, F.A., OUTTRUP, H., PRIEST, F.G., FRITZE, D., 1994. Comparative 16S rRNA Sequence Analysis of Some Alkaliphilic Bacilli and the Establishment of a Sixth rRNA Group within the Genus *Bacillus*, FEMS Microbiology Letters. 117, 61-65.

OHTSU, N., MOTOSHIMA, H., GOTO, K., TSUKASAKI, F., MATSUZAWA, H., 1998. Thermostable Beta-Galactosidase from an Extreme Thermophile *Thermus* sp. A4: Enzyme Purification and Sequencing, Biosci Biotechnol Biochem. 62, 1539–45.

ÖZÇELİK, S., 1998. Genel Mikrobiyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Bölümü, ISPARTA.

ÖZMEN, F., DEMİREL, H., 2005. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Jeotermal Enerji Kaynakları, Bitirme Projesi-1, Dicle Üniversitesi, DİYARBAKIR.

PANDYA, K.P., KING, H.K., 1966. Ubiquinone and Menaquinone in Bacteria: A Comparative Study of Some Bacterial Respiratory Systems, Archives of Biochemistry and Biophysics. 114, 154-157.

PIKUTA, E., CLELAND, D., TANG, J., 2003. Aerobic Growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1T: Emended Descriptions of *A. pushchinoensis* and the Genus *Anoxybacillus*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 1561-1562.

PIKUTA, E., LYSENKO, A., CHUVILSKAYA, N., MENDROCK, U., HIPPE, H., SUZINA, N., NIKITIN, D., OSIPOV, G., LAURINAVICHUS, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. Nov. sp. Nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50, 2109-2117.

PIRTTIJARVI, T.S.M., ANDERSON, M.A., SALKINIJA - SALONEN, M.S., 2000. Properties of *Bacillus cereus* and Other Bacilli Contaminating Biomaterial - Based Industrial Processes, International Journal of Food Microbiology. 60, 231-239.

PISANI, M.F., RELLA, R., RAIA, A.C., ROZZO, C., NUCCI, R., GAMBACORTA, A., et al. 1990. Thermostable β -Galactosidase from the Archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*: Purification and Properties, Eur J Biochem. 187, 321-8.

POLI, A., ESPOSITO, E., LAMA, L., ORLANDO, P., NICOLAUS, G., DE APOLONIA, F., GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. Nov., a Thermophilic Amylase Producing Bacterium Isolated from Mount Rittmann (Antarctica), Systematic and Applied Microbiology. 29, 300-3007.

PRIEST, F.G., GOODFELLOW, M., TODD, C., 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*, Journal of Gen Microbiology., 134, 1847-1882.

RAINEY, F.A., FRITZE, D., STACKEBRANDT, E., 1994. The Phylogenetic Diversity of Thermophilic Members of the Genus *Bacillus* as Revealed by 16S rRNA Analysis, FEMS Microbiology Letters. 115, 205-212.

RAINEY, F.A., WARD-RAINEY, N., KROPPESTEDT, R.M., STACKEBRANDT, E. STACKEBRANDT, E., 1996. The Genus *Nocardiopsis* Represents a Phylogenetically Coherent Taxon and a Distinct Actinomycete Lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. Nov., Int. J. Sys. Bacteriol. 46, 1088-1092.

ROSA, S.M.L.J., ANTUNES-MADERA, M. D. C., MATOS, M. J., JURADO, A.S., MADEIRA, V.M.C., 2000. Lipid Composition and Dynamic of Cell Membranes of *Bacillus stearotherophilus* Adapted to Amiodarone, Biochimica et Biophysica Acta. 1487, 286-295.

RUDI, K., KLEIBERG, G.H., HEIBERG, R., ROSNES, J.T., 2007. Rapid Identification and Classification of Bacteria by 16S rRNA Restriction Fragment Melting Curve Analyses (RFMCA), Food Microbiology. 24, 474-481.

SCHIRALDI, C., and DE ROSA, M., 2002. The Production of Biocatalysts and Biomolecules from Extremophiles, Trends in Biotechnology. 20, 515-521.

SCWERMANN, B., PFAU, K., LILIENSIEK, B., SCHLEYER, M., FISCHER, T., and BAKKER, E.P., 1994. Purification, Properties and Structural Aspect of a Thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* atcc 27009 Insight into Acidostability of Proteins, Eur. J. Biochem. 226, 981-991.

SHARP, R.J., BOWN, K.J., ATKINSON, A., 1980. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Thermophilic Species of *Bacillus*, Journal of General Microbiology. 117, 201-210.

SHEN, P. Y., COLES, E., FOOTE., STENESH., 1970. Fatty Acid Distribution in Mesophilic and Thermophilic Strains of the Genus *Bacillus*, Journal of Bacteriology. 103,479-481.

SHERIDAN, P.P., BRENCHLEY, J.E., 2000. Characterization of a Salt-Tolerant Family 42 β -Galactosidase from a Psychrophilic Antarctic *Planococcus* Isolate, Appl Environ Microbiol. 66, 2438–44.

SHIMADA , H., SHIDA, Y., NEMOTO, N., OSHIMA, T., YAMAGISHI, A., 2001. Quinone Profiles of *Thermoplasma acidophilum* HO-62, Journal of Bacteriology. 183, 1462-1465.

SHINAGAWA, K., 1990. Analytical Methods for *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* Species, International Journal of Food Microbiology. 10, 125-141.

SKERMAN, V.B.B., 1967. Guide to the Identification of the Genera of Bacteria (second ed.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

STACKEBRANDT, E., GOEBEL, BM., 1994. Taxonomic Note: a Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, International Journal of Systematic Bacteriology. 44, 846-849.

SUIHKO, M.-L., STACKEBRANDT, E., 2003. Identification of Aerobic Mesophilic Bacilli Isolated from Board and Paper Products Containing Recycled Fibres, Journal of Applied Microbiology. 94, 25.

TANG, J. C., KANAMORI, T., INOUE, Y., YASUTA, T., YOSHIDA, S., KATAYAMA, A., 2004. Changes in the Microbial Community Structure During Thermophilic Composting of Mamure as Detected by the Quinone Profile Method, Process Biochemistry . 39, 1999-2006.

TANRISEVEN, A., DOĞAN, Ş., 2002. A novel Method for the Immobilization of β -Galactosidase, Process Biochemistry. 38, 27-30.

TSURUOKA, N., NAKAYAMA, T., ASHIDA, M., HEMMI, H., NAKAO, M., MINAKATA, H., 2003. Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression, Appl Environ Microbiol. 69,162–9.

VALERO, M., HERNANDEZ-HERRERO, L.A., FERNANDEZ, P.S., SALMERON, M.C., 2002, Characterization of *Bacillus cereus* Isolates from Fresh Vegetables and Refrigerated Minimally Processed Foods by Biochemical and Physiological Tests, Food Microbiology. 19, 491-499.

VAN DEN BURG, B., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Microbiology. 6, 213-218.

VETERE, A., PAOLETTI, S., 1998. Separation and Characterization of Three β -Galactosidases from *Bacillus circulans*, Biochim Biophys Acta. 1380, 223–31.

VIKHA, IV., VOROB'EV, AA., ZHOLUDEVA, SI., KAS'IANOVA, TA., KUDRIAVTSEV, SI., 1987. Isolation of a Highly Active of beta-D-Galaktosidase, Prikl. Biokhim Mikrobiol. 23, 291-8.

WANG, S-H., WEN, J-K., ZHOU, Y-F., ZHANG, Z-P., YANG, R-F., ZHANG, J-B., CHEN, J., ZHANG, X-E., 2004. Identification and Characterization of *Bacillus anthracis* by Multiplex PCR on DNA Chip, Biosensors and Bioelectronics. 20, 807-813.

WHITTAKER, P., MOSSOBA, M.M.,AL-KHALDI, S., FRY, F.S., DUNKEL, V.C., TALL, B.D., YURAWECZ,M.P., 2003. Identification of Foodborne Bacteria by Infrared Spectroscopy Using Cellular Fatty Acid Methal Esters, Journal of

Microbiology Methods. 55, 709-716.

WINTZINGERODE, V.F., RAINEY, F.A., KROPPESTEDT, R.M., STACKEBRANDT, E., 1997. Identification of Environmental Strains of *Bacillus mycoides* by Fatty Acid Analysis and Species-Specific 16S rDNA Oligonucleotide Probe, FEMS Microbiology Ecology. 24, 201-209.

WISOTZKEY, J.D., JURTSCHUK, P.J., FOX, G.E., DEINHARD, G., PORALLA, K., 1992. Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen.nov. Int. J Syst Bacteriol. 42, 263-26.

XU, D., COTE, J-C., 2003. Phylogenetic Relationships Between *Bacillus* Species and Related General Inferred from Comparison of 3' and 16S rRNA and 5' and 16S-23S ITS Nucleotide Sequences, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 695-704.

YAKIMOV, M.M., AMRO, M. M., BOCK, M., BOSEKER, K., FREDRICKSON, H. L., KESSEL, D. G., TIMMIS, K. N., 1997. The Potential of *Bacillus licheniformis* Strains for in Situ Enhanced Oil Recovery, Journal of Petroleum Science and Engineering. 18, 147-160.

YILMAZ., F., 2002. *Bacillus* Türleri, Bitirme Çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi, RİZE.

YUMOTO, I., HIROTA, K., KAWAHARA, T., NODASAKA, Y., OKUYAMA, H., MATSUYAMA, H., YOKOTA, Y., NAKAJIMA, K., HOSHINO, T., 2004. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. Nov., a Moderately Thermophilic Bacterium from a Hot Spring in Kamchatka, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54, 1239-1242.

7. TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.1.** Gram-pozitif aerob endospor oluşturan bakterilerin (AEOB), cins içerisindeki tür sayısına ve 16S rRNA/DNA dizilerine göre sistematik pozisyonu (Fritze, 2004)
- Tablo 1.2.** Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması (Arda, 2000).
- Tablo 1.3.** Ekstremofiller ve enzimlerinin endüstriyel uygulamaları
- Tablo 3.1.** Kullanılan karbon kaynakları
- Tablo 3.2.** Lipit analizi için kullanılan bakteri miktarları
- Tablo 4.1.** KG5' in Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)
- Tablo 4.2.** KG8' in Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)
- Tablo 4.3.** KG9' un Değişik Karbon Kaynaklarında Üremesi (OD 470 nm)
- Tablo 4.4.** Sodyum Azid (SA) Duyarlılığı (OD 470 nm)
- Tablo 4.5.** Lizozim Duyarlılığı (OD 470 nm)
- Tablo 4.6.** İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri
- Tablo 4.7.** İzole Edilen Bakterilerin Değişik Konsantrasyonlardaki NaCl'e Toleransları (OD 470 nm)
- Tablo 4.8.** Antibiyotik Duyarlılık Testi
- Tablo 4.9.** KG5, KG8 ve KG9'un Yağ Asidi Profilleri
- Tablo 4.10.** KG5'in 1500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rDNA Baz Dizilimi
- Tablo 4.11.** KG8'in 1500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rDNA Baz Dizilimi
- Tablo 4.12.** KG9'un 500 Baz Çifti Uzunluğundaki 16S rDNA Baz Dizilimi
- Tablo 4.13.** *A.acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' in β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırma Adımlarının Bir Özeti. *
- Tablo 5.1.** KG5' in fenotipik özelliklerinin diğer *Bacillus cereus* varyeteleri ile karşılaştırılması
- Tablo 5.2.** KG5 varyetesi ve diğer *B.cereus* varyetesine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması
- Tablo 5.3.** KG9' in fenotipik özelliklerinin diğer *Bacillus licheniformis* varyeteleri ile

karşılaştırılması

Tablo 5.4. KG9 varyetesi ve diğer *B.licheniformis* varyetelerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması

Tablo 5.5. KG8'in fenotipik özelliklerinin diğer *Anoxybacillus* türleri ile karşılaştırılması

Tablo 5.6. KG8 varyetesi ve *Anoxybacillus* türlerine ait yağ asidi metil ester (FAME) profillerinin karşılaştırılması

8. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. 16S ve 18S rRNA Tabanlı Canlıların Filogenetik Analizi (Fujiwara, 2002)

Şekil 1.2. *Bacillus cereus* grubunda taksonomik gelişme (Fritze, 2004)

Şekil 1.3. *Bacillus subtilis* grubunun taksonomik gelişimi (Fritze, 2004)

Şekil 1.4. Menakinon

Şekil 4.1. Sıcaklığın Bakterilerin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.2. PH'nın Bakterilerin Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.3. Bakterilerin Zamana Bağlı Üreme Grafiği

Şekil 4.4. KG5'e ait Endospor Görünüşü

Şekil 4.5. KG5'in Mikroskopik Görüntüsü

Şekil 4.6. KG5'in Gram Boyama Özelliği

Şekil 4.7. KG5'in NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

Şekil 4.8. KG8'e ait Endospor Görünüşü

Şekil 4.9. KG8'in Mikroskopik Görüntüsü

Şekil 4.10. KG8'in Gram Boyama Özelliği

Şekil 4.11. KG8'in NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

Şekil 4.12. KG9'un Gram Boyama Özelliği

Şekil 4.13. KG9'un Mikroskopik Görünümü

Şekil 4.14. KG9'un NB Agar Üzerindeki Koloni Görünümü

Şekil 4.15. KG5, KG8 ve KG9'un Katalaz Aktivite Testi

Şekil 4.16. KG5'e ait Nişasta Hidrolizi Testi

Şekil 4.17. KG8'e ait Nişasta Hidrolizi Testi

Şekil 4.18. KG9'a ait Nişasta Hidrolizi Testi

Şekil 4.19. KG5'e ait Kazein Hidrolizi Testi

Şekil 4.20. KG9'a ait Kazein Hidrolizi Testi

Şekil 4.21. KG5'e ait Jelatin Hidrolizi Testi

Şekil 4.22. KG5'e ait L-Tirozin Degradasyonu Deneyi

Şekil 4.23. KG8'e ait L-Tirozin Degradasyonu Deneyi

Şekil 4.24. KG5'e ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi

Şekil 4.25. KG8'e ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi

Şekil 4.26. KG9'a ait Nitrit-Nitrat Redüksiyonu Deneyi

- Şekil 4.27.** KG5, KG8 ve KG9'a ait Sodyum Hippurat Hidrolizi Testi
- Şekil 4.28.** KG5'in NV30, K30 ve NS100 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.29.** KG5'in AMP25, VA30, CN30 ve N30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.30.** KG5'in C10, C50, S25 ve MY15 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.31.** KG5'in E5, E30, TE30 ve TE50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.32.** KG5'in B10, P10, FD10 ve P2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.33.** KG8'in K30, NV30 ve S25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.34.** KG8'in VA30, B10, N30 ve AMP25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.35.** KG8'in NS100, C10 ve C50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.36.** KG8'in CN30, E5 ve E30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.37.** KG8'in TE50, TE30 ve FD10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.38.** KG8'in MY15, P2 ve P10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.39.** KG9'un NV30, NS100 ve K30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.40.** KG9'un FD10, MY15, AMP25 ve S25 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.41.** KG9'un B10, C10 ve C50 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.42.** KG9'un E5, E30 ve P10 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.43.** KG9'un N30, VA30 ve CN30 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.44.** KG9'un TE30, TE50 ve P2 Antibiyotiklerine Duyarlılığı
- Şekil 4.45.** Bakteri İzolatlarına ait Glikolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Glikolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.46.** Bakteri İzolatlarına ait Fosfolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Fosfolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.47.** Bakteri İzolatlarına ait Glikolipitlerin *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Glikolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.48.** Bakteri İzolatlarına ait Fosfolipitlerin *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Fosfolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.49.** Bakteri İzolatlarına ait Aminolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Aminolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.50.** Bakteri İzolatlarına ait Fosfo-gliko-aminolipitlerin *Thermus* Cinsi Bakterilerin Fosfo-gliko-aminolipit Standartları ile Karşılaştırılması
- Şekil 4.51.** KG5'e ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi
- Şekil 4.52.** KG5'e ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi

- Şekil 4.53.** KG8'e ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi
- Şekil 4.54.** KG8'e ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi
- Şekil 4.55.** KG9'a ait Glikolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi
- Şekil 4.56.** KG9'a ait Fosfolipitlerin İki Yönlü TLC ile Analizi
- Şekil 4.57.** Fosfolipit Standartları Kullanılarak KG5'e ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a, b, c ve d)
- Şekil 4.58.** Fosfolipit Standartları Kullanılarak KG8'e ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a, b, c, d ve e)
- Şekil 4.59.** Fosfolipit Standartları Kullanılarak KG9'a ait Fosfolipit Çeşitlerinin İki Yönlü TLC ile Tespiti (a, b, c, d ve e)
- Şekil 4.60.** KG5'e ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti
- Şekil 4.61.** KG8'e ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti
- Şekil 4.62.** KG9'a ait Fosfo-glikolipit Tek Yönlü TLC ile Tespiti
- Şekil 4.63.** KG5'e ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [nC16:0])
- Şekil 4.64.** KG8'e ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [iC17:0])
- Şekil 4.65.** KG9'a ait Yağ Asitlerinin GC-MS Spektrumları (a [total FAME profili], b [iC15:0], c [iC17:0])
- Şekil 4.66.** Bakteri izolatlarının içerdiği kinonların tek yönlü TLC üzerinde UV'deki görünümü
- Şekil 4.67.** HPLC ile KG5'e ait Kinon Analizi
- Şekil 4.68.** HPLC ile KG8'e ait Kinon Analizi
- Şekil 4.69.** HPLC ile KG9'a ait Kinon Analizi
- Şekil 4.70.** KG5'e ait kinon tipinin NMR analizi
- Şekil 4.71.** KG8'e ait kinon tipinin NMR analizi
- Şekil 4.72.** KG9'a ait kinon tipinin NMR analizi
- Şekil 4.73.** KG8'e ait Kinon Tipinin LC-MS Analizi
- Şekil 4.74.** KG5'in Filogenetik Pozisyonu
- Şekil 4.75.** KG8'in Filogenetik Pozisyonu
- Şekil 4.76.** Gel Filtrasyon Kromatografisinde Elüsyon Profili
- Şekil 4.77.** DEAE-Selüloz Kromatografisinde Elüsyon Profili
- Şekil 4.78 .** Afinite Kromatografisinde Elüsyon Profili. Şekildeki paralel çizgi 0-1 M

NaCl'nin lineer bir gradiyentini göstermektedir.

Şekil 4.79. . *A.acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' ın β - Galaktozidaz Enziminin Nativ ve SDS-PAGE Elektroforezi

Şekil 4.80. FPLC Sisteminde Standart Proteinlerin Elüsyon Profili

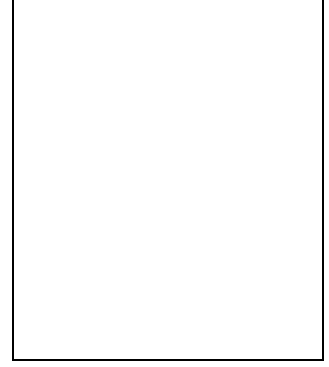
Şekil 4.81. β -Galaktozidaz Üzerine PH'nın Etkisi

Şekil 4.82. β -Galaktozidaz Üzerine Sıcaklığın Etkisi

9. RESİM LİSTESİ

Resim 3.1. Batman-Taşlıdere sıcak su kaynağı

Resim 3.2. Kös Kaplıcası



10. ÖZGEÇMİŞ

- 1979 yılında Bingöl' ün Genç ilçesinde doğdu.
- 1994 yılında Diyarbakır Ali Emiri İlköğretim Okulundan mezun oldu.
- 1997 yılında Diyarbakır Ziya Gökalp Lisesinden mezun oldu.
- 2001 yılında Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü dereceyle tamamladı.
- 2002 yılında İngiltere'nin Nottingham Üniversitesi Moleküler Toksikoloji Anabilim Dalı'nda "Mutant nematodlar üzerinde cep telefonlarının etkisi" konulu çalışmalara katıldı.
- 2002 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimine başladı.
- 2004' te "*Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*" nin β -Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar" adlı yüksek lisans tezini tamamladı.
- Eylül 2004' te Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora programına başladı.
- 2006 yılında İtalya'nın Napoli kentindeki Ulusal Araştırma Merkezi Biyomoleküler Kimya Enstitüsü (CNR) nde bakteri identifikasyonu ve enzim saflaştırılması konularında araştırmalarda bulundu.
- İyi derecede İngilizce bilmektedir.
- Evli ve bir çocuk annesidir.

YAYINLAR:

1-REYHAN GUL-GUVEN, KEMAL GUVEN, ANNARITA POLI, BARBARA NICOLAUS (2007). Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. Enzyme and Microbial Technology 40 1570–1577.

