

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ERZURUM İLİ SICAK SU KAYNAKLARINDAN  
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,  
TANILANMASI VE PROTEAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Erzurum**

**2017**

**Her hakkı saklıdır**

**T.C.**  
**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEZ ONAY FORMU**

---

**ERZURUM İLİ SICAK SU KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN  
İZOLASYONU, TANILANMASI VE PROTEAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ**

Doç Dr. Arzu GÖRMEZ danışmanlığında, Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ tarafından hazırlanan bu çalışma ...../...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ *İmza* :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

.....  
**Enstitü Müdürü**

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Erzurum İli Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve İzolatların Proteaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... / 20..

.....

Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ

## ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

### ERZURUM İLİ SICAK SU KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, TANILANMASI VE PROTEAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Arzu GÖRMEZ

Bu çalışmada Erzurum İli sıcak su kaynaklarından farklı zamanlarda (ilkbahar, kış) alınan su örneklerinden, bakteri izolasyonları yapıldı. İzole edilen bakteriler klasik (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemlerle (16S rRNA dizi analizleri) tanımlandı ve izolatlar proteaz enzim aktivitesi açısından değerlendirildi. Aynı zamanda kültür süpernatantlarından elde edilen proteaz enzimlerinin çeşitli biyoteknolojik uygulamalarla kan ve çimen lekelerine karşı çözüm gücü araştırıldı. İzolasyonlar sonucunda proteaz aktivitesine sahip *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Silanimonas*, *Thermomonas*, ve *Thauera* cinslerine ait toplam 29 izolat tür seviyesinde tanımlandı. En iyi enzim aktivitesine sahip olan iki izolatın (*Bacillus pumilus* NK14 ve *Thermomonas haemolytica* IY13) proteaz aktiviteleri tespit edildi (91,17-101,33 EU/ml). *B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 izolatlarının enzim aktivitesi için optimum değerleri (sırasıyla; sıcaklık 50°C, 55°C; pH 10, 9) tespit edilerek enzimlerin 40°C ve 50°C’de ve pH 8 ve 9’da stabilitesini 3 gün boyunca koruyabildiği belirlendi. İzolatların enzim aktivitesinin PMSF ile büyük bir oranda inhibe olduğu, EDTA, EGTA, üre ve SDS ile düştüğü; Tween 20 ve Tween 80 ile arttığı belirlendi. Yine Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>,nin aktiviteyi artırdığı görüldü. İzolatların *K<sub>m</sub>* ve *V<sub>max</sub>* değerleri sırasıyla 0,673 mg/ml-99 EU/ml; 1,262 mg/ml-125 EU/ml olarak belirlendi.

**2017, 156 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Termofilik Bakteri, İzolasyon, Tanılama, 16S rRNA dizi analizi, Proteaz Enzim Aktivitesi

## ABSTRACT

MS Thesis

### ISOLATION, IDENTIFICATION AND PROTEASE ACTIVITY DETERMINATION OF ISOLATES OF THERMOPHILIC BACTERIA FROM HOT SPRINGS IN ERZURUM PROVINCE

Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

In this study, bacterial strains were isolated from water samples taken from hot water sources in Erzurum province at different times (spring, winter). Isolated bacteria were identified by classical (morphological, physiological and biochemical tests) and molecular tests (16S rRNA sequence analyzes) and the isolates were evaluated for protease enzyme activity. At the same time, protease enzymes obtained from culture supernatants were investigated for resistance against blood and grass stains with various biotechnological applications. As a result of the study, a total of 29 isolates belonging to the genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Silanimonas*, *Thermomonas*, and *Thauera* with protease activity were determined. Protease activities of two isolates (*Bacillus pumilus* NK14 and *Thermomonas haemolytica* IY13) with the best enzyme activity were determined (91,17-101,33 EU/ml). The optimum values for the enzyme activity of *B. pumilus* NK14 and *T. haemolytica* IY13 isolates were determined (at 50°C, 55°C, pH 10, 9 respectively) at 40°C and 50°C and pH 8 and 9, respectively, for 3 days. Enzymatic activity of isolates was greatly inhibited by PMSF, decreased by EDTA, EGTA, urea and SDS; Tween 20 and Tween 80. Besides, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> and Mn<sup>+2</sup> increased enzyme activity. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of isolates were 0,673 mg/ml-99 EU/ml; 1,262 mg/ml-125 EU/ml.

**2017, 156 pages**

**Keywords:** Thermophilic Bacteria, Isolation, Identification, 16S rRNA Sequence Analysis, Protease Enzyme Activity

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım süresince, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmamın her aşamasında büyük destek gördüğüm değerli hocam, tez danışmanım sayın Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımı yaptığım Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarını kullanma imkanı veren bölümümüzün değerli öğretim üyelerine, teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince manevi yardımlarını gördüğüm değerli çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür ederim.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, cesaretlendiren ve motivasyonumu sağlayan canım babam Yavuz ÖZTAŞ'a, sıkıntılarımı paylaştığım, dert ortağım, varlığıyla huzur bulduğum biricik annem Suzan ÖZTAŞ'a, tez dönemi boyunca başını en çok ağrıttığım, hazine bildiğim eşim Nurullah GÜLMÜŞ'e ve bu süreçte benden dualarını esirgemeyen ailesine teşekkürü bir borç bilirim.

**Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ**

**2017**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Sistematik .....	1
1.2. Bakteri Sistematiği.....	3
1.2.1. Tarihçe .....	3
1.2.2. Bakterilerin Sınıflandırılması ve Tanınması .....	5
1.3. Termofilik Bakteriler .....	12
1.3.1. Termofilik Organizmaların Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları .....	15
1.3.2. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojik Önemi .....	17
1.4. Proteaz Enzimi ve Biyoteknolojik Önemi .....	20
1.5. Tezin Amacı ve Kapsamı.....	28
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	30
2.1. Termofilik Mikroorganizmaları Tanılamaya Yönelik Çalışmalar.....	30
2.2. Termofilik Mikroorganizmaların Enzim Aktivitelerine Yönelik Çalışmalar ...	35
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	47
3.1. Materyal .....	47
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	47
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....	48
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri .....	49
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler .....	50

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Yöntem .....	54
3.2.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	54
3.2.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	55
3.2.3. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	56
3.2.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	58
3.2.5. Bakteri İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi .....	60
3.2.5.a. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu .....	60
3.2.5.b. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi .....	62
3.2.5.c. Bakteri İzolatlarının ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PCR Yöntemiyle Gen Profillerinin Belirlenmesi .....	62
3.2.5.d. ERIC PCR Ürünlerinin Elektroforezi .....	63
3.2.5.e. Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	63
3.2.5.f. Proteaz Aktivitesi Gösteren Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu .....	63
3.2.5.g. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi .....	64
3.2.5.h. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerine Klonlanması .....	65
3.2.5.i. 16S rRNA Sekans Analizi .....	68
3.2.6. Termofilik Bakterilerin Proteaz Enzimi Üzerine Optimum Parametrelerin Araştırılması.....	68
3.2.6.a. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Stabilesinin Belirlenmesi.. .....	69
3.2.6.b. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi ve pH Stabilesinin Belirlenmesi .....	70
3.2.6.c. Enzim Aktivitesi Üzerine Üzerine Çeşitli İnhibitörlerin, Denaturanların ve Metal İyonlarının Etkisi .....	71
3.2.6.d. Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri .....	71
3.2.6.e. Proteaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları.....	72
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>73</b>
4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması .....	73



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	74
4.3. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	74
4.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	76
4.5. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması.....	77
4.5.1. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu.....	77
4.5.2. Bakteri İzolatlarının ERIC PCR Yöntemiyle Gen Profillerinin Belirlenmesi ve ERIC PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	77
4.5.3. Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	79
4.5.4. Proteaz Aktivitesi Gösteren Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu ve 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi	79
4.5.5. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Kompetent <i>E.coli</i> Hücrelerine Klonlanması .....	79
4.5.6. 16S rRNA Sekans Analizi Sonuçları .....	81
4.6. Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üzerine Optimum Parametrelerin Araştırılması .....	87
4.6.1. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	87
4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi .....	88
4.6.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi .....	92
4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkisi .....	96
4.6.5. Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri.....	104
4.6.6. Proteaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları .....	106
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>109</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>113</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>127</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>128</b>
<b>EK.1. 16S rRNA Sekans Analizi Sonucunda Oluşturulan Diziler.. .....</b>	<b>128</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. İzolatların ERIC PCR bant görüntüleri .....	78
Şekil 4.2. Petride mavi-beyaz koloni görüntüsü .....	80
Şekil 4.3. İzolatların filogenetik ağacı .....	83
Şekil 4.4. Petri üzerinde en iyi aktivite gösteren izolatlar .....	87
Şekil 4.5. Tirozin konsantrasyon eğrisi .....	88
Şekil 4.6. <i>B. pumilus</i> 'un sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi .....	89
Şekil 4.7. <i>T. haemolytica</i> IY13'ün sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi ....	90
Şekil 4.8. <i>B. pumilus</i> NK14'ün pH'ya bağlı proteaz aktivitesi .....	93
Şekil 4.9. <i>T. haemolytica</i> IY13'ün pH'ya bağlı proteaz aktivitesi .....	94
Şekil 4.10. Bazı inhibitör ve denaturanların <i>B. pumilus</i> NK14'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi .....	97
Şekil 4.11. Bazı inhibitör ve denaturanların <i>T. haemolytica</i> IY13'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi .....	98
Şekil 4.12. Bazı metal iyonlarının <i>B. pumilus</i> NK14'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi .....	101
Şekil 4.13. Bazı metal iyonlarının <i>T. haemolytica</i> IY13'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi .....	101
Şekil 4.14. <i>B. pumilus</i> NK14'ün Lineweaver-Burk grafiği .....	104
Şekil 4.15. <i>T. haemolytica</i> IY13'ün Lineweaver-Burk grafiği .....	105
Şekil 4.16. Proteaz enziminin kan lekesi üzerine etkisi .....	106
Şekil 4.17. Proteaz enziminin çimen lekesi üzerine etkisi .....	107
Şekil 4.18. Proteaz enziminin kan lekesi üzerine püskürtme sonuçları .....	107
Şekil 4.19. Proteaz enziminin çimen lekesi üzerine püskürtme sonuçları. ....	108

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	75
Çizelge 4.2. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri.....	76
Çizelge 4.3. İzolatların Sekans Analizlerine Göre Tanı Sonuçları ve Genbank Numaraları.....	82



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Konsantrasyon Yüzdesi
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	Deoxiribonükleik asit
ERIC	Enterobakteriyal Tekrarlı İnterjenik Korunmuş Diziler
LBA	Luria-Bertani Agar
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
°C	Santigrat Derece
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polimerase Chain Reaction
RNA	Reoxiribonükleik asit
TSA	Trypticase Soy Agar
<u>Kısaltmalar</u>	
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PMSF	Phenylmethylsülfonil flüoride
sn	Saniye

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Sistematik

Sistematik, canlıların çeşitliliğini araştırıp onları belirli özelliklerine göre gruplara ayırarak sınıflandıran bir bilim dalıdır. Sistematik; taksonomi, filogenetik sınıflandırma ve klasifikasyon olarak bilinen üç alanda aktivite gösterir. Taksonomi, organizmaların tanımını ve isimlendirilmesini yaparken; filogenetik sınıflandırma, organizmaların evrimsel olarak akrabalık ilişkilerini araştırır. Dolayısıyla taksonomi filogenetik sınıflandırmadan elde edilen bilgilere göre düzenlenir. Klasifikasyon ise elde edilen filogenetik bilgiyi çok sayıda hiyerarşik kademelerden oluşan bir sisteme yerleştirir (Açıklan ve Müştak, 2016).

Sistematik ve taksonomi pek çok kaynakta birbirinin yerine kullanılmaktadır. Oysa taksonomi, sınıflandırmanın teorik yapısını ve esaslarını ortaya koyarak organizmaların tanımını ve isimlendirmesini yapar; sistematik, organizmaların çeşit ve farklılıklarıyla birbirleri arasındaki akrabalık ilişkilerini inceleyerek türlerin belli sistemlerdeki hiyerarşik kademelerine yerleştirilmesini gerçekleştirir (Dworkin *et al.* 2006; Acar 2009).

Canlıların sınıflandırılması; gelişim düzeyine ve bilgi birikimine bağlı olarak, sürekli bir değişim içerisindedir. Canlıları sınıflandırma amacıyla yapılan ilk yaklaşımlar, eskiden sadece organizmaların özelliklerini karşılaştıran karşılaştırmalı biyolojiyle ve fosilleri inceleyen paleontoloji araçlarıyla kısıtlanmıştır. Bu yaklaşımlar, hayvan ve bitki organizmalarının gelişimlerini anlamada ve sınıflandırmada önemli bilgiler ve gelişmeler sağlamasına rağmen, mikroorganizmaları sınıflandırmada eksik kalmıştır (Madigan *et al.* 2017). Mikroorganizmaların keşfiyle canlıların sınıflandırılmasında farklı yaklaşımlar gündeme gelmiş ve tüm canlılarda ortak olan filogenetik ilişkiler ön plana çıkmıştır.

Tüm hücrelerin evrimsel tarihlerini aydınlatan ilk çalışmayı 1866'da Ernst Haeckel yayınlamıştır. Haeckel, diğer yaşam formlarının atasının tek hücreli organizmalar olduğunu savunmuş ve bunları Monera olarak adlandırmıştır. Daha sonra Robert Whittaker 1967'de sınıflandırma sistemini beş alemli şemayla sınırlanmıştır. Whittaker'ın öne sürdüğü sınıflandırma sistemi fungusları ayrı bir soy olarak elde etmiş olmasına rağmen yine pek çok mikroorganizmanın evrimsel ilişkisini çözmede başarısız olmuştur. Özetle Haeckel'dan sonra mikrobiyal filogeninin ilerlemesinin çok az olduğu söylenebilmektedir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt 2002; Hugenholtz 2002). Bilimsel ve teknolojik gelişmelerin artmasıyla beraber sınıflandırma kriterleri giderek değişmeye ve gelişmeye devam etmiştir. DNA yapısının aydınlatılmasının akabinde, Carl Woese 1970'lerde, rRNA dizilerinin ve genlerinin, canlılar arasındaki ilişkileri belirlemede filogenetik analizler için kullanılabileceklerini fark etmiştir. Çünkü rRNA genleri;

1. Evrensel açıdan oldukça yaygındırlar,
2. İşlevsel bakımdan sabittirler,
3. Oldukça korunmuş genler olup yavaş değişim geçirirler.

4. Organizmalar arasındaki ilişkileri detaylı bir şekilde verebilecek kadar yeterli uzunluktadırlar (Madigan *et al.* 2017).

Woese, ribozomal RNA ve diğer RNA ve protein dizilerinin nükleotit sırasını kullanarak canlıların sınıflandırılabilceğini ancak yeni bir sınıflandırma kategorisinin gerekli olduğunu savunmuş, bu kategorinin tüm alanları kapsadığını ve adının da "domain" olması gerektiğini savunmuştur. Böylece artık canlılar rRNA analizlerine göre filogenetik olarak: 3 domainde sınıflandırılmışlardır ve bu domainler de; Archaea (arkeanlar, antik bakteriler), Bacteria (öbakteriler, gerçek bakteriler) ve Eukarya (Ökaryotlar)'dır. Böylece Woese, rRNA gen dizi analizini; tüm hücreler arasındaki ilişkileri ortaya çıkararak, mikroorganizmaların da sınıflandırılması için kullanılabilecek ilk etkili yol olarak göstermiştir (Woese *et al.* 1990; Madigan *et al.* 2017).

Carl Woese tarafından belirlenen ve günümüze kadar devam eden filogenetik sınıflandırmada sadece mikroskopla tespiti yapılabilen mikroorganizmalar, Eukarya domaini dışında kalan tüm organizmaları kapsamaktadır. Gelişmiş yapıdaki canlıların sadece morfolojilerine göre sınıflandırması yapılabilmekteyken mikroorganizmaların morfolojilerine göre sınıflandırılması doğru ve güvenilir bir tanılama için imkansız olacaktır. Bu yüzden mikroorganizmaların özellikle bakterilerin sınıflandırılabilmesi için hücrelerine, hücre içi yapılarına, ürettikleri/tükettikleri maddelere, yaşam koşullarına yönelik geniş çapta bir tespite bulunmak gerekmektedir (Acar 2009).

## 1.2. Bakteri Sistematığı

### 1.2.1. Tarihçe

Mikrobiyoloji, ortaya çıktığı tarihten itibaren mikroskopların gelişimine de paralel olarak büyük bir hızla ilerlemiş ve modern biyolojide farklı yeni alanların oluşmasına neden olmuştur. Mikroskopla beraber daha önceleri çıplak gözle görülmeyen canlıların varlığı ispat edilmiştir. Bir matematikçi ve doğa tarihçisi olan Robert Hooke (1635-1703), mikroorganizmaların ilk olarak betimlemesini yaptığı *Micrographia* (1665) isimli kitabında gözlemlerini dile getirmiştir. Bakterileri hücrelerini ilk kez biber-su inflüzyonlarını incelerken gözlemleyen isim ise amatör bir mikroskop kullanıcısı olan Antony van Leeuwenhoek olmuştur (1632-1723). Leeuwenhoek, çeşitli doğal maddeleri mikroorganizmalar açısından incelemek amacıyla bir tek lens içeren son derece basit mikroskoplar yapmış ve odaklama ile dikkatli manipülasyon yaparak bakterileri görebilmiştir. 1676'da gözlemlerini Londra Kraliyet Topluluğuna bildirmiş ve rapor etmiştir. Leeuwenhoek bu canlıları "küçük hayvancıklar" olarak tanımlamıştır (Trüper 2005; Madigan *et al.* 2017).

Mikroorganizmaları mikroskopta ilk kez gözlemleyen, Van Leeuwenhoek'un akabinde bitki bilimcisi olan Carl Von Linne (1707-1778) bakterilere cins ve tür adı vererek onları ilk kez binominal sistem içerisinde tanılamış ve bakterileri kendi şekillendirdiği bir sınıflandırmaya tabi tutmuştur. Linne'den sonra Otto Frederich Müller (1730-1784) isimli bir araştırmacı, mikroorganizmaları monas (yuvarlak, oval) ve vibrio (uzun yapılı) adını verdiği iki temel cins olarak tanılamıştır (Matpan 2007).

Mikroorganizmaların çalışılması adına deneysel araçların kıtlığı, imkanların elverişsizliği nedeniyle bakterilerin yapılarını ve doğalarını anlamaya dayanan çalışmalarda birkaç yıl boyunca ilerleme sağlanamamıştır. 19. yüzyılda mikrobiyoloji bilimi yeniden uyanmış ve bu uyanışa önemli katkılarda bulunan isimlerden biri de Ferdinand Cohn (1828-1898) olmuştur. Cohn, yapmış olduğu sınıflandırmada bakterilerin morfolojik özelliklerini esas almıştır. Endospor oluşturan bakteriler üzerine yoğun çalışmalar yapmış ve ısıya karşı gösterdikleri dirençleriyle ilgilendiği bu bakterileri de sınıflandırmasına ilave etmiştir (Madigan *et al.* 2017).

1897'de Migula isimli bir bilim adamı, yaptığı sınıflandırmasında; mikroorganizmaların sadece morfolojilerine göre değil, aynı anda kolonilerinin rengi ve fizyolojik karakterlerinin de dikkate alınması gerektiğini öne srmuş ve bu düşüncelerini savunan bir sistem üzerine yoğunlaşmıştır. Bu alışmasını "*System of the Bacteria*" isimli bir eserle yayımlamıştır. 1899 ve 1901 yılları arasında Frederick Dixon Chester (1861-1943) isimli bir bilim adamı da, yaptıklarını "*Manual of Determinative Bacteriology*" adlı bir eserle yayımlamış ve bu sayede Amerikalı biyologları "*Society of American Bacteriologists*" atısı altında toplamayı başarmıştır. 1917 yılında Robert Earle Buchanan (1883-1973) ise ilk defa modern anlamda bir sınıflandırma yapmıştır. 1923'de onunla beraber pek çok mikrobiyoloğun yardımıyla Society of American Bacteriologists tarafından "*Manual of Determinative Bacteriology*" kitabı yayımlanmıştır. David Hendricks Bergey (1860-1937) kitabın hazırlanmasında önemli bir isimdir. Ayrıca Bergey, ilerleyen zamanlarda bu çalışmayı genişletmiş ve 1984-1986 yılları arasında "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" adlı 4 ciltten oluşan bir ansiklopedi yayımlamıştır (Cohn 1875; Arda 2000; Fritze 2004; Ramagoma 2006). Bu ansiklopedi bilinen tüm prokaryotlara ait bilgiler içermekte ve mikrobiyologlar arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. 1923'den bu yana mikrobiyolog camiasına hizmet vermektedir (Açıkalin ve Müştak 2016; Madigan *et al.* 2017).



## 1.2.2. Bakterilerin Sınıflandırılması ve Tanınması

Mikroorganizmalar için sürekli ve geçerliliği olan bir sınıflandırma yapmak çoğu kez mümkün olamamıştır. Farklı kriterlere sahip olan yeni mikroorganizmaların keşfi, bilimsel çalışmaların ilerlemesiyle beraber ortaya yeni metotların çıkması neticesinde yapılan sistematipler sürekli değişmiş ve onların yerine yeni gelişmelere uygun olanları getirilmiştir (Fritze 2004; Acar 2009; Ramasamy *et al.* 2014; Açıklık ve Müştak 2016).

Bakterilerin tanınması; kaynağından elde edilmiş bir bakterinin cins hatta tür seviyesinde belirlenmesinin yapılması anlamına gelmektedir (Piriççioğlu 2010). Bakterilerin tanınmasında klasik ve moleküler yöntemler olmak üzere iki temel yöntem kullanılmaktadır (Görmez 2011; Ramasamy *et al.* 2014).

### 1.2.2.1. Klasik yöntemler

Bakterilerin tanınması, modern moleküler biyolojide kullanılan teknikler geliştirilinceye kadar klasik yöntemlerle gerçekleştirilmekteydi. Bu yöntemler, bakterilere ait morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin belirlenmesini hedeflemektedir (Görmez 2011).

**Morfolojik Özellikler:** Bakteriler çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olduklarından bakterilerin morfolojik özellikleri mikroskop yardımıyla tespit edilmektedir. Mikroskop altında inceleme yapmak üzere uygun besi ortamında geliştirilen bakterilerden hazırlanan preparatlar direkt ya da özel boyalarla boyanarak incelenirler. Böylece bakterilerin, morfolojik özellikleri olarak bilinen hücresel şekilleri, koloni morfolojisi ve rengi ile hücrelerin hareketli olup olmadığı belirlenebilmektedir.

**Biyokimyasal Özellikleri:** Bir bakterinin biyokimyasal karakterlerini belirlemenin önemi büyüktür. Çünkü bu karakterler bazı bakterilerde türe özgü dahi olabilmektedir. Bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla çok çeşitli testler uygulanmaktadır. Bunlar arasında; kazein, nişasta, lipaz, katalaz, oksidaz, jelatin, üre, fosfataz, nitrit-nirat redüksiyonu, karbonhidrat kullanımı gibi testler sayılabilmektedir (Holt *et al.* 1994; Arda 2000; Alexander and Strete 2001). Bu testlerin bazıları şöyledir;

**a. Katalaz Testi:** katalaz enziminin bakteri izolatlarınca sentezlenip sentezlenmediğinin tespiti maksadıyla yapılmaktadır. Bazı bakteriler, oksijenli solunum sonucunda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretmektedir. Ancak  $H_2O_2$ 'nin besiyerlerinde toksik etki oluşturmasıyla beraber bu durumdan olumsuz olarak etkilenmektedirler. Bazı bakterilerde (aerobik ve fakültatif bakteriler) bu olumsuz durumdan görülecek zararı önlemek adına katalaz enzimi bulunmaktadır. Katalaz, bir hemoproteindir ve her molekülde prostetik grubunda 3 değerli, 4 atomlu demir bulunmaktadır ve  $H_2O_2$ 'yi, su ( $H_2O$ ) ve oksijene ( $O_2$ ) ayrıştırarak toksik etkisini ortadan kaldırmaktadır (Klement *et al.* 1990; Alexander and Strete 2001).

**b. Oksidaz Testi:** bakterilerin, sitokrom c adı verilen bir proteine sahip olup olmadıklarını saptamak amacıyla yapılmaktadır. Bilindiği üzere oksijenli hücre solunumunun son basamağında elektron taşıma zinciri reaksiyon dizisi görev yapmaktadır. Sitokrom c (oksidaz c) adı verilen bir protein, solunum işleminde rol oynamakta ve elektron transfer sistemindeki maddeleri birbirine indirgeyerek ATP'nin oluşmasına neden olmaktadır. (Alexander and Strete 2001; Acar 2009).

**c. Amilaz Testi:** bakterilerin amilaz enzimi üretilip üretilmediğini saptamak amacıyla yapılmaktadır. Nişasta molekülü, birçok glikozun biraraya gelerek tekrarından oluşmuş bir polisakkarittir. Amilaz enzimi bu polisakkarit molekülünü hidroliz eden enzim olup her bakteride mevcut değildir. Bakteriler amilaz enzimi ihtiva ediyorsa nişasta içerikli besiyerlerinde yaşayabilirler; ancak enzime sahip değilseler, bu ortamlarda gelişemezler. Bu farklılıktan yararlanılarak bakterilerin amilaz enzimi üretilip üretilmediği belirlenmekte ve bakterilerin tanısı yapılmaktadır (Alexander and Strete 2001; Acar 2009).

**d. Proteaz Testi:** kazein adı verilen bir süt proteininin bakteriler tarafından hidrolizinin saptanması amacıyla yapılmaktadır. Bu hidrolizi gerçekleştiren enzim proteaz enzimidir. Bakteriler eğer bu enzime sahipseler süt proteini içeren besi yerlerinde geliştirilebilmektedirler (Alexander and Strete 2001; Acar 2009).

**e. Lipaz Testi:** bakterilerin yağları parçalayan enzim olan lipaz enzimini sentezleyip sentezlemediğini belirlemek amacıyla yapılır. Eğer bakteri lipaz aktivitesi gösteriyorsa, yağ bileşeni içeren besi yerinde gelişebilmektedir (Tarakoğlu 2016).

**Fizyolojik zellikleri;** Her bakteri cinsinin kendine ait fizyolojik özellikleri mevcut olmakla beraber bu özellikleri paylaşan bakteriler genelde aynı cinsin yesi olmaktadır. Fizyolojik zellikler; bakteriler için uygun olan gelişim sıcaklığı, inkübe edilme süresi, oksijene ihtiyaç durumu ve besiyerinin bileşimine gösterdikleri ilgi sayılabilmektedir (Dülger 2003).

Klasik yöntemlerle fazla iş gücü ihtiyaı oluşmakta, zaman almakta ve bu yöntemle bakteriler genelde cins seviyesinde tanılanmaktadırlar. Bu yöntemler, daima alternatif tanılama yöntemlerine gereksinim duymakta ve bakteriler arasındaki farkların tespitinde yetersiz olmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, klasik yöntemlerle yapılan tanılamanın moleküler yöntemlerle de desteklenmesi gerekmektedir (Folmsbee *et al.* 2006; Görmez 2011).

#### **1.2.2.2. Moleküler Yöntemler**

Bakterileri tanılama aşamasında onların moleküler seviyedeki içeriklerini temel alan yöntemler moleküler yöntemler olarak bildirilmektedir. Bu yöntemlerde bakterilerin genetik materyalleri (DNA ve RNA), proteinleri karbonhidratları ve lipitleri çalışılmaktadır. Bu materyallerin kullanımı, çeşidi ve farklılıkları tespit edilerek bakterilerin tanılamaları yapılmaktadır (Manceau and Horvais 1997; Gonzalez and Saiz-Jimenez 2005; Görmez 2011). Bu yöntemlerden bazıları şunlardır;

**Serolojik Yöntemler;** Bu tanı yönteminde uygulanan teknikler; Immunofluorescence, Radioimmunoassay, Aglütinasyon, Enzim-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Dot Immunobinding Assay, Immuno Blot vs. Bu tanı yöntemi antijen-antikor ilişkisini içeren testler sayesinde bakterilerdeki farklılıkları belirlemekte ve onları tanılamaktadır. Bakterilerin antijen farklılıkları bu yöntemlerle belirlenmektedir. (Görmez 2011).

**API ve Biolog Sistemi;** bakteriler arasındaki metabolizmasal farklılıkları dikkate alarak onları tanılamak amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Bakteriler karbon kaynağı olarak farklı yapılar kullanmakta ve buna bağlı olarak mevcut enzim içerikleri de değişiklik göstermektedir. API sisteminde ortalama 20, Biolog sisteminde ise 95 değişik karbon kaynağını hedef alıp tanılayan bir mikropate sistemleri kullanılmaktadır. API, özellikle gıda patojenlerinin tespitinde ve tanısında kullanılan bir yöntemdir.

Biolog yöntemi kinetik okuyucu, bilgisayar sistemi ve turbidimetre olmakla beraber 3 elemandan meydana gelmektedir (Kingler *et al.* 1992). Bu sistem uygulanmadan önce bakteriler gruplandırılmaya (Gram negatif-pozitif, aerob-anaerob) tabi tutulur ve onlar için ayırt edici karbon kaynaklarını üzerinde bulunduran plâtelere ile tespitleri yapılmaktadır (negatif kontrol için su, indikatör olarak tetrazolium violet kullanılmaktadır) (Bernards *et al.* 1995; Garland 1996). En sonunda ortaya çıkan metabolik pathway, bilgisayarlar sayesinde değerlendirilir ve bakterinin cins hatta tür ve tür altı seviyesinde dahi tanısı yapılabilmektedir (Şahin 2003; Adıgüzel 2006; Görmez 2011).

**Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS);** Bakterilerde mevcut olan yağ asitlerini belirleyerek bakterileri birbirinden ayıran ve tanılayan bir yöntemdir. Yine bilgisayar destekli bir yöntem olan MIS metodunda bilgisayar ünitesi, kütüphane ve yazıcı sistemi, gaz kromatografisi ile hidrojen, azot ve havadan oluşan gaz tankları bulunmaktadır (Lelliott and Stead 1987).

Hidrokarbon yapısındaki yağ asitleri bakterilerde, değişik formlarda (glikolipid, lipopolisakkarit ve fosfolipid) bulunmaktadır. Yağ asitleri farklı sayıda karbon atomları içermekle beraber bu karbon atomlarının çift/tek bağ durumu, sayısı hücreden hücreye değişmekte hatta bu farklılıklara bağlı olarak değişik isimler almaktadırlar. MIS metodu da bu farklılıkları tespit ederek bakterileri tanılamaktadır (Adıgüzel 2006; Görmez 2011).

**DNA Baz Kompozisyonu:** DNA'daki mevcut olan genetiksel bilgi, nükleotit bazları (adenine, guanin, timin, sitozin) sayesinde şifrelenmektedir. DNA çift zincirli yapıdadır ve G/C ve A/T oranı genelde sabittir. Ancak farklı organizmalar arasında bu oran,  $(G+C) / (A+T)$ , değişkenlik gösterebilmektedir (Johnson 1985). DNA molekülündeki bazların oranı G+C baz çifti olarak belirtilir ve bu baz oranları G+C toplamının yüzdesi bulunarak hesaplanır;

$$\% G+C : (G+C) / (A+T+G+C) \times 100$$

Genellikle bakterilerin %G+C miktarı %24-76 olmakla beraber bu oran, cins seviyesinde daha belirginleştirici olmaktadır. Yani aynı oranda G+C içeriğinde olan iki bakteri, aynı türden olabilir ya da olmayabilir ancak G+C miktarları % 5'ten daha fazla farklılık gösteriyorsa kesin olarak bu iki bakterinin aynı türden olmadıkları savunulabilmektedir. Yine bu bağlamda, G+C oranları %10'dan daha da fazla farklılık sergileyen bakterilerin aynı cinse ait olmadıkları da belirlenmiştir (Rossello-Mora and Aman 2001).

Bakteri sınıflandırmasında bu yöntemi kullanan ilk bilim adamı, fenotip bakımından birbirlerine benzeyen ve genotip bakımından farklı olan izolatları birbirlerinden ayırt etmek için uğraşan, Goodfellow ve O'Donnell (1993)'dir. Aynı zamanda bu yöntem, prokaryotların sınıflandırılmasında kullanılan ilk yöntemdir. Bakterileri sınıflandırmada genel anlamda sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan G+C içeriğini belirlemek adına farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan yaygın olanları; yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve denatürasyon yöntemi'dir (Gonzalez and Saiz-Jimenez 2002).

**Genomik Parmak İzi Analizi Yöntemi:** Prokaryot hücrelerin genomlarında fonksiyonu tam olarak netleşmemiş ancak muhtemelen hücre bölünmelerinde görevli olduğu varsayılan pekçok tekrarlı (repetitive) DNA dizisinin bulunduğu bilinmektedir. Bu dizilerde bakterilerin sınıflandırılmasında ve tanısında kullanılmaktadır. Bunlara genel olarak Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) genomik parmak izi yöntemi denilmektedir. Bu dizilerin kromozomlar üzerindeki yerleri organizmanın türüne göre değişkenlik göstermekte ve REP (ekstragenik tekrarlı polindromik diziler), ERIC (enterobakteriyal tekrarlı intergenik korunmuş diziler), BOX, GTG<sub>5</sub> elementlerinden oluşmaktadır. Yöntemlerin hepsine REP-PCR adı verilmektedir. Bu korunmuş bölgelerde bulunan dizilere spesifik primerlerle gerçekleştirilecek bir PCR analizi neticesinde farklı bantlar elde edilmekte ve bu bantlar arasındaki farklar tespit edilerek bakterilerin akrabalık seviyeleri ortaya çıkarılmaktadır (Smith *et al.* 2001; Acar 2009; Görmez 2011; Baltacı 2015).

**RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction):** 8-10 nükleotitten meydana gelen bir primer kullanılarak yapılan, nükleotit dizilimi rasgele belirlenerek çoğaltılan DNA-polimeraz zincir reaksiyonu anlamına gelen bir tekniktir. Bu yöntem genellikle DNA yapısında mevcut bulunan polimorfizmleri belirlemekte ve bunu yaparken de organizmalar arasındaki farklılığı da ortaya koyarak onların sınıflandırılmasına imkan tanımaktadır. DNA nükleotit dizilerindeki farklılıklar, primerlerin bağlanma bölgesinin de farklı olmasına neden olmakta ve böylece PCR sonucunda farklı ve organizmaya spesifik bantların oluşmasına yol açmaktadır. Bu bantlar yorumlanarak bakterilerin tanılaması yapılmaktadır (Görmez 2011; Baltacı 2015).

**RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi):** Restriksiyon enzimleri (RE) DNA'daki dizileri spesifik olarak tanıyan ve bu dizileri kesen enzimlerdir (Stackebrandt 2006). Tanısı yapılması istenen organizmaya ait DNA bölgelerinin PCR ile çoğaltılması sonucunda restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve akabinde agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmesi ile oluşan bantların birbirleriyle mukayesesi esasına dayanmaktadır (Stead *et al.* 1998; Görmez 2011).

**AFLP Analizi:** Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi anlamına gelmektedir. Genellikle DNA marker tekniği olarak bilinmekte olan bu metot, esasında RFLP ve RAPD tekniklerinin harmanlanmasından oluşmaktadır. PCR temeline dayanmakta ve bakteri sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Stead *et al.* 1998; Görmez 2011).

**Ribozomal RNA Analizi (rRNA):** Klasik yöntemlerin zaman alıcılığı, gereken iş gücü ve laboratuvar malzemesi yetersizliği ile finansal değerlerin kısıtlılığından dolayı moleküler analizlerle alternatif metotlar kullanılmaktadır. rRNA ya da rDNA analizini sağlayan yöntemler, bakteri sistematığında yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA dizileri değişmez, evrensel, dış şartlarından kolayca etkilenmeyen, büyük miktarda genetik bilgiyi barındıran, bütün organizmalarda mevcut olan ve protein sentezinin elzem kaynağı olan bir moleküldür. Protein sentezi tüm canlılarda gerçekleştirilmek zorundadır ve bu nedenle oldukça önemlidir. rRNA'yı kodlayan diziler de bu nedenle fonksiyonel ve yapısal olarak yüksek derecede korunurlar. Bakteri sistematığında kullanılan bu diziler ribozomun küçük alt biriminde kodlanmaktadır. Prokaryotların ribozom yapısı da ökaryotlarınki gibi küçük ve büyük alt ünite olarak belirtilen iki birimden oluşmaktadır. Birimlerin büyüklüğü prokaryotlarda ökaryotlardan farklıdır ve büyük alt birim (50S); 23S ve 5S birimlerinden, küçük alt birim (30S) ise 16S biriminden oluşmaktadır. Bu birimler de yoğun olarak korunmuş rRNA gen bölgelerinden meydana gelmektedir. Bu genler ve arası bölgelerin PCR ile analizi sonucunda bu bölgelerin uzunluğu ve nükleotid sırası, bakterileri sınıflandırmasında kullanılmaktadır (Nguimbi *et al.* 2003). Bu bölgelerin baz dizi analizi yapılmakta ve gen bankasındaki bakterilerle kıyaslanarak % 97 ve yukarısında benzerlik gösteren organizmalar aynı tür olarak değerlendirilmektedir (Ash *et al.* 1991; De Clerck and De Vos, 2002; Xu and Cote 2003; Wang *et al.* 2009; Haque and Russell 2005; Lopez and Alippi 2007; Rudi *et al.* 2007).

**DNA-DNA Hibridizasyonu:** DNA-DNA hibridizasyonu, nükleik asit dizileri içerisindeki benzerliği belirleyen ve geçmişten bugüne kadar bu amaçla sıklıkla kullanılan altın standart haline gelmiş bir yöntemdir (Rossello-Mora and Aman 2001; Zeigler 2003). DNA denatüre edildiğinde çift zincirli yapısı bozulur ve tekrar uygun koşullar sağlandığında doğal çift zincirli yapısını oluşturmak adına yeniden

birleşebilmektedir. Uygun koşullar altında; birbirinden farklı olan bakterilerin DNA'ları, nükleotit sıralarındaki benzerliklerine göre yeniden birleşirler ve genellikle bu birleşme oranı da % benzerlik olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin adına DNA-DNA benzerliği denilmektedir. DNA-DNA dizi benzerliğini belirlemek adına temel prensibi aynı olan pek çok metot bulunmaktadır. Yöntemlerin temel prensibi ise şudur; birbirinden farklı olan ve sınıflandırmaya tabi tutulacak iki bakterinin DNA'ları birbirine karıştırılır ve denaturasyon ile tek zincirli forma getirilir. Uygun koşullar yeniden sağlanarak DNA tek zincirlerinin yeniden birleşmesi sağlanır heterodubleks DNA'lar (hibrit moleküller) oluşturulur. Hibrit moleküllerin sayısı, iki farklı DNA arasındaki benzerlik oranına bağlıdır. Yani benzerlik oranı ne kadar yüksek ise, DNA'ların baz sıraları da o derece yüksek benzerliktedir (Gonzalez and Saiz-Jimenez 2005).

#### **Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi (MLST-Multilocus Sequence Typing):**

MLST analizi, çoklu lokus dizilim tiplendirmesi anlamına gelmektedir. Hücrelerde her durumda ve şartlarda ifadesi hiçbir zaman değişmeyen ve her zaman ifade edilen 7 house-keeping gen ve bu genlerin parçalarının kullanılmasıyla bakterilerin tanımlanmasının gerçekleştirildiği yöntemdir. Gen parçalarının, otomatize edilmiş bir sistem ile çift taraflı olarak dizi analizi yapılır ve house-keeping genlerin herbiri için farklılıklar gösteren bakterilere ait dizilimler belirlenir ve birbirlerinden ayırt edilerek karakterizasyonları yapılır (Çetinkaya 2011).

### **1.3. Termofilik Bakteriler**

Mikrobiyal hayat, esasında dünyadaki diğer organizmaların varlığından milyonlarca yıl öncesinde oluşmuştur. Teknolojik ilerlemelerin kısıtlılığı ve bu organizmaların gözle görülemesinin imkansız olmasından dolayı çalışma alanları sınırlı kalmıştır. Oysa mikroorganizmalar; kutup bölgelerinden yanardağ bacalarına, asitli ortamlardan alkali ortamlara, hatta tuzlu sulardan sodalı göllere kadar geniş bir habitatta hayat bulmaktadırlar (Madigan *et al.* 2000; Kıvanç 2008). Bu bağlamda günümüzde pek çok sıcak su kaynağından, hidrotermal kuyulardan ve solfarik alanlardan mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmektedir.



Mikroorganizmaların aktivitelerini gerçekleştirmelerinde ve hayatlarını devam ettirebilmelerinde pek çok faktörün etkisi vardır. Sıcaklık bu faktörlerin en önemlilerinden biridir. Mikroorganizmaların optimum sıcaklık değerleri gelişimleri için oldukça önemlidir. Optimum sıcaklık değerleri mikroorganizmaların ihtiyacına göre değişkenlik göstermektedir. Düşük sıcaklıklarda yaşayabilenleri olduğu gibi gelişimleri için yüksek sıcaklık değerlerine ihtiyaç duyan mikroorganizmalar da mevcuttur. Yüksek sıcaklık değerleri, farklı organizmalarca değişik şekillerde tolere edilebilmektedir. Gelişimleri için yüksek sıcaklık değerlerine ihtiyaç duyan mikroorganizmalara termofiller denilmektedir ve bu organizmalar, diğer canlıların yaşayamadığı ortamlara dahi adapte olmuş durumdadırlar (Williams *et al.* 1996; Piriçcioğlu 2010; Müller *et al.* 2014).

Bakteriler, yaşayabildikleri uygun sıcaklıklara göre sınıflandırıldığında üç ana grup altında toplanmaktadırlar; psikrofiller, mezofiller ve termofiller. Psikrofiller 15°C'den düşük sıcaklıklarda yaşayabilen, mezofiller 15-45°C, termofiller ise genel olarak 45 °C'nin üzerinde yaşayabilen bakterileri kapsamaktadır. Termofilikler de yüksek derecedeki sıcaklığa farklı şekillerde uyum sağlamış olup 45-65 °C'de gelişimlerini sürdürenler ılımlı termofiller, 55-85 °C'de optimum gelişim gösterenler ekstremtermofiller, 75-113°C'de gelişebilenler de hipertermofiller olarak adlandırılmaktadırlar (Baker *et al.* 2001; Madigan *et al.* 2017). Sıcaklık değerinin 50-60 °C aralıklarında gelişimlerini sürdürebilen ökaryotik organizmalar (*Streptomyces*, *Cyanobacteria* vs.) da mevcuttur. 60-80°C sıcaklık aralığında optimum olarak gelişebilen *Aquifex*, *Thermus*, *Thermotoga*, *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait çeşitli mikroorganizmalar da ekstrem termofillerdir. Ancak genel olarak 80-110°C sıcaklıkta yaşamlarını sürdürebilen hipertermofiller organizmalar arkelerdir (Antranikian *et al.* 2005; Pikuta and Hoover 2007).

Günümüzde yapılan çalışmalar neticesinde, eksteremofillerin çok yüksek sıcaklık değerlerine sahip volkanlardan, çok düşük sıcaklıklara sahip kutuplara hatta aynı şekilde yüksek pH değerlerinden (pH 0-3) düşük pH değerlerine (pH 10-12) kadar olan alanlarda yaşayabildikleri rapor edilmiştir. Bu bağlamda çeşitli sıcak su kaynaklarından, hidro-kuyulardan ve solfatarik alanlardan termofil bakterilerin

izolasyonları yapılabilmektedir. Termofilik organizmaların en çok çalışıldığı ve izole edildiği yaşam alanları sıcak su kaynakları olmaktadır. Sıcak su kaynaklarındaki kaynaktan çıkan su kademeli olarak soğumakta ve bir sıcaklık gradiyenti oluşturmaktadır. Bu gradiyent boyunca farklı sıcaklık aralıklarında üreyen farklı türlere sahip mikroorganizmalar saptanmıştır. Buldukları bölge, iklim ve yer altında denk geldiği tabakalarının çeşidine göre nötral pH'lı su kaynakları, asidik ve kükürtlü kaynaklar, demirce zengin su kaynakları gibi farklı özellikte su kaynakları bulunmaktadır.

Termal sular, yer altı tabakasından ısınarak yüzeye çıkmakta ve sıcaklıkları genel olarak 50-130 °C arasında değişmektedir. Bu sular, yeryüzüne sıcak halde çıkmakta ve geçtikleri alanlardaki bazı mineralleri de çözerek suyun içeriğini mineral maddelerce zengin duruma getirmektedirler. Bu nedenle, bu suların çoğunun, hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce zengin oldukları bilinmektedir. Termal suların tam içerikleri, suyun yeryüzüne çıkması sırasında içinden geçtiği kayalara ve suyun sıcaklığına göre değişmektedir. Bu sularda yaşayan termofiller suyun özelliğine adapte olmakta ve yaşamlarını devam ettirebilmek için çeşitli biyokimyasal aktivitelere sahip olabilmektedirler. Termofilik canlılar yaşamlarını devam ettirebilmek için sıcak ortamlara ihtiyaç duymaktadır ve ortamın sıcaklığı normal değerlere ulaştıkça yaşamsal faaliyetleri durma noktasına gelebilmektedir.

İlk olarak, termofilik bakteriler 1879 yılında Miquel tarafından; çöplerden, pisliklerden, topraktan, dışkı, kanalizasyon ve nehir çamurlarından elde edilmiştir. İzole edilen bu termofilik bakteriler, 72°C'de geliştirilmiştir (Miquel 1888). Daha sonra 1982'de ise, Stetter suyun kaynama noktasına yakın bir sıcaklığa sahip volkanik alanlardan termofilik bakteriler izole etmiştir (Dülger 2003; Adıgüzel 2006; Alpan 2008).

Karakterize edilen ilk termofilik bakteri de oldukça önemli biyoteknolojik değeri olan *Thermus aquaticus* 'tur. Bu bakteri oldukça önemli olup bu bakteriden elde edilen enzim, PCR reaksiyonlarında kullanılan DNA polimerazın kaynağını oluşturmaktadır. Yüksek sıcaklık değerlerinde bozulmadan kalan termofilik DNA polimerazlar,

hidrojen bağlarının kırılmasıyla tek zincirli hale gelen DNA'yı kalıp olarak kullanarak polimerizasyon zincir reaksiyonlarını tamamlarlar (Aguilar 1996; Madigan *et al.* 2017).

### 1.3.1. Termofilik Organizmaların Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları

Termofilik bakteriler diğer bakterilerin hayatlarını sürdüremedikleri yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen organizmalardır. Termofilik bakterilerin; hücre zarları, enzimleri, nükleik asitleri, proteinleri ve bir takım hücre yapıları yaşayabildikleri yüksek sıcaklıklara dayanabilir yapıdadırlar. Yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmeleri için DNA, protein ve hücre membran yapılarında farklı mekanizmalar geliştirerek bir takım yapısal değişikliklere uğramışlardır.

Bazı termofilik mikroorganizmalarda endospor adı verilen yapılar oluştururlar ve ekstrem çevre koşullarından etkilenmeden canlılıklarını sürdürürler. Endospor formundaki bir bakteri metabolizmasını yavaşlatmış ve DNA'sını bu duruma adapte etmiştir. Yüksek sıcaklıklarda pek çok bakteri, özellikle *Bacillus* cinsi, endospor formunda uzun süre canlı kalabilmektedir.

Termofilik bakterilerde, DNA'larında pozitif süpersarmal oluşturan ve DNA'nın erime noktasını yükselterek, bakteriyi ısı etkisiyle oluşacak bir denatürasyona karşı daha dirençli hale getiren ters DNA giraz adı verilen bir enzim bulunmaktadır (Lopez, 1999; Kumar ve Nussinov, 2001; Haki ve Rakshit, 2003). Ayrıca DNA'ya bağlanan proteinler, DNA'nın yüksek sıcaklık değerlerinde çift zincirli formunda kalmasına neden olarak onu ısı kaynaklı denaturasyonlardan korumaktadırlar (Lopez *et al.* 1999).

Termofilik bakterilerin hücre zarlarında doymuş yağ asitleri bulunmaktadır. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir yapı kazandırır ve bu durum da termofilik mikroorganizmaya sıcaklık karşısında direnç kazandırır. Bununla beraber termofilik organizmalar, bir takım hidrofobik etkileşimler ve elektrostatik disülfid köprüleri ile yüksek sıcaklık değerlerine dayanabilmektedirler (Fujiwara 2002). Hidrojen bağları, moleküler arası etkileşimlerden biridir ve sayıca fazlalığı biyolojik yapılara kararlılık kazandırmaktadır. Tuz köprüsü ya da iyon çifti adı verilen ve proteinin yapısındaki iki

zıt yüklü iyonun etkileşimine dayanan yapılar termofillerde görülen bir diğer adaptasyon mekanizmasıdır (Hakamada *et al.* 2001). Daha önceden yapılan çalışmalarda (Tanner *et al.* 1996; Scandurra *et al.* 1998), bu iyon çifti yapılarının sayıca üstünlüğünün sıcaklığa karşı protein yapılarını dayanıklı bir hale getirdiği rapor edilmiştir. Tuz köprüleri sayısındaki artışın yanı sıra termofilik bakteri proteinlerinde histidin, glutamin, asparagin, lizin ve argininin gibi yüklü aminoasit içeriğinde artış görülürken, denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma görülür (Haney *et al.* 1999).

Yine termofillerin kararlı yapıda olmalarını sağlayan bir başka etken disülfit bağlarıdır. Bu bağlar, birbirine paralel olan iki polipeptid zinciri ikincil yapı halindeyken zincirlerin birbirine yakın olduğu kısımlardaki sistein aminoasitlerinin sülfidril gruplarının arasında oluşan kovalent bağlardır ve proteinin düzenlenmesinde, yapısını korumasında görevli olan önemli yapılardır. Bir proteinin hidrofobik özellikleri ile katlanma stratejileri arasında doğrusal bir bağ vardır. Proteinler hidrofobik etkileşimleri sayesinde dimer yapıları oluşturarak, yüksek sıcaklıklara karşı daha dayanıklı hale gelmektedir (Kumar and Nussinov 2001).

Termofilik bakterilerin denatürasyona, yüksek sıcaklığa ve proteolize karşı dayanıklı olmasını sağlayan özel proteinleri mevcuttur. Şaperon olarak adlandırılan bu proteinler, proteinlerin yeniden katlanmasını ve işlevsel olan kendine özgü yapılarını tekrar kazanmasını sağlamaktadır (De Miguel Bouzas *et al.* 2006; Alpan 2008).

Sayılan tüm bu faktörlere ek olarak, termofilik bakterilerin hücre zarlarının iyonların geçirgenliğine karşı değişkenlik gösteriyor olması, bakterilerin sahip oldukları proteinlerin çok sayıda alt birimden meydana gelmesi ve bakterilerin su aktivitesi bakımından düşük olmaları gibi özellikler de bakterilere yüksek sıcaklıkta yaşama imkanı tanımaktadır. (Tolner *et al.* 1997; Sping and Chaires 1999; Dülger 2003, Adıgüzel 2006).

### 1.3.2. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojik Önemi

Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda nasıl yaşayabildiği, pek çok bilim adamının ilgisini çekmekte ve araştırmalarını bu konuya yönlendirmelerini sağlamaktadır. Bu bakteriler yaşadıkları ortam sıcaklığına bağlı olarak pek çok biyokimyasal aktiviteye sahip olmakta ve bunun sonucunda üretmiş oldukları enzimler, mezofil bakterilerin üretmiş olduğu enzimlere göre daha etkili olmaktadır.

Genellikle termofilik mikroorganizmalardan biyoteknolojide yakıt, kimyasal üretimi ve genetik manipülasyon çalışmalarında yararlanılmaktadır. Ancak son zamanlarda termofilik mikroorganizmaları bu alanda önemli kılan, biyoteknoloji açısından oldukça önemli olan ve biyokimyasal reaksiyonları oldukça yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen termofilik enzimleri üretmeleridir.

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonlara yön veren, onları katalizleyen ve çok önemli metabolik görevleri olan çoğunluğu protein yapıdaki moleküllerdir. Günümüzde çeşitli amaçlarla günlük ve ekonomik hayatta kullanımları söz konusudur. Enzimlerden pek çok sanayi kuruluşunda; kimyasal, ilaç, kağıt, fırıncılık, gıda, alkollü peynir üretimi, tekstil gibi sanayi kuruluşlarında faydalanılmaktadır (Wiseman 1987; Corderio 2002; Beldüz vd. 2003; Haki *et al.* 2003; Whitford 2005; Turner 2007; Alpan 2008). Öyle ki son zamanlarda sanayide kullanılan çoğu kimyasal uygulamanın çevreye ve canlılığa verdiği zarar göz önüne alındığında sanayi alanlarında biyolojik enzimlerin kullanımı artmaktadır. Enzimlerin çevre dostu, sağlıklı ve ayrıca substrata olan özgünlüklerinden dolayı kullanıldıkları ürünlerin ve aynı zamanda uygulamalarının da kalitesini arttırdığı bilinmektedir (Couto *et al.* 2006; Önal 2010; Piriççioğlu 2010).

Endüstride tercih edilen mikroorganizmalar kaynaklı enzimler bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere kıyasla oldukça yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Daha ucuz yoldan elde edilebilmekte, oldukça kararlı ve çok miktarlarda hem de yüksek saflıkta elde edilebilmektedirler. Hatta yan ürün oluşturmazlar ve çevre dostudurlar. Ayrıca; mikroorganizmalar hızlı çoğalmaktadırlar ve ucuz kaynaklardan beslenebilmektedirler. Pek çeşitli endüstri atıkları, mikroorganizmalarca substrat

olarak değerlendirilebilmekte ve böylece birçok atığın yok edilmesi veya doğaya kazandırılması da söz konusu olmaktadır (Castro 1999; Topal 2000; Özdemir 2004; Matpan 2007; Alpan 2008; Malle *et al.* 2012). Tüm bu avantajlarından ötürü mikroorganizma kaynaklı enzimler son zamanlarda daha çok tercih edilmektedirler.

Termofilik enzimlerin sıcaklığa dayanıklılığı mezofil enzimlere kıyasen oldukça yüksektir ve termofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda optimum düzeylerde fonksiyonel olmaktadır (Madigan and Martingo 2008). Tüm bu nedenlerden ötürü de çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik çalışmalarda; mısır şurubu imalatı, PCR işlemleri, deterjan uygulamaları, gıda endüstrisi gibi uygulamalar bakımından yarar sağlamaları nedeniyle termofilik enzimlere talep giderek artmaktadır (Kıran vd. 2006; İnce 2006). Biyoteknolojik işlemler açısından bakıldığında sıcaklık artarsa; organik bir takım bileşikler yüksek çözünürlüğe ulaşacak, difüzyon hızları artacak, ortamın istenmeyen viskozitesi azalacak, küçük bir alandan yüksek reaksiyon hızıyla beraber daha fazla ürün elde edilecektir (Demirjian *et al.* 2001; Kıran vd. 2006). Aynı zamanda biyoteknolojik uygulamalarda termofilik enzimlerin kullanılması ile diğer mikroorganizmalardan kaynaklanacak kontaminasyonun da önüne geçilecektir. Aynı şekilde biyolojik materyallerce oldukça zor parçalanan ve çözünmesi zor olan çevre kaynaklı kirletici elementlerin oluşması da termofilik enzimlerin kullanımı sayesinde önlenecektir (Güven 2011; Malle *et al.* 2012).

Termofilik enzimlerin diğer mikroorganizma kaynaklı mezofil enzimlere kıyasla daha fazla tercih edilme nedenleri şöyle sıralanabilmektedir (Alpan 2008);

1. Termofilik bakterilerden elde edilen termofilik enzimlerin raf ömürleri uzundur.

2. Yüksek ve düşük pH'ya karşı direnç göstermektedirler ve organik çözücülerce kolayca yok edilemezler. Bu sayede denature edici faktörlere karşı daha dirençli olmaktadır.

3. Ekstrem sıcaklık derecelerine hücresel bakımdan adapte olabildiklerinden genel direnç mekanizmaları bulunmaktadır.

4. Mezofilik şartlarda gelişen patojen mikroorganizmalar yüksek sıcaklık değerlerinde aktivitelerini kaybettiklerinden, mikrobiyal kontaminasyonu engellemiş olmaktadır.

5. Kararsız bileşikler tarafından reaksiyonların engellenmesini önlemektedirler.

6. Küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirmektedirler.

Sonuç olarak; sıcaklık bakımından oldukça kararlı enzimler çok yüksek spesifikliğe sahiptirler ve tüm bu sebeplerden ötürü pek çok endüstriyel işlem ve uygulama için potansiyel olabilmektedirler. Bu tür termofil ve kararlı enzimlere endüstrinin pek çok alanında duyulan gereksinim, ilerleyen zamanlarda bu enzimlerin daha da geliştirilmesi ve uygulama alanlarının artırılmasına neden olacaktır. Tüm bu durumlar, termofilik enzimleri daha çok önemli hale getirmektedir (Haki and Raksit 2003; Turner 2007; Tekin 2008).

Termofilik bakterilerden elde edilen ve biyoteknolojik bakımdan önemli görülen enzimlerin; büyük bir oranını proteazlar (yaklaşık %59), karbohidrazlar (%28) ve lipazlar (%3) oluşturmaktadır (Gomes and Steiner 2004; Önal 2010; Güder 2014). Ağırlıklı olarak çalışılan ekstrem termofilik ve hipertermofilik bakterilerden elde edilen biyoteknolojik açıdan öneme sahip bazı termostabil enzimlerden; proteinaz (süt çöktürme, et yumuşatma, kek, ekmek, bisküvi, kraker yapımı, silaj üretimi, kumaş ağartma, deterjan sanayi, dericilik), lipaz (yağ esaslı deterjan sanayi, yağların interesterifikasyonu, süt ve gıda sanayi), galaktozidaz (süt ve peynir sanayi), amilaz (nişasta hidrolizi, ekmekçilik, silaj üretimi, alkol fermantasyonu, deterjan sanayi, peynir yapımı, tekstil, gıda sanayi), selüloz (hayvan yemi sanayi, gıda sanayi, tekstil ve kağıt sanayi), kitinaz (ilaç sanayisi), ksilinaz (nişasta gluten ayrımı, ekmek hacmi genişletme, kağıt sanayi) ve pektinaz (gıda ve tekstil sanayi) en önemlileri arasında sayılabilmektedir.

#### 1.4. Proteaz Enzimi ve Biyoteknolojik Önemi

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun hızlanmasını sağlayan, biyokimyasal olaylarda önem arz eden yüksek katalitik aktiviteye sahip önemli biyolojik moleküllerdir. Biyolojik reaksiyonların yürütüldüğü substrata karşı yüksek ilgiye sahip katalitik merkezlere enzimlerin aktif bölgesi denilmektedir. Bu bölgenin kimyasal ve üç boyutlu yapısı substrat molekülü üzerindeki bazı grupların komplementeri durumundadır. Bir enzim, substratına uygun bir şekilde bağlandığında, substratı ürüne dönüştürmek üzere katalizlemektedir (Pant *et al.* 2015). Ancak biyolojik olayların katalizörleri olan enzimler; pH, sıcaklık, reaksiyonun süresi, reaksiyon ürünlerinin çeşidi, aktivatör/inhibitörlerin varlığı, enzim ve substrat konsantrasyonu, ortamdaki iyonların, organik çözücü ve deterjanların varlığı gibi pek çok faktörden etkilenebilmektedir. Bu nedenle enzimlerin işlevsel açıdan aktif olabilmesi için tüm bu faktörlerin göz önünde bulundurularak ilgili enzime uygun olarak optimize edilmesi gerekmektedir.

Biyolojik süreçlerde oldukça büyük öneme sahip olan enzimlerden günlük hayatta da istifade edilmektedir (Wiseman 1987; Gümüsel 2002; Castroa *et al.* 2010). Enzimlerin günlük hayatta kullanımına ilişkin kayıtlar eski Mısır tarihine kadar dayanmaktadır (Smith *et al.* 2001). Ancak günümüzde çeşitli enzimlerin keşfi ile enzimler gruplandırılmış ve uygulama alanları da oldukça geliştirilmiştir.

Enzimler görevli oldukları, aktivite gösterdikleri reaksiyonların çeşidine göre ve mekanizmalarına göre değişik kategorilerde sınıflandırılmışlardır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından şu şekilde 6 sınıfa ayrılmışlardır;

**1. Oksidoredüktazlar:** İndirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını gerçekleştirmektedirler.

**2. Transferazlar:** substratlar arasında bir takım grupların (hidrojen hariç) alışverişini gerçekleştiren enzimlerdir.



**3. Hidrolazlar:** çeşitli bağların (glikozit, P-N bağları, ester bağları, peptid, anhidrit) hidrolizini bir su molekülü katarak gerçekleştiren enzim grubudur.

**4. Liyazlar:** substratlardaki grupları onlardan uzaklaştırmakla görevli olup çift bağların oluşmasına sebebiyet veren enzim grubudur.

**5. İzomerazlar:** birbirinin çeşitli durumlarla (optik, yapısal ya da geometrik) izomeri olan yapıların birbirlerine dönüşümünü gerçekleştiren enzimlerdir.

**6. Ligazlar:** yüksek enerjiye sahip fosfat içeren bileşiklerden (GTP, ATP) fosfat bağımlı koparan ve bu enerji sayesinde iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir (Kalin 2012; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Sarı 2016).

Proteaz enzimleri, enzim sınıflandırmasında hidrolaz grubunda yer alan ve proteinleri peptidlere ve serbest aminoasitlere hidroliz eden enzim grubu olarak bilinmektedirler. Bu işlevi yerine getirebilmek için tüm proteaz grupları polipeptid zincirlerindeki amid bağımlı yıkarlar. Tüm proteazların reaksiyonlarında ortak olarak polipeptid zincirinden bir kısım çıkarılmakta ve suyun OH'ına transferi gerçekleştirilmektedir. Proteazların hepsinin sıcaklık, özgünlük, aktivite, iyon ihtiyacı, pH ve stabilitesi bakımından ortak karakteristik özellikleri mevcuttur. Etkide bulunacakları aminoasidin çeşidine bağlı olarak bu özellikler değişkenlik göstermektedir. Proteaz enzimlerinin hidroliz bakımından peptidazlar ve polipeptidazlar (proteazlarla sinonim) olarak iki kategorisi bulunmaktadır (Rawlings *et al.* 2007; Çevik 2010; Raval *et al.* 2014; Pant *et al.* 2015; El-Gendi *et al.* 2016).

Proteazlar; hayvansal, bitkisel ya da mikrobiyal kaynaklı olup olmamasına, katalitik olarak endo ya da ekzopeptidaz olmasına ve de reaksiyonu gerçekleştireceği bölgede bulunan aminoasidin sistein, serin, metallo ya da aspartil olmasına göre sınıflandırılmaktadır. Temel olarak etkide bulunacakları katalitik aktivitelerine yani peptid bağının yerine göre ekzo ve endopeptidazlar olarak iki kısımda incelenmektedirler. Proteaz enzimlerinin bu şekilde ayırımının yapılması enzimlerin polipeptid zincirini nereden keseceğiyle alakalıdır. Zincirin uç kısmından parça çıkarma olayı “ekzo”, orta kısımdan parça koparma olayı da “endo” olarak nitelendirilmektedir (Pantazaki *et al.* 2002; Haki and Rakhsit 2003; Orhan 2003; Castroa *et al.* 2010).

Temel olarak, ekzopeptidazlar; bir substratın amino veya karboksi uç kısımlarındaki peptid bağlarını koparmaktadır. Bu sayede ekzopeptidazlar, peptid zincirinde sadece son kısımlara etki etmekte ve etki ettiği bu kısma göre de adlandırılmaktadırlar (Grzonka *et al.* 2007). Eğer ekzopeptidazlar substratlarının amino uç kısmına etki edeceklerse aminopeptidaz; eğer karboksi ucu kısmına etki edeceklerse de karboksipeptidaz olarak isimlendirilmektedirler. Ticari bakımdan ekzopeptidazlara oldukça nadir rastlanmaktadır. Çünkü bu enzimlerin birçoğu hücre içi enzim olarak bulunmaktadır. Endopeptidazlar substratlarının iç kısımlarında mevcut bulunan peptid bağlarını koparmaktadırlar ve katalitik bölgelerinde bulunan serin, aspartil, sistein ve metallo aminoasitlerine bağlı olarak dört kısma ayrılmaktadırlar. Bazen bu gruplara threonine proteaz ve glutamik asit proteaz da eklenmekte ve sayı altıya çıkabilmektedir (Tekin 2008; Çevik 2010; Mahajan and Badgular 2010).

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunduran ve genelde nötr ya da alkalın pH'larda aktivite gösterebilen bir gruptur. Serin proteazlar aslında alkalın pH değerlerinde maksimum aktivite göstermektedirler. En çok bilinen örnekleri peptidaz A (SE), *Escherichia D-Ala-Dala*, tripsin, karboksipeptidaz C (SC), kimotripsin (SA) ve subtilisin (SB)'dir. Serin proteazlar, bakterilerde, virüslerde hatta ökaryotlarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Takenaka *et al.* 2017). Aspartil proteazlar; aktif merkezlerinde aspartik asit aminoasidi bulunan bir gruptur. Bu grup proteazların aktivite gösterdikleri pH değerleri oldukça düşük olduğundan asidik proteazlar olarak da adlandırılmaktadır. Bilinen üyeler; kathepsin D, bir sindirim enzimi olan ve midede bulunan pepsin, penisilinopepsin, rhizopus pepsin, retropepsin ve renin adı verilen kan basıncıyla alakalı olan bir enzimdir. Aspartil asit proteaz grubu, süt endüstrisinde ve peynir mayalama proseslerinde tercih edilen kullanım alanlarına sahiptir. Sistein proteazlar; aktif bölgelerinde sistein ve histidin aminoasitleri bulunduran, bir diğer isimlendirilmesi de tiyol proteazları olan hücre içi proteaz enzimlerindedir. Bu enzimler hücre içi proteinlerde dönüşüm tepkimelerinde görev almaktadırlar. Ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda sıklıkla bulunan bu proteazlar, doğada pek çok kaynaktan bulunmakta olup en bilindik örnekleri; kiviye bulunan aktinidin, incirde bulunan fişin, papaya bitkisindeki papain ve ananas meyvesinde bulunan bromelaindir.

Metalloproteazlar ise aktivite gösterebilmeleri için bir divalent ve pozitif yüklü metal iyonuna ihtiyaç duyan enzim ailesidir. Bu enzimlerin aktif bölgelerinde bir metal iyonu bulunmaktadır. Bu iyon çoğunlukla da çinko iyonu olduğundan bu enzim grubu aynı zamanda çinko-proteaz adıyla da bilinmektedir. Bu enzim ailesinin en bilindik üyesi karboksil peptidaz A'dır. Bu enzim büyükbaş hayvanlarda bulunur ve bir çeşit sindirim enzimidir. Diğer bilindik üyeleri ise; angiotensin-enzimi, termolisin, kollagenaz, yılan zehirinde bulunan bir hemorhagik toksin ve bir D-alanil D-karboksi peptidaz olan Zn21G proteazıdır. Mikrobiyal kaynaklı pek çok proteaz enzimi metalloproteaz sınıfından olup bu grubun enzimlerinin biyoteknolojik önemi oldukça büyüktür. Bazı bakterilerde mevcut olan nötral proteazlar da bu grubun üyeleridir (Gerze 2003; Orhan 2003; Tekin 2008; Çevik 2010; Sarı 2011).

Proteaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi, bir substrat molekülü (kazein/hemoglobin) ile optimum pH ve sıcaklıkta yapılmaktadır. TCA adı erilen bir enzim kullanılarak reaksiyonda oluşmuş büyük partiküllerin çökmesi sağlanmakta ve sonra proteaz enzimi tarafından hidroliz edilip çözünmüş bir hale gelen proteinin miktarsal analizi UV spektrofotometre yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Sıcaklık ve pH enzim aktivitesine etki eden iki önemli faktör olarak bilinmektedir. Sıcaklık, esasında substratların enzimler tarafından hidrolizini artıracığından enzim aktivitesini olumlu yönde etkileyecek bir faktördür. Ancak çok yüksek sıcaklık değerleri de enzimi olumsuz yönde etkilemekte ve enzimi denatüre ederek yapısını bozmaktadır. Yine düşük sıcaklık değerleri de reaksiyonları olumsuz yönde etkilemekte ve moleküler seviyede hareketi kısıtlamaktadır. Tüm bu olumsuz durumlar da enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır.

Bütün enzimler için maksimum aktivitenin gerçekleştiği optimum bir pH aralığı vardır. Proteazlar, yapılarındaki ve çeşitlerindeki farklılıklarına göre değişik pH'larda optimum aktivite göstermektedirler. Bu bağlamda proteaz enzimleri genellikle alkalın proteazlar (pH 7,0 ila 11,0), nötral proteazlar (pH 6,0 ila 9,0) veya asidik proteazlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. pH ve sıcaklığın yanı sıra enzimin aktivitesini olumlu veya olumsuz yönde etkileyen başka faktörler de mevcuttur. Enzim aktivitesini olumlu yönde etkileyen maddelere aktivatör maddeler, olumsuz yönde etkileyen maddelere de inhibitör maddeler denilmektedir. Serin alkalın proteaz enzimleri üzerine yapılan

çeşitli çalışmalar neticesinde bu enzim için  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  gibi divalent metal iyonlarının aktivatör bir etkide bulunduğu gösterilmiştir (Tekin 2008; Vijayaraghavan *et al.* 2014). İnhibitör maddeler de enzimlere bağlanarak ya da substrata ulaşmak adına enzimlerle yarışarak onlara engel olmaktadır. Genel anlamda yapılan çalışmalar neticesinde  $Cu^{+2}$  iyonunun, EDTA'nın, histidin ve  $\beta$ -Mercaptol'un proteaz enzimi için inhibitör etkide bulunduğu belirlenmiştir (Orhan 2003; Castroa *et al.* 2010; Sarı 2011; Vijayaraghavan *et al.* 2014).

Proteazlar; gen ifadesinin düzenlenmesi, proteinlerin taşınımı ve metabolizmanın kullanabilmesi için küçük moleküllere ayrılması ile enzim modifikasyon çalışmaları gibi çeşitli ve oldukça de önemli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Proteaz enzimleri bitki, hayvan ve mikroorganizmal kalıntıların yok edilmesinde, besin döngüsünün sürdürülmesinde, bitkilerin topraktan besin alabilmesinde oldukça önemli görevler üstlenmiştir (Çevik, 2010). Tüm bu nedenlerden ötürü canlı organizmalarca yaygın bir şekilde üretilmektedir ve bu enzimlerin biyoteknoloji açısından önemi oldukça büyüktür.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen proteaz enzimleri hücreler için elzem temel bileşenlerden biri olan proteinleri parçalanmakta ve bu reaksiyon sonucu oluşan ürünleri besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Proteinler tüm hücrelerde olduğu gibi bakteri hücreleri için de oldukça elzem olan yapılardır. Bakteriler tarafından üretilen proteaz enzimleri endüstriyel amaçlı olarak en çok tercih edilen enzimlerdir. Biyoteknolojik olarak üzerinde yoğun olarak çalışılan *Bacillus* cinsi bakterilerden genellikle bazik şartlarda aktif olan proteaz enzimleri saflaştırılmakta ve çeşitli proseslerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler sentetik besiyerlerinde kolayca yetiştirilebilmekte, hemen hemen her türlü ortamdan izole edilebilmekte, yüksek sıcaklık değerlerinde dahi enzim stabilitelelerini koruyabilmekte ve bakteri durgunluk fazındayken dahi enzim üretimi yapabilmektedir (Chen *et al.* 2004; Çevik 2010; Rai and Mukherjee 2010; Pant *et al.* 2015; Hussain *et al.* 2017).

Termofilik bakterilerden elde edilen enzimler, sıcaklık karşısında gösterdikleri kararlılık nedeniyle pek çok ticari alanda çalışma konusu olmaktadır. Termofilik enzimler konusundaki ilerlemeler, dünyanın farklı bölgelerinden çok sayıda yararlı

termofilik bakterinin izolasyonunu ve daha sonra da bu organizmalardan enzimlerin ekstraksiyonunu mümkün kılmaktadır. Termostabil enzimler, zorlu endüstriyel proseslere daha iyi uyum sağlamaktadır ve bu nedenle endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan giderek daha fazla ilgi çekmektedir (Gomes and Steiner 2004; Castroa *et al.* 2010). Bu nedenle termostabil proteazların da endüstriyel süreçlerde kullanımı daha karlı ve avantajlı olmaktadır.

Proteaz enzimi, endüstriyel olarak kullanım yelpazesi oldukça geniş olan enzimlerdir. Mikrobiyal kaynaklı proteaz enzimlerinden; deterjan sanayi, et, süt, ekmek, gıda sanayi, deri endüstrisi, kıl giderimi, peynir yapımı, biralarn berraklaştırılması, fotoğrafçılık çalışmaları, evcil hayvan gıdalarının tatlandırılması, rekombinant DNA teknolojisi çalışmaları, tıpta çeşitli uygulamalarda, ilaçların hazırlanması, organik biyosentez, röntgen filmlerindeki gümüşün geri kazanılması ve atıkların muamelesi gibi çeşitli alanlarda ve sanayilerde kullanılmaktadır. Kısacası proteazlar biyolojide, tıbbi araştırmalarda, sanayi alanlarında, ve biyoteknolojide oldukça önemli bir enzim grubudur (Özşahin 2006; Tari *et al.* 2006; Matpan 2007; Rawlings *et al.* 2007; Çevik 2010; Ningthoujam and Kshetri 2010; Moreno *et al.* 2013; Sarkar and Paul 2016; Marathe *et al.* 2017).

Proteaz enziminin biyoteknolojide en yaygın olarak kullanıldığı alan deterjan sanayisidir. Özellikle alkalifilik proteaz grupları yoğun olarak bu alanda çalışılmaktadır. Serin proteaz enzimleri alkalifilik özelliklerinden dolayı deterjan uygulama sanayisinde katkı maddesi olarak tercih edilmekte ve özellikle termofilik bakteri organizmalarından elde edilen enzimler yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanıklı olduğundan dolayı kan ve çimen lekelerinin giderilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çamaşır yıkama uygulamalarında deterjan kullanımının yaygınlaşması, daha çevre dostu olmasının talep edilmesi ve sağlığa zararlı madde içermesinin önlenmesi istekleri biyolojik materyallerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilecek enzimlerin önemini artırmaktadır. Termofilik bakterilerden elde edilen proteazların kirletici ajanlara karşı yok edici özelliğinin farkedilmesiyle son zamanlarda bu proteazın deterjan sanayinde kullanıldığı çalışmaların sayısında artış olmuştur (Özşahin 2006).

Bir deterjanın aktif bileşenleri, raf ömrünün uzunluğu, sağlığa zararlı fosfat içeriğinin kaldırılması, mikrobiyal proteazlarca harmanlanmış olması onun kullanılabilirliğini artıran faktörlerin başında gelmektedir. Mikrobiyal enzimlerce desteklenmiş deterjanların en önemli avatajı da enzimin deterjan raf ömrü boyunca kararlılığını koruması olmaktadır. Bakteriyal bir enzimin raf ömrünün uzun olması da pek çok etkene bağlıdır. Bu etkenler; sıcaklık, beyazlatıcı etmenler, su gereksinimi, pH, yüzey etken bileşenleri ve yapısal inaktivasyona neden olacak maddelerdir. Termofilik bakteriyal proteazlar sayılan tüm bu etkenlere karşı dayanıklılığını korumakta ve özellikle de çevre dostu olmaları sebebiyle deterjan sanayiye dayalı isteklere karşılık vermektedir (Orhan 2003; Rai and Mukherjee 2010).

Proteaz enziminin kullanıldığı bir başka alan da deri sanayidir. Deri yüzeyinden kılların ve yünlerin giderilmesi, derinin ıslatılması işlemi, yumuşatılması ve son halini alarak kullanılabilir bir şekle getirilmesi aşamalarında; özetle bir hayvanın postundan işlevsel bir deri elde edilmesinde termofilik proteazların rolü oldukça önemlidir. Termofilik proteaz enzimlerinin bu uygulamada kullanılmasının temel sebebi deri ve kıl yapısının proteinden oluşmasıdır. Kıl, yapısında fazla miktarda sistein bulunan  $\alpha$ -keratin proteinlerinden oluşmaktadır. Yine farklı deri tabakaları  $\alpha$ -keratin, kolajen, globulin, glikoprotein, albümin, elastin ve diğer küresel proteinlerden oluşmaktadır. Deri sanayinde proteaz enzimlerinden, deriyi ıslatma, kıl ve tüy yapılarından arındırma proseslerinde bir aşamaya kadar kullanılmaktadır. Islatma işleminde, hayvan postları antimikrobiyal materyaller ve yüzey aktif maddelerce yıkanır ve ıslatılır. Bu basamakta albümin ya da globülin yapıdaki proteinlerin arındırılması için alkali proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Proteazların bu işlemlerde kullanımından önce hayvan derileri kıl ve tüy yapılarından arındırılmak adına kireçli banyolarda birkaç gün süresince ıslatılmaktaydı. Artık bu işlem proteazlar sayesinde kısa bir zamanda yapılmakta, deri kalitesi yükseltilmekte ve az miktarda atık ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda ayırma adı verilen basamakta da hayvansal deriler daha esnek ve yumuşak şekle getirilerek bir sonraki aşama için hazırlanmasında termofil bakterilerden elde edilen enzimlerden yararlanılmaktadır (Tekin 2008; Sarı 2011).

Termofilik proteazlar gıda sanayinde de etkin olarak kullanılmaktadır. Proteaz enziminin bu anlamda biyoteknolojide kullanıldığı ilk alan peynir üretimi olmuştur. Peynir üretimi esnasında rennin adı verilen bir sığır kimosin enziminden sütün pıhtılaştırılması aşamasında yararlanılmaktadır. Rennin, bir çeşit aspartil proteaz olup oldukça yüksek maliyete sahip bir enzimdir. Domuz pepsin enzimi rennin yerine kullanılmakta ama bu enzimin yüksek proteaz aktivitesi göstermesi peynir özüne zarar vermektedir. Proteazlar gıda sektöründe özellikle sığır eti gibi etlerin yumuşatılmasında önemli rol oynamaktadır. Yine proteaz enzimi çeşitli gıda işleme endüstrisi ve özellikle evsel atıkların giderilmesi için de bir potansiyel sağlamaktadır. Proteaz enzimleri, birkaç basamaktan sonra atık ürünlerindeki protein maddeleri çözebilmekte ve bunun sonucunda da evcil hayvanlar, balık ve çiftlik hayvanları için kuru ya da sıvı gıdaların üretimini gerçekleştirebilmektedirler.

Fırıncılık endüstrisinde özellikle de gluten bakımından yüksek hamurların içeriklerinin hafifletilmesinde, yumuşatılmasında ve aynı zamanda bisküvi, kraker grubundaki gıda ürünlerinin yapımında termostabil proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Gluten yapısı hamurda ağsal elastiki yapılar oluşturmakta bu da hamuru sert bir kıvama sokmaktadır. Proteaz enzimleri bu yapıları hidroliz ederek lastik gibi sert olan hamuru, kalıp alması kolay, yoğrulabilir ve kolay şekil alabilir bir hale getirir. Gluteinin yüksek oranda hidrolizinin gerçekleştirebilmesi adına proteaz enzim miktarı artırılarak hamur, mayalanma işlemi esnasında oluşacak kabarcıkları tutamayıp çıtır bir hal alır ve böylece bisküvi ve kraker gibi gevrek gıdalar üretilir. Termofilik proteaz enzimlerinden bira yapımında da yararlanılmaktadır. Arpa ve su karışımına ilave edilen enzimler tahılda bulunan proteinleri parçalarlar ve bira içeriğini aminoasitlerce zengin hale getirirler.

Tekstil endüstrisi de termofilik proteazlardan faydalanmakta, bu alandaki enzim uygulamalarıyla yakından ilgilenmektedir. Ham ipek ve yünün birer tekstil ürünü haline getirilmesinde proteaz enzimlerinden faydalanılmaktadır. Yine bu enzimlerden kozmetik alanında da yararlanılmakta; istenmeyen tüylerin giderilmesinde, diş macunu içeriklerinde ve lens solüsyonlarının bileşiminde kullanılmaktadır. İlaç sanayisi de proteaz enzimlerinin sıklıkla kullanıldığı bir diğer alandır. İlaç sanayinde genelde sindirim sistemini düzenleyen ilaçların bileşenlerinde kullanılmaktadırlar.

Özellikle alkali proteaz aktivitesi gösteren proteazın çeşitli üyeleri, terapötik uygulamalar için artan kullanım alanı bulmaktadır. Terapötik enzimlerin; yaralar, yanıklar, deri abseleri ve çıbanların tedavisi için bir bandaja immobilize edililerek uygulaması yapılmaktadır. Yine çeşitli uyuşturucu maddelerin, kan ve doku örneklerinin tahlilinde de kullanılmaktadırlar. Gümüş kazanımı için X-ışını filmlerinin işlenmesinde alkalifilik proteazlar potansiyel olarak kullanılmaktadır. X-ışını filmlerinde kullanılan jelatin içerikli tabakalar ağırlık bakımından %1,5-2,0 gümüş içermektedir. Konvensiyonel gümüş kazanımı amacıyla bu filmlerin yakılması ile çeresel sorunlar oluşturmaktadır. Bu bağlamda X-ışını filmlerindeki tabakaların enzimsel olarak hidrolizi büyük bir avantaj sağlamaktadır (Orhan 2003; Tekin 2008; Nadeem *et al.* 2009; Çevik 2010).

### **1.5. Tezin Amacı ve Kapsamı**

Termofilik bakteriler çoğu canlının yaşamasının mümkün olamayacağı sıcaklık değerlerinde hayatta kalmayı başarabilmeleri ve buna bağlı olarak metabolik faaliyetlerini sürdürmek için gerekli olan enzimlerini kullanabilmeleri nedeniyle son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmiş ve araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak da pek çok termofilik enzimin işlevi aydınlatılmış ve karakterizasyonları yapılmıştır (Akhmaloka *et al.* 2006; Akkaya ve Kıvanç 2009; Malle *et al.* 2012; Türker ve Özcan 2015; Zahoor 2016).

Günümüzde, birçok sanayi ve endüstri kuruluşlarında yaygın bir şekilde kullanılan enzimler genellikle mezofilik bakterilerden elde edilmektedir. Ancak sanayi ve endüstri proseslerinde uygulanan kimyasal işlem, yüksek sıcaklık, pH ve çeşitli uygulamalar neticesinde bu enzimlerin kullanım alanları sınırlandırılmıştır. Bu anlamda ortaya çıkan ekstrem fizyolojik gereksinimler termofilik enzimlerin kullanımını ön plana çıkarmıştır. Biyoteknolojik enzim uygulamalarında son 20 yılda gözler termofilik mikroorganizmalara çevrilmiştir (Hough *et al.* 1999; Güray 2009; Tekincanli vd. 2015; Narwal *et al.* 2016; Hammami *et al.* 2017).



Bu bağlamda çalışmamızda özellikle içinde bulunduğumuz ilin jeolojik konumu da dikkate alınarak mevcut sıcak su kaynaklarında bulunan termofilik mikroorganizmaların izolasyonu, tanılanması ve biyoteknolojik niteliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Erzurum ili'ndeki Hasankale, Ilıca ve henüz herhangi bir çalışmaya kaynak olmamış Nenehatun sıcak su kaynaklarının termofilik bakteri yoğunluğunun ve bu bakteri izolatlarının proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması ve bu çalışmalar neticesinde elde edilen verilerle termofilik bakterilerin deterjan sanayisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yapmış olduğumuz literatür taramaları sonucunda dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmaların literatür özeti aşağıda sunulmuştur.

### 2.1. Termofilik Mikroorganizmaları Tanılamaya Yönelik Çalışmalar

Beffa *et al.* (1996), yapmış oldukları bir çalışmada, *Thermus* türlerini 65°C ile 82°C arasındaki termal alanlardan izole etmişler, optimum üreme sıcaklığını 65-75°C olarak tespit etmişlerdir. DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda bu bakterilerin *T. thermophilus* HB8 türleriyle çok yakın olduğunu gözlemlemişlerdir.

Nicolaus *et al.* (1998), ise Antartika'nın Mount Rittmann geotermal bölgesinden *Alicyclobacillus* cinsine ait bir alt tür izole etmişlerdir. İzolatın optimum gelişme sıcaklığını 63°C, üreme aralığını 45-70°C arasında belirlemişler, optimum pH'sını ise 3.5- 4.0 olarak tespit etmişlerdir. Elde ettikleri izolatın G+C oranını %64,9 olarak bulmuşlar ve 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda %99.3 *A. acidocaldarius* ile benzer olduğunu saptamışlardır.

Andrade *et al.* (1999), termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmaların kıtasal ve deniz altı volkanik bölgelerden, jeotermal elektrik santralleri nedeniyle ısınmış sedimentlerden ve hidrotermal ağızlardan izole edilebileceğini vurgulamışlardır.

Hawumba and Brozee (2002), Kuzey Uganda'daki sıcak su kaynaklarından *Geobacillus* cinsi termofilik mikroorganizmalar izole etmiş ve bu mikroorganizmaların Gram pozitif, aerobik, çubuk şeklinde morfolojilerinin bulunduğunu ve spor oluşturan bakteriler olduğunu, optimum üreme koşullarının 60-62°C, pH'larının 7,5-8,5 olduğunu tespit etmişlerdir. 16S rRNA analizleriyle de bunların *Geobacillus* cinsi bakteriler olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu bakterilerin termostabil proteaz aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında söz konusu enzimin optimum koşullarını da belirlemişlerdir.

Beldüz vd. (2003), ise Türkiye'nin, Balıkesir İli Gönen ve Ağrı İli Diyadin sıcak su kaynaklarından yedi tane termofilik bakteri izole etmişler ve bu izolatların *Anoxybacillus* cinsi olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu izolatların 55-60°C arasında ürediğini saptamışlar, morfolojik ve biyokimyasal testlerini yapmışlardır. İzolatların glukoz, nişasta, ksiloz ve mannitol gibi geniş karbon kaynaklarında iyi ürediklerini ve fakültatif anaerob bakteriler olduklarını tespit etmişlerdir.

Dülger vd. (2004), Türkiye'deki Rize İli Ayder ve Çanakkale İli Kestanbol sıcak su kaplıcalarından iki termofilik basil izole etmişlerdir. Bu izolatları ABO4T ve K4T olarak adlandırmışlar ve bu izolatların spor formu, , Gram pozitif, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Bu türlerin çeşitli karbon kaynaklarında (D-glukoz, D-fruktoz, maltoz, D-sükroz, D- raffinoz, D-xylose, L-arabinoz, D-mannoz, D-mannitol) üreyebildiklerini saptamışlar ve 16S rRNA gen dizi analizleri ile DNA-DNA hibridizasyonu sonucu bu türlerin *Anoxybacillus* cinsine ait olduklarını bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda da bu bakterileri, *A. ayderensis* ve *A. kestanbolensis* olarak adlandırmışlardır.

Nazina *et al.* (2004), yapmış oldukları bir çalışmada Garga sıcak su kaynağından yeni bir tür olan termofilik *Geobacillus gargensis* izole etmişler ve tanımlamışlardır. Bu türün Gram pozitif, aerobik, çubuk şeklinde olduğunu, optimum üreme sıcaklığının 60-65°C'de olduğunu saptamışlardır. DNA'daki G+C oranını %52.9 mol olarak bulmuşlar ve 16S rRNA gen dizi analizi ile yağ asidi analizi sonucunda da bunun *Geobacillus* cinsine ait bir tür olabileceğini öngörmüşlerdir. Yaptıkları fizyolojik, biyokimyasal testler ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçları bu bulgularını desteklemiştir.

Akhmaloka *et al.* (2006), Papandayan Krateri'nde bulunan sıcak su kaynağından örnek alarak yaptıkları bir çalışmada termofilik bakterilerin izolasyonunu yapmışlardır. Termofilik bakterilerin 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda *Bacillus caldolyticus* ve *B. caldotenax*'a yakınlık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Poli *et al.* (2006), Antartika'daki jeotermal alanlardan Gram pozitif bir *Anoxybacillus* türünü izole etmişlerdir. Bu türün optimum üreme sıcaklığını 61°C ve

pH'sını da 5,6 olarak bulmuşlar; galaktoz, trehaloz, maltoz, sükröz karbon kaynaklarını kullandığını belirlemişlerdir. DNA'daki G+C oranını %43.5 mol olarak bulmuşlar, 16S rRNA gen dizi analizi, yağ asidi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçlarından bu türün yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu tespit etmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmanın sonucunda bu izolatu *A. amylolyticus* olarak tanımlamışlardır.

Derekova vd. (2007), Bulgaristan'ın Rupbasin bölgesindeki sıcak su kaplıcalarından Gram-pozitif, spor formlu, aerobik üç yeni tür izole etmişler, bunların optimal üreme sıcaklığı ile pH'larını ve yağ asidi profillerini belirlemişlerdir. 16S rRNA gen analizleri ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda da bu türlerin *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğunu tespit ederek *A. rupiensis* olarak tanımlamışlardır.

Gül-Güven vd. (2008), Batman Taşlıdere su kaynaklarının çamur örneklerinden KG8T adını verdikleri termofilik bir bakteri izole etmişlerdir. Bu bakteri türünün çubuk şeklinde, Gram-pozitif olduğunu ve gelişimi için en az 35 °C en fazla da 65°C'nin gerekli olduğunu, optimum gelişim sıcaklığının ise 55°C olduğunu belirlemişlerdir. Bakterinin pH 5,5 ile 9,5'de ürediğini; nişastayı kullanabildiğini, %3'lük NaCl konsantrasyonda toleranslı olduğunu tespit etmişlerdir. DNA-DNA hibridizasyonu, 16S rRNA dizi analizinin sonucunda da bu türü *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. *asaccharedens* olarak tanımlamışlardır.

Adigüzel vd. (2009), Türkiye'deki değişik sıcak su kaynaklarından termofilik bakterilerin izolasyonunu ve tanılamasını amaçlamış oldukları çalışmalarında, izole ettikleri bakterileri klasik ve moleküler metodlarla tanılamışlardır. Çalışmalarının sonucunda *Geobacillus*, *Anoxybacillus* ve *Bacillus* sp. türlerine ait çeşitli izolatların yağ asidi metil ester, rep-PCR profili ve 16S rRNA gen dizi analizine dayalı olarak tanısını ve taksonomik karakterizasyonunu yapmışlardır.

Başbülbül (2009), Aydın İli ve çevresinde yer alan çeşitli termal su kaynaklarından termofilik bakteriler izole ederek tanılamıştır. 16S rRNA sekans analizi sonucunda; test izolatlarının %99 oranında *Geobacillus toebii*, *B. licheniformis*,

*Brevibacillus brevis*, *Geobacillus pallidus*, *B. borstelensis* ve *B. pumilus*'a benzediğini tespit etmiştir.

Savaş vd. (2009), Van Erciş Hasanabdal kaplıcasından aldıkları su örneklerinden çeşitli termofilik bakteriler izole ederek bunları fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma sonucunda 5 farklı bakteri izolatu (*Geobacillus pallidus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Brevibacillus brevis* ve *B. Borstelensis*) tanılamışlar ve bunlar arasındaki genetik polimorfizmi tespit için de rep-PCR yöntemini kullanmışlardır.

Lino *et al.* (2010), yapmış oldukları çalışmada termofilik bir kemoheterotrof bakteri olan Mat9-16T izolatını Nagano-Japonya'da bulunan bir sıcak su kaynağı yakınlarından izole etmişler ve bu bakterinin Gram negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz ve çubuk şeklinde morfoloji gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu izolatın optimum gelişim sıcaklığını 45°C olarak bildirmişler ve pH'sının minimum 7,0 maksimum da 7,5'de olduğunu göstermişlerdir. 16S rRNA genine dayanan filogenetik analizler sonucunda bu bakteri izolatının %77-83 dizi benzerliği ile Chlorobea sınıfına ait bir yeşil sülfür bakterisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Asad *et al.* (2011), su kaynaklarından elde ettikleri toplam 50 bakteri izolatını amilaz, lipaz, esteraz, selülaz ve  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi açısından değerlendirmişler ve *Bacillus* olarak tanımlanan bir bakteri türü (*Bacillus* WA21) ile  $\alpha$ -amilaz enzim çalışmaları yapmışlardır. Bu bakteri izolatının geniş bir sıcaklık (35-55°C) ve pH (3-11) aralığında (optimum sıcaklık 45°C ve pH 6) gelişim gösterdiğini ve biyoteknoloji için umut verici bir  $\alpha$ -amilaz kaynağı olarak kabul edilebileceğini öne sürmüşlerdir.

Charbonneau *et al.* (2012), gübre örneklerinden 10 termofilik bakteri soyu izole etmişlerdir. Bu bakteri izolatlarını 16S rRNA genlerine dayanan filogenetik analiz ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *Geobacillus thermodenitrificans*, *B. smithii*, *Ureibacillus suwonensis* ve *Aneurinibacillus thermoaerophilus* olarak tanılamışlardır. Bu türlerin, endüstriyel uygulamalar için bir potansiyel olan termostabil enzimlerin kaynağı olabileceğini öngörmüşlerdir.

Podosokorskaya *et al.* (2013), bir petrol arama kuyusundan termofilik, fakültatif anaerobik bir bakteri izolatu elde ettiler. Bu izolat rRNA gen sekansı analizleri sonucunda *Melioribacter roseus* olarak tanılanmıştır.

Kumar *et al.* (2014), Manikaran kaplıcalarından toplamda 235 izolat elde etmişler ve bu organizmaların gelişimi için en uygun sıcaklık aralığını araştırmışlardır (40°C-70°C). 16S rRNA analizi sonucunda bu izolatların birçoğunun *Firmicutes*'e ait olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların % 26' sında amilaz, % 45'inde proteaz enzim aktivitesine rastlamışlar ve bu durumun endüstriyel-tarımsal uygulamalar için umut kaynağı olabileceğini öngörmüşlerdir.

Elazzazy *et al.* (2015), Suudi Arabistan'ın Cidde bölgesinden toplanan toprak ve deniz suyu örneklerinden 23 farklı mikrobiyal koloni izole etmişlerdir. İzole edilen bakterilere uygulanan çeşitli testler sonucunda (damla çökme testi, yağ değişim testi, mavi agar testi, kan hemoliz testi, emülsiyonlaşma aktivitesi ve yüzey gerilimi testi) bunların *Virgibacillus salarius* ile yakın ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Tarakçıoğlu (2016), yapmış olduğu tez çalışmasında Erzurum-Ilıca su kaynaklarından su örneği almış ve bu örneklerden bakteri izolasyonu ve identifikasyonu yapmıştır. Çalışmasında yaptığı 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu izolatların, *Bacillus licheniformis*, *B. thermoamylovorans*, *Brevibacillus brevis*, *B. agri*, *B. borstelensis*, *Aeribacillus pallidus* türlerine ait olduğunu belirlemiştir. Bu izolatlar üzerinde lipaz enzimi karakterizasyon çalışmaları yapmıştır.

Amin *et al.* (2017), Himalayaların su kaynakları bakımından oldukça verimli olan Chilas ve Hunza bölgelerinden bakteri izolasyon çalışmaları yapmışlardır. Bu bölgenin sıcaklık değerleri 60 ila 95°C arasında, pH'ı 6.2 ila 9.4 arasında değişkenlik göstermektedir. Bu bölgeden yaptıkları araştırmada elde edilen bakteri izolatlarının *Proteobakteriler* ve *Chloroflexiler*'e ait olduğunu belirlemiştir.

## 2.2. Termofilik Mikroorganizmaların Enzim Aktivitelerine Yönelik Çalışmalar

Sookkheo *et al.* (2000), *B. stearrowthermophilus* tarafından üretilen üç ekstraselüler proteaz enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkları 70°C, 85°C, 90°C olarak ve optimum pH'yı da 7,0 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi üzerinde 5 mM CaCl<sub>2</sub>'ün artış sağladığı ve EDTA'nın inhibisyona sebep olduğunu gözlemlemişlerdir.

Zvidzai and Zvauya (2000), Zimbabve sıcak su kaynaklarından *Bacillus subtilis* izole etmişler ve bu bakterinin ürettiği proteaz enzimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Proteaz aktivitesinin sıcaklığını 60°C-80°C, pH aralığını ise 6,0-10,0 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi için optimum koşulların 70°C'de, pH; 8,0 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> iyonlarının varlığında %20 artış sağladığını belirlemişlerdir.

Kim *et al.* (2001), *B. cereus* KCTC 3674 izolatının ürettiği proteaz enziminin optimum pH'sını 8,0, sıcaklığını ise 70°C olarak belirlemişler, bu enzimin EDTA ile inhibe olduğunu bu nedenle de enzimin bir metalloproteaz olduğunu belirlemişlerdir.

Oberoi *et al.* (2001), *Bacillus* sp. RGR-14 izolatından elde ettikleri alkalifilik ve SDS'le muameleye dirençli bir enzimin optimum pH'sının 11,0; sıcaklığın 20-80°C olduğu aralıkta kararlılığını koruduğunu, enzim aktivitesinin 45-70°C aralığında optimum olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin 1 saat boyunca %0,5'lik SDS ile aktivitesinde %30 oranında bir azalma olduğunu; %0,1'lik SDS ile ise aktivitesini tamamen koruduğunu belirlemişlerdir. Enzimin aktivitesinin yükseltgenler ve yüzey etken maddelere karşı herhangi bir değişiklik göstermediğini belirlemişlerdir. Enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabileceğini test edebilmek adına kumaşlar üzerine bulaştırılmış kan ve çimen lekeleri üzerine çözüm gücünü araştırmışlardır.

Singh *et al.* (2001), *Bacillus* sp. SSR1'den alkalın proteaz enzimi elde etmişlerdir. Enzimin 8,0-11,0 pH değerlerinde kararlı olduğunu ve 300 dakika boyunca 40°C'de aktivitesinin tamamını koruduğunu söylemişlerdir. Enzimin CaCl<sub>2</sub>

iyonları ile aktivitesinin arttığını hatta aktivitesinde 1,3 katı kadar bir artma olduğunu ve bu iyon nedeniyle optimum sıcaklığının 45°C olduğunu belirtmişlerdir. Yine Fe<sup>+3</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+2</sup> ile enzim aktivitesinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Studdert *et al.* (2001), *Natronococcus occultus*'dan proteaz enzimi elde etmişler ve bu enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlardır. Optimum 60°C'de aktivite gösteren enzimin geniş bir pH aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Yang *et al.* (2000), *B. subtilis* Y-108'den elde ettikleri enzimin kazein substratı ile 50°C'de, pH 8,0'de optimum aktivite gösterdiğini, aktivitesinin Mn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> varlığında arttığını ve EDTA varlığında ise tamamen aktivite kaybı yaşadığını belirlemişlerdir.

Beg and Gupta (2002), *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalin proteaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırılması üzerinde çalışmışlardır. Enzim aktivitesinin optimum değerlerinin 60°C ve pH 8,0 olduğunu bulmuşlardır. Metal iyonlarından Cu<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'nin enzim aktivitesinde % 36'lık artış sağladığını tespit etmişlerdir.

Ghorbel *et al.* (2002), *Bacillus* cinsi bir bakteri tarafından üretilen proteaz enziminin stabilitesi üzerine çalışmalar yapmışlar ve enzimin optimum sıcaklığını 60°C ve pH'sını 8,0 olarak bulmuşlardır. Ayrıca Ca<sup>+2</sup>'un aktivite artışını sağladığını, Zn<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup>'ın inhibitör etkisinin olduğunu, EDTA tarafından ise aktivitenin tamamen kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

Beg and Gupta (2003), *Bacillus mojavensis*'ten elde ettikleri serin alkalik proteaz enzim aktivitesinin optimum değerlerinin 60°C sıcaklıkta ve pH 10,5'te olduğunu belirlemişlerdir. Bu proteaz enziminin 48 saat boyunca 7,0-11,5 pH aralığında aktivitesini koruduğunu belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin Cu<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> ile %36 oranında artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Gessesse *et al.* (2003), izole ettikleri *Nesternkonio* sp. ve *B. pseudofirmus* bakteri izolatlarından proteaz enzimi elde etmişlerdir. *Nesternkonio* sp. proteaz enziminin pH



7,5 ile 11,5 arasında %90 aktiviteye sahip olduğunu, en yüksek aktivitesini ise pH 10,0'da gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 70°C olduğunu ve bu enzimin diğer bakterilerden elde edilen proteaz enzimleri gibi sıcaklık stabilitesi için  $Ca^{+2}$  iyonlarına gereksiniminin olmadığını belirlemişlerdir. Enzimin  $Ca^{+2}$  metal iyonları varlığında ve yokluğunda kararlılığının değişmediğini ve bu özelliği sayesinde bu enzimin deterjan uygulamaları için potansiyel olabileceğini öngörmüşlerdir. *B. pseudofirmus*'tan elde edilen proteaz enziminin ise aktivite gösterebilmek için 50°C üzerindeki sıcaklıklarda  $Ca^{+2}$ 'ye ihtiyaç duyduğunu bu sayede aktivite ve kararlılığını koruduğunu belirtmişlerdir. Enzim optimum sıcaklığının  $Ca^{+2}$  varlığında 70°C,  $Ca^{+2}$  yokluğunda ise 60°C olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sının 11,0 olduğunu ve pH 6,5-11,0 aralığında %70 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ghorbel *et al.* (2003), *B. cereus* izolatını balık sanayi bölgesinde bulunan kirli sulardan izole etmişler ve bu bakterinin organik çözücülere karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Bu bakteriden proteaz enzimi saflaştırmışlar ve bu enzimin optimum sıcaklık ve pH'sını 37°C ve 8,0 olarak belirlemişler, enzimin 50°C'de, 6,0-9,0 aralığındaki pH değerlerinde 1 ve 3 h boyunca inkübasyonu sonucunda kararlılığını koruduğunu söylemişlerdir. Enzimin termal kararlılığını sürdürebilmek adına  $Ca^{+2}$  iyonlarına gereksinim duyduğunu göstermişlerdir. Enzimin 2 mM  $Ca^{+2}$  varlığında optimum sıcaklık değerinin 60°C, yokluğunda ise 50°C olduğunu bulmuşlardır. Yine enzim aktivitesini  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ 'nin artırdığını,  $Cu^{+2}$  ile  $Zn^{+2}$ 'nin azalttığını tespit etmişlerdir. EDTA ile proteaz enziminin inhibe olduğunu bu bakımdan da bu enzimin metalloproteaz ailesinin bir üyesi olduğunu belirtmişlerdir.

Huang *et al.* (2003), *B. pumilus* izolatından bir proteaz enzimi elde etmişler ve bu enzimin tüylerin giderilmesinde fonksiyonu olduğunu deneysel olarak göstermişlerdir. Enzimin sıcaklık ve pH'larının optimum değerlerini 55°C ve 10,0 olarak bulmuşlardır.

Nascimento and Martins (2003), termofilik *Bacillus* cinsi bir bakterinin ekstraselüler proteaz enzimi üretme yeteneğine ve bu enzimin özelliklerini belirlemeye yönelik araştırmalar yapmışlardır. Proteaz enziminin optimum 60°C sıcaklıkta ve pH 8,0'de üretildiğini,  $Hg^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının bulunduğu ortamda enzim

aktivasyonunun inhibe olduğunu  $Mn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının ise enzim aktivasyonu üzerine olumlu etki ettiğini bulmuşlardır.

Bahçeci (2004), çalışmasında *B. licheniformis*, *B. pumilus* ve *B. subtilis* izolatlarından elde ettiği proteazlarının sıcaklık ile pH değerlerinin optimum  $50^{\circ}C$ - $60^{\circ}C$  ve 7,0-7,4 olduğunu tespit etmiştir. Bu bakterilerin enzimlerinin,  $80^{\circ}C$  ve pH 9,0'da stabilite gösterdiğini belirlemiştir.

Park *et al.* (2004), dört farklı proteolitik bakteri izole etmişler, bu bakterilerin biyokimyasal testler ile 16S rRNA analizleri yardımıyla *Bacillus* cinsine ait (*B. aeromonas*, *B. amyloliquefaciens*, *B. hydrophila*, *B. subtilis*) bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Proteaz enzim aktivitelerinin optimum  $40$ - $70^{\circ}C$  sıcaklık ve 8,0-8,5 pH değerlerinde olduğunu belirlemiştir.

Kazan *et al.* (2005), *B. clausii* GMBAE 42 izolatından bir alkali proteaz enzimi elde etmişler ve bu enzimin optimum sıcaklığını  $60^{\circ}C$  olarak belirlemiştir. Ancak enzimin  $Ca^{+2}$  varlığında optimal aktivitesinin  $70^{\circ}C$ 'ye yükseldiğini göstermişlerdir. 2 saat boyunca bu enzimi  $30^{\circ}C$  ve  $40^{\circ}C$ 'de pH 10,5'da inkübe etmişler ve enzimin kararlılığını koruduğunu belirlemiştir.  $50^{\circ}C$ 'de tekrarladıkları deneyde ise aktivitenin %14 oranında kayba uğradığını belirtmişlerdir. Ve son olarak enzimin %0.2 (w/v) SDS varlığında 1 saat stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Joo and Chang (2005), Batı denizi numunelerinden *B. clausii* I-52 izolatını izole etmişler ve bu izolattan proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimin %0,05  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ve %0,4 konsantrasyondaki NaCl ile aktivitesinde artış olduğunu belirlemiştir. Bu izolatın  $H_2O_2$ , SDS, bazı yükseltgenler, yüksek tuz konsantrasyonlarına ve aktif maddelere karşı göstermiş olduğu kararlılığı göz önünde bulundurarak bu enzimin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Gençkal ve Tari (2006), izole ettikleri *Bacillus* I18 izolatı için optimum sıcaklığı  $30^{\circ}C$ , *Bacillus* L18 izolatı için  $37^{\circ}C$ , *Bacillus* L2 izolatı için ise  $37^{\circ}C$  olarak bulmuşlardır. Her üç izolat için de optimum inkübasyon süresinin 96 saat olduğunu belirtmişler, L21 ile L18 izolatlarının pH'sını optimum olarak 10,0 bulmuşlardır. En

yüksek proteaz aktivitesini *Bacillus* L21 izolatının gösterdiğini belirlemiş ve enzimin geniş pH aralığında aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çalışma neticesinde bu izolatın ham ekstraktının deterjan uygulamalarında kullanılabilir olduğunu belirlemişlerdir.

Nilegaonkar *et al.* (2006), *B. cereus* MCM B-326 izolatını manda derisi örneklerinden izole etmişlerdir. Enzimin pH 9,0 ve 55°C'de optimum aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu bakteri izolatının en yüksek proteaz aktivitesini 30°C'de ve pH 9,0'da 1,5 gün içerisinde olduğunu ortaya koymuşlardır. Enzimin pH 6,0-12,0 ile 25-65°C aralığında stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Arulmani *et al.* (2007), *B. laterosporus*'dan serin proteaz enziminin karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlar ve enzimin 75°C ile pH 9,0'da optimum değerleri gösterdiğini; Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> iyonlarının varlığında aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Jaswal and Kocher (2007), *B. circulans* MTCC7906 izolatından bir proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Çalışmalarında 25°C'de, pH 10,5'te optimum proteaz üretiminin gerçekleştiğini ve enzimin; Mn<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonları ile aktive olurken NH<sub>4</sub>OH, Cu<sup>+2</sup>, EDTA ve Hg<sup>+2</sup> gibi maddelerle inhibe olduğu belirlenmişlerdir. Sonuçta bu enzimin serin proteaz ailesinden metal bağlayabilen bir enzim olduğunu belirlemişlerdir.

Rao and Narasu (2007), deri fabrikalarında bulunan çeşitli toprak örneklerinden *B. firmus* MTCC 7728 olarak tanıladıkları bir bakteri izole etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonrasında enzimin maksimum 48 saatte, 40°C sıcaklıkta ve pH 9,0'da optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Sharmin and Rahman (2007), *Bacillus* cinsi olduğunu düşündükleri bir bakteriyi *Bacillus* FS-1 olarak tanılabelirlemişler ve bakterinin bir proteaz enzimi ürettiğini bildirmişler ve bu enzimin 60°C'lik sıcaklık ve 8,5 pH'da maksimum aktiviteye sahip olduğunu ve enzimin EDTA tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Venugopal and Saramma (2007), *B. circulans* BM15 olarak belirledikleri izolattan elde ettikleri bir alkali proteaz enzimine ait karakterizasyon çalışmaları yapmışlar ve bu enzimin deterjan sanayinde kullanılabileceğini öngörmüşlerdir. Enzimin optimum pH 7,0'de aktivasyon gösterdiğini ancak genel olarak bu enzimin alkali pH'larda stabilitesini sürdürebildiğini gözlemlemişlerdir. Aynı şekilde enzimin, optimum sıcaklık değerinin 40°C olduğunu ve bir saat inkübasyon neticesinde 55°C'nin üzerinde stabil olduğunu söylemişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine Fe<sup>+3</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının aktivatör, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup> ve Co<sup>+2</sup> iyonlarının ise inhibitör etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin; SDS ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile bir saatlik inkübasyon sonrasında kararlılığını koruduğunu, EDTA ile inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir.

Reddy *et al.* (2008), *Bacillus* sp. RKY3 izolatını toprak örneklerinden izole etmişlerdir. Bu bakteri izolatından pH'sı 7,0-9,0 olan bir alkali proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Bu enzimin pH kararlılığını ölçmüşler ve pH 5,0-11,0 aralığında stabilitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin 60°C'de optimum sıcaklık değerine sahip olduğunu ve 60°C üzerindeki sıcaklıklarda stabilitesini koruyamadığını saptamışlardır. Ayrıca, enzim aktivitesini PMSF ile %100 oranında kaybettiğini, bu bağlamda bu enzimin bir serin-proteaz olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin, indirgeyici SDS'e ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı kararlılığını koruduğunu bildirmişlerdir.

Doddapaneni *et al.* (2009), çeşitli mezbaha atığı örneklerinden bir bakteri izole etmişler ve bu bakterinin proteaz enzim aktiviteine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çeşitli biyokimyasal testler ve 16S rRNA gen dizi analizi sonuçlarına göre bu bakteri izolatının *B. cereus* olabileceğini tespit etmişlerdir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerini 60°C ve 10 olarak belirlemişlerdir. Enzimin, pH 7-12'de stabilitesini koruduğunu, EDTA ile inhibe olduğunu ve aktivitesinin Cu<sup>+2</sup> ile 4 kat arttığını gözlemlemişler ve bu sonuçlar göz önüne alındığında enzimin bir metalloproteaz olduğuna karar vermişlerdir.

Haddar *et al.* (2009), *B. mojavensis* A21 adıyla tanıladıkları bakteriden BM1 ve BM2 olarak kodladıkları iki farklı alkali proteaz enzimleri izole etmişlerdir. Enzimlerin sırasıyla pH 8-10 aralığı ile 10'da optimum aktivite gösterdiğini

gözlemlemişlerdir. Her iki enzimin de, kazeinin substrat olarak kullanıldığı durumda ve 60°C’de en yüksek aktiviteyi sergilediğini bildirmişlerdir

Rao *et al.* (2009), *B. circulans* izolatından bir alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. İncelemeler sonucunda bu enzimin, yükseltgenler ve yüzey aktif maddelere dayanıklı olduğunu ve bunların varlığında dahi geniş bir sıcaklık aralığında optimum aktivite sergilediğini; 70°C civarında ve alkali pH’larda da maksimum aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca enzimin, deri ve deterjan sanayisi için bir uygulama alanının olup olmadığını test etmişler ve enzimin kan lekelerini başarılı bir şekilde hidroliz etmesi nedeniyle deterjan sanayinde uygulama alanı olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Deng *et al.* (2010), alkalofilik *Bacillus* sp. B001 bakteri izolatının yüksek proteolitik aktivite sergilediğini belirlemişler ve bu izolattan, proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Yüzey aktif maddelere ve yükseltgenlere karşı kararlı olan bu enzimin optimum pH’sını 10,0 ve sıcaklığını 60°C olarak tespit etmişlerdir. Bu özelliklerine dayanarak bu alkalın proteazın çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyelinin olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Ghafoor and Hasnain (2010), *B. subtilis* EAG-2 bakterisini bitki fidanlığından izole etmişler ve bu izolattan hücre dışı proteaz elde etmişlerdir. Enzimin pH 8,5’de ve 65°C’de maksimum proteoliz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin, 30-50°C sıcaklık değerleri aralığında 60 dakikadan sonra stabilitesini %80’e kadar koruduğunu, ayrıca enzimin pH 6,5-9,0’da 37°C’de dört saatlik inkübasyonun ardından kararlı kaldığını belirlemişlerdir. Enzimin aktivitesinin PMSF tarafından %16’ya düşürüldüğünü ve bu sonuçlar doğrultusunda enzimin bir serin proteaz olduğunu ifade etmişlerdir. Enzimin aktivitesinin  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Ba^{+2}$  ile birlikte arttığını da belirlemişlerdir.

Ramakrishna *et al.* (2010), izole ettikleri *B. subtilis* (KHS-1) (MTTC No-10110) bakterisinden proteaz enzimi elde etmişler ve bu enzimin karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Proteaz enziminin kazein substratına karşı 60°C’de ve pH 10,5’de maksimum aktivite gösterdiğini, enzimin aktivitesinin  $Ca^{+2}$  (%42) ile arttığını,

ayrıca  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi az da olsa arttırdığını belirtmişlerdir. Elde edilen proteaz enziminin PMSF tarafından büyük oranda aktivitesinin yok edildiğini ve  $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Al^{+3}$  iyonlarının da enzim aktivitesinde az da olsa bir inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Enzimin  $55^{\circ}C$ 'de uzun inkübasyon süresinde stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca enzimin, kan lekelerini temizlemede uygulama alanına sahip olduğunu söylemişlerdir.

Uyar *et al.* (2011), *Bacillus* sp. CA15 bakterisini topraktan izole etmişler ve bu izolattan alkalın proteaz enzimi saflaştırmışlardır. İzole edilen mikroorganizmanın 16S rRNA dizilimine dayanarak *B. cereus* ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Mikroorganizmanın maksimum proteaz üretiminin;  $35^{\circ}C$ 'de pH 8,0'de olduğunu belirlemişlerdir. *Bacillus* sp. CA15 alkalın proteazının; Triton X-100, Tween 20 ve SDS'e karşı stabil olduğunu ancak enzimin PMSF tarafından aktivitesinin yok edildiğini bildirmişlerdir.

Jain *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus* sp. izolatının proteaz enzim aktivitesi için sıcaklık aralığını  $40-80^{\circ}C$  (optimum  $60^{\circ}C$ ); pH aralığını 8,0-12,0 (optimum 10,0) olarak belirlemişlerdir. 5 mM PMSF ile enzimin tamamının inhibe olduğunu, 2 mM EDTA ile %7, 5 mM EDTA ile de % 51 oranında inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin, Tween 80, Triton X-100, SDS ve  $H_2O_2$ 'ye karşı kararlılığını koruduğunu,  $Ca^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi arttırdığını (%109, %198),  $Cu^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi düşürdüğünü (%37, %7, %5) gözlemlemişlerdir.

Jayakumar *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *B. pumilis* MCAS8 bakterisi için optimum proteaz aktivitesini  $37^{\circ}C$  ( $25-55^{\circ}C$ ), optimum pH'sını ise 6,0-11,0 olarak belirlemişlerdir.  $20^{\circ}C$ 'de enzimin maksimum sıcaklık kararlılığı gösterdiğini, pH 6,0 ile 11,0 aralığında ise % 60 üzeri stabil kaldığını bildirmişlerdir. PMSF ile enzimin büyük bir kısmının inhibe olduğunu (%15), DTT ile aktivasyonunun %88'e düştüğünü, Triton X-100 ile aktivitesinin %105'e, Tween 80 ile %112'ye SDS ile de %120'ye çıktığını tespit etmişlerdir. EDTA, EGTA ve ürenin aktiviteyi olumsuz etkilediğini gözlemlemişlerdir (%74, %72, %18). Yine  $H_2O_2$ 'nin aktiviteyi olumsuz etkileyerek %88'e düşürdüğünü,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının

aktiviteyi artırdığını (%107, %107);  $Zn^{+2}$ 'nin ise aktiviteyi düşürdüğünü (%22) rapor etmişlerdir.

Karbalaei-Heidari *et al.* (2013), yapmış oldukları bir çalışmada halofilik bir bakteri olan *Salinivibrio* sp. strain MS-7'den elde ettikleri proteaz enzimi için 50°C'yi optimum sıcaklık olarak bulmuşlar ve 60°C'de %20, 70°C'de %40 ve son olarak da 80°C'de %35 stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. Optimum pH'yı 8,0 olarak belirlemişler ve pH 9,0'da %80 stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. 3,3 mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 10mM EDTA ile %5, 6 mM üre ile %76 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. %1'lik SDS ile %10,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile %75, Triton X-100 ile %94,7, Tween 20 ve Tween 80 ile %100 aktivite gösterdiğini, Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının aktiviteyi artırdığını (%117, %131), Zn<sup>+2</sup> iyonunun ise inhibe ettiğini (%85) gözlemlemişlerdir.

Raval *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada haloalkalifilik bir bakterinin proteaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklık aralığının 50-80°C olduğunu, optimum sıcaklığın ise 50°C olduğunu göstermişlerdir. 2 saat 50°C'de inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin %40, 60°C'de %65, 70°C'de %70 ve 80-90°C'de ise %50 oranında stabil kaldığını belirtmişlerdir. En uygun pH aralığının 8,0-11,0; optimum pH'nın ise 10,0 olduğunu göstermişlerdir. 24 saat boyunca pH 8,0-11,0 aralığında enzim aktivitesinde minimal düzeyde kayıp söz konusu olduğundan bu aralıkta enzimin stabil olduğu sonucuna varmışlardır. Enzim aktivitesi üzerine %1 SDS'in 30 dk'da %60 oranında bir kayıba neden olduğunu, diğer taraftan kalan aktiviteyi EDTA'nın %98, DTT'nin ise %88 oranına kadar düşürdüğünü belirtmişlerdir. Enzimi PMSF'nin büyük oranda inhibe ettiğini, Tween-20 ile %80 aktivite gösterdiğini, Tween 80 ve Triton X-100 ile stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Mg<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> iyonlarının %2-6 oranında aktivite kaybına neden olduğunu, Ca<sup>+2</sup>'un ise aktivite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Vijayaraghavan *et al.* (2014), *B. cereus* strain AT bakterisinin proteaz aktivitesi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, enzim aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığının 40-50°C ve optimum sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin, 1 saat 50°C'de % 69 stabil olduğunu ve bu değer 60 °C'deki

stabiliteye göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzim aktivitesi için en uygun pH aralığının 6,0-10,0 olduğunu ve optimum pH'nın 9,0 olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim stabilitesinin pH 8,0'de %98, pH 9,0'da %100 ve pH 10,0'da %47,5 olduğunu belirtmişlerdir. % 1 SDS'in aktiviteyi artırdığı (118,2), Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının enzim aktivitesini artırmasına (%104 ve %107) rağmen, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> iyonlarının aktiviteyi düşürdüğünü (%68,5, %60, ve %84) gözlemlemişler, PMSF ile enzimin büyük oranda inhibe olduğunu, Tween 20 ile %124, Tween 80 ile %107 ve Triton X-100 ile aktivitenin %128 olduğunu bildirmişlerdir.

Yılmaz vd. (2015), yapmış oldukları bir çalışmada *B. licheniformis* A10 straininin proteaz enzim aktivitesinin optimum sıcaklığının 70°C olduğunu gözlemlemiş, 60-70°C arasında 1 saat boyunca enzim aktivitesinin %90 stabil olduğu sonucuna varmışlardır. En uygun pH aralığının 7,5-10,5 ve optimum pH'nın 9,0 olduğunu belirlemişler; SDS, EDTA ve ürenin aktiviteyi inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Aktivite üzerinde PMSF ile Zn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> iyonlarının olumsuz etkisi olduğunu, Mg<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> iyonlarının aktiviteyi artırdığını vurgulamışlardır.

El-Gendi *et al.* (2016), *B. methylotrophicus* SCJ4 straininin proteaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklık aralığının 50-70°C, optimum sıcaklık değerinin ise 55°C olduğunu ve 80°C'de enzimin aktivitesini %80 oranında kaybettiğini gözlemlemişlerdir. En uygun pH'sının 9,0 olduğunu ve pH 10,0'da stabilitesinin %20 kaybolduğunu tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine SDS ve EDTA'nın inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (%62 ve %98).

Narval *et al.* (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *B. subtilis* MTCC 10422 adlı strain için en uygun proteaz aktivitesinin 35-65°C' ler arasında olduğunu ve optimum sıcaklık değerinin de 45°C olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim 50 dk boyunca 35°C'de %99,9 stabil iken 40°C'de %82 oranında stabil kaldığı ve böylelikle sıcaklık artışının stabiliteyi olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır. En uygun pH aralığının 5,0-8,0 ve optimum pH'nın da 6,0 olduğunu gözlemlemişlerdir. Proteaz aktivitesi üzerine EDTA'nın inhibe edici etkisinin olduğunu bildirdikleri çalışmalarında; Mg<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'nin aktive edici (%206, %198), Co<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup>'nin ise inhibitör etkisinin olduğunu vurgulamışlardır.



Sarkar and Paul (2016), yapmış oldukları çalışmada *Bacillus* sp. DSP2 izolatının enzim aktivitesi için en uygun sıcaklığın 30-50°C arasında (opt. 30°C) olduğunu, aktivitenin pH 6,0-8,0 değerleri arasında (opt. 6,0) maksimum olduğunu, aktivite üzerine Fe<sup>+3</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonlarının inhibe edici, Mn<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonlarının ise aktive edici etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Hammami *et al.* (2017), *B. invictae* izolatı üzerinde yapmış oldukları bir çalışma neticesinde bakterinin enzim üretimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğu, 3 saat boyunca enzimin 30-40°C arasında %100 stabil, 50°C'de ise %64 stabil olduğu sonucuna varmışlardır. Enzim için optimum pH aralığının 8,0-12,0 ve optimum pH'nın ise 9,0-11,0 olduğunu, 60 dk boyunca 40°C'de pH 6,0 ve 13,0 aralığında enzim aktivitesinin %81'den fazlasının stabilitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. EDTA'nın inhibe edici özelliği olduğunu, Zn<sup>+2</sup> iyonunun olumsuz etki gösterdiğini ve Mn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> iyonlarının ise herhangi bir etkisinin bulunmadığını ancak PMSF ile enzimin büyük oranda inhibe olduğunu tespit etmişlerdir.

Hussain *et al.* (2017), *B. subtilis* bakterisinin enzim üretimi için en uygun sıcaklığının 57°C olduğunu, en uygun pH aralığının 8,0-11,0 olduğunu (opt. 8,0), enzim üretimi üzerine Mg<sup>+2</sup>'nin aktive edici rol oynadığını ancak Cu<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonlarının inhibe edici etkide olduğunu bildirmişlerdir.

Marathe *et al.* (2017), *Bacillus* cinsine ait bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, optimum proteaz aktivite sıcaklığının 55°C olduğu sonucuna varmışlardır. Optimum proteaz aktivite pH'sının 10,0 olduğunu, SDS'in proteaz enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğunu ispat etmişlerdir. Tween 20 ve Triton X-100'ün aktivitede %5'lik bir kayba neden olduğunu belirlemişlerdir.

Erzurum sıcak su kaynakları bakımından oldukça zengin bir şehir olmasına rağmen, yapılan literatür araştırmalarında bu alanlarda yayılım gösteren mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik kapsamlı çalışmalara az rastlanmıştır. Ayrıca şehirde yeni hizmete sunulmuş sıcak su kaynaklarında da henüz hiçbir çalışma yapılmamıştır. Söz konusu kaynaklardan yapılacak çalışmalar neticesinde izole edilecek olan biyoteknolojik ve ekonomik önemi son derece yüksek

olan termofillerin bilim dünyasına kazandırılması yanında ülke ekonomisine önemli katkıda bulunacağı da aşikardır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez kapsamındaki araştırmalarda çalışılan su rnekleri; Erzurum İli'nde bulunan İlıca, Hasankale-Pasinler ve Nene Hatun termal su kaynaklarından temin edildi.

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Derin Dondurucu (-20) (J.P. Selecta)

Buzdolabı (Edesa)

CO<sub>2</sub>'li İnkübatör (Esco)

Çalkalamalı İnkübatör (Zhicheng-Zhwy-2102c)

Derin Dondurucu (-86) (Esco, Uus-439b)

Elektroforez tankı (Biorad-yatay)

Güç kaynağı (Biorad, PowerPac)

Hassas Terazı (Shimadzu)

Isıtıcı Blok (Bioer)

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Daihan, Shr)

Masaüstü Ph Metre (Adwa, AD1000)

Mikrodalga Fırın (Vestel)

Mikroskop (Zeiss, Prima Star)

Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go)

Otoklav (JSR, Jsac-60)

PCR Cihazı (Sensoquest)

Saf su cihazı (GFL)

Santrifüj (Hettich Zentrifugen Universal 320R)

Spektrofotometre (Biotek EPOCH)

Steril Kabin (Esco NordicSafe™ Class II Biological Safety Cabinet)

Su Banyosu (Daihan)

Terazi (Desis, NHB)

Ultra Saf Su Cihazı (Millipore, Q-3w)

Vorteks (Wisd Wisemix VM-10)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Agar, Amfisilin, Amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ), Bromfenol blue, BSA, CTAB, Çinko sülfat heptehydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Demir (3) klorür ( $\text{FeCl}_3$ ), DMSO, dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM), DTT, EDTA, EGTA, Et özütü, Ethidium bromür, Etil alkol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1), Fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), Fruktoz, Galaktoz, Gliserol, Glisin-NaOH, Glukoz, Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), IPTG, İyodür ( $\text{I}_2$ ), İzopropanol, Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ), Kalsiyum sülfat ( $\text{CaSO}_4$ ), Karbol fuksin, Kazein, Kloroform: izoamilalkol (24:1), Kristal viyole boya solüsyonu, Laktoz, Lügol, Magnezyum klorür ( $\text{MgCl}_2$ ), Magnezyum sülfat heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Maltoz, Mangan klorür ( $\text{MnCl}_2$ ) Metilen mavisi, Nişasta, Nitrik asit, Pepton, Potasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Potasyum hidroksit (KOH), Potasyum iyodür (KI), Proteinaz K, RNase, Sakaroz (sükroz), SDS, Skim milk, Sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), Sodyum bisfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum sitrat, Sulu fuksin, TAE, Taq DNA polimeraz, Tirozin, Trikloroasetik asit (TCA), Tris, Tris-HCl, üre, X-gal, Yeast extract.

### 3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

**Nutrient agar (NA):** (Bileşeni (g/L); Agar: 12,0, Peptone: 5,0, Beef Extract: 3,0, Sodium Chloride: 8,0) 1 L distile su (dH<sub>2</sub>O) içerisine 28 g Nutrient Agar karışımı (Sigma) ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilerek 45°C’ye ulaştıktan sonra petrilere döküldü (Lelliot and Stead 1987).

**Nutrient broth (NB):** (Bileşeni (g/L); Beef Extract: 1,0, Yeast Extract: 2,0, Peptone: 5,0, Sodium Chloride: 5,0) 13 g Nutrient Broth besiyeri (Sigma) 1 L dH<sub>2</sub>O içerisine eklenerek, karışım otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi (Lelliot and Stead 1987).

**Luria Bertani (LB) Agar:** (Bileşeni (g/L); Tryptone: 10,0, Yeast Extract: 5,0, Sodium Chloride: 10,0, Agar: 15,0) Luria Bertani Agar besiyerinden 35 g alındı ve 1 L distile suda çözüldükten sonra, 15 dk boyunca 121°C sıcaklıkta otoklavlandı. Otoklav sonrasında besiyeri petrilere dökülerek katılaşması beklendi (Lelliot and Stead 1987).

**Luria Bertani (LB) Broth:** (Bileşeni (g/L); Tryptone: 10,0, Yeast Extract: 5,0, Sodium Chloride: 10,0) 1 L distile su içerisine Luria Bertani Broth besiyerinden 20 g ilave edilerek çözüldükten sonra 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlandı (Lelliot and Stead 1987).

**Triptic Soy Agar (TSA):** (Bileşeni (g/L); Tryptone: 15,0, Soy Peptone: 5,0, Sodium Chloride: 5,0, Agar: 15,0) Triptic Soy Agar besiyeri 1 L distile su içerisine 40 g olacak şekilde ilave edilerek çözdürüldü ve 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrasında besiyeri petrilere dökülerek katılaşması beklendi (Klement *et al.* 1990).

**Plate Count Agar (PCA):** (Bileşeni (g/L); Tryptone: 5,0, Yeast Extract: 2,5, Glucose: 1,0, Agar: 12,0) 1 L distile su içerisinde 20,5 g PCA besiyeri çözdürülerek 121°C’de 15 dk boyunca otoklavlandı (Klement *et al.* 1990).

**Brain Heart Infusion Agar:** (Bileşeni (g/L); Nutrient substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar): 27,5, Glucose: 2,0, Sodium Chloride: 5,0) Brain Heart Infusion Agar besiyerinden 52 g tartılarak hazırlandı ve 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlandı (Klement *et al.* 1990).

**Anaerobik Agar:** (Bileşeni (g/L); Casein enzymic hydrolysate: 20,0, Dextrose: 10,0, Sodium chloride: 5,0, Sodium thioglycollate: 2,0, Sodium formaldehyde sulphoxylate: 1,0, Methylene blue: 0,002, Agar: 20,0) 1 L distile su içerisine 58 g Anaerobik agar besiyeri ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Daha sonra besiyeri, 15 dk boyunca 121°C’de otoklavlandı. (Klement *et al.* 1990).

### 3.1.4. Kullanılan çözeltiler

**%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi:** 80 ml distile su içerisinde önce 4,09 g NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözüldü. Toplam hacim 100 ml’ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

**%10’luk SDS çözeltisi:** 100 ml distile su içerisinde 10 g SDS çözdürüldü ve otoklavda steril edildi. Hazırlanan çözelti kullanılmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

**%3’lük KOH çözeltisi:** 100 ml steril distile su içerisinde 3 g KOH çözülerek hazırlandı (Fahy and Hayward 1983).

**%30’luk Gliserol:** 70 ml steril distile su üzerine 30 ml gliserol ilave edildikten sonra otoklavlandı ve 121°C’de 15 dk steril edilerek hazırlandı (Klement *et al.* 1990).

**%7’lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi:** 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hacmi steril distile su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlandı (Lelliot *et al.* 1966).

**%70'lik Etil alkol:** 70 ml saf etil alkolün hacmi steril 100 ml'ye tamamlandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (Klement *et al.* 1990).

**0.5 M Sodyum Karbonat çözeltisi:** 100 ml dH<sub>2</sub>O'da 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözünmüştür (0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5,3g/100ml) (Tekin 2008).

**1X TAE tamponu:** 100 ml 10X TAE tamponu 900 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı (Görmez 2011).

**1XTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 8,0'e ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlandı ve otoklavda steril edildi (Görmez 2011).

**2N Folin Reaktifi:** dH<sub>2</sub>O ve Folin Reaktifi 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır (Tekin 2008).

**5 M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl 100 ml distile su içerisinde çözüldü ve otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

**6X yükleme tamponu:** %100 lük gliserolden 40 ml ile 0,1 g bromfenol blue karıştırıldı ve son hacmi 1XTAE ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi (Görmez 2011).

**Amfisilin çözeltisi:** 20 mg amfisilin, 1 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü. 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek sterilizasyonu yapıldı. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (Baltacı 2015).

**Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0):** 45 ml distile suda, 0,205 g sodyum asetat çözüldü. 1 N asetik asit ile pH'sı 4,0'e ayarlandı. Hacim 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0):** 45 ml distile suda 0,205 g sodyum asetat çözüldü. 1 N asetik asit ile pH'sı 5,0'e ayarlandı. Hacim 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Ethidium bromür çözeltisi:** 100 ml distile su içerisinde 1 g ethidium bromür (10 mg/ml) iyice çözüldü. Karanlık şartlarda ve oda sıcaklığında muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

**Fenol: kloroform: izoamilalkol çözeltisi:** 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**Gitschier tamponu:** 200 ml için; 16,6 ml 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 6,7 ml 1 M MgCl, 1,3 ml 0,5 M EDTA (pH 8,8) çözeltilerinin 1:100 lük dilüsyonu ve 2,08 ml 14,4 ml β-mercapto-ethanol ticari solüsyonundan alınarak hazırlanan solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml sdH<sub>2</sub>O ile 200 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan karışımdan 1,5 ml'lik eppendorf tüplere paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (Rademaker and Bruijn 1997).

**Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0):** 45 ml distile suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 10,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,0):** 45 ml distile suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 11,0'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12,0):** 45 ml distile suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 12,0'ye ayarlandı ve son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).



**IPTG:** 23,8 mg IPTG, 1 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve 0,22 µm çapında milipor filtreden geçirilerek sterilize edildi. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (Baltacı 2015).

**Kalsiyum klorür çözeltisi:** 1,11 gr CaCl<sub>2</sub>, 100 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve otoklavlandı. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı (Baltacı 2015).

**Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi:** 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**Kristal violet çözeltisi:** 100 ml steril distile su içerisine 0,5 g kristal violet çözümlenerek hazırlandı.

**Lügol Çözeltisi:** 1 g iyot ve 2 g KCl tartıldı, toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Klement *et al.* 1990).

**Proteinaz K:** 1 ml steril distile su içerisine 20 mg proteinaz K hazırlandı ve hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (Wilson 1997).

**Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 6,0):** 90 ml distile suda 0,04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ve 0,29 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O çözüldü. pH'sı 6,0'ya ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0):** 90 ml distile suda 0,27 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ve 0,19 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O çözüldü. pH'sı 7,0'ye ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA distile su ile çözdürülerek 1 N HCl ile pH'sı 8,0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi (Görmez 2011).

**TCA (Trichloro asetic asit) Çözeltisi:** 98 ml dH<sub>2</sub>O'da; 0,1 M TCA (1,633g/100ml) ve 0,22 M sodyum asetat (2,993g/100ml) çözdürülmüş ve akabinde 0,33M asetik asit (1,891ml/100ml) ile hacmi 100 ml olarak ayarlanmıştır (Tekin 2008).

**Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0):** 45 ml distile suda 0,3028 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,0 yapıldı ve son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0):** 45 ml distile suda 0,3028 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 9,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı (Sarı 2016).

**X-gal solüsyonu:** 1 ml dimetilformamid içinde 40 mg X-gal çözüldü ve hazırlanan çözelti kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı (Baltacı 2015).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Araştırma kapsamında kış (Aralık-Ocak) ve bahar dönemlerinde (Nisan) termal su kaynaklarından aseptik koşullarda ağzı kapaklı şişelere ve termoslara su örnekleri alınarak uygun koşullarda laboratuvara getirildi. Örnekler; NA, TSA, PCA ve LBA katı besiyerleri ile NB, TSB ve LB sıvı besi yerlerine ekildi. Kültürler 45°C, 55°C ve 65°C'lik inkübatörlerde inkübasyona bırakıldı. Gelişen bakteri kolonileri incelenerek morfolojik olarak birbirinden farklı olanlar seçildi ve bu kolonilerin saf kültürleri hazırlanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda saf kültürlerden alınıp 500 µl %30'luk gliserol ve 500 µl LB Broth ihtiva eden eppendorf tüplere aktarıldı. Tüpler etiketlenerek karıştırıcıda karıştırıldı ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.2.a. Hücre Morfolojisi Testi**

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kültürleri havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Tespit işleminden sonra lam üzerine kristal viyole boya solüsyonu ilave edilerek, 3-4 dk bekleddikten sonra, saf su ile yıkanıp kurutuldu ve mikroskop altında incelendi (Saygılı 1995).

#### **3.2.2.b. Gram Boyama:**

NA besiyerinde inkübe edilen bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınan bakterilerin serum fizyolojik ile lam üzerinde yayma işlemi gerçekleştirildi. Akabinde lam ateşten geçirilerek fikse edildi. Elde edilen preparat üzerine önce kristal viyole boya solüsyonu ilave edilerek 2 dk beklendi. Süre sonunda preparat sudan geçirildi ve lügol solüsyonu ilave edildi. Bu işlem için 1 dk beklendi. Süre sonunda su ile yıkama yapılarak %96'lık etil alkol ile deklorizasyon işlemi için 15-20 sn. beklendi. Su ile yıkama yapıldı ve son olarak sulu fuksin boyası ilave edilerek 2 dk beklendi ve preparat yıkanarak üzerindeki boyalar uzaklaştırıldı. Kurutma işlemini takiben mikroskopta inceleme yapıldı (Harley 2002; Özkan 2009).

#### **3.2.2.c. Spor boyama:**

Bakterilerin NA'da bir gecelik kültürlerinden saf koloni alınarak fizyolojik solüsyon yardımıyla lam üzerine yayıldı. Preparatlar havada kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparatlar önce karbol fuksin ile 5 dk ısıtılarak boyandı. Preparatlar yıkandıktan sonra %10'luk nitrik asitle 10 sn. muamele edildi ve su ile yıkandı. En sonda metilen mavisi ile 2 dk boyanan preparatlar yıkanıp kurutularak mikroskopta inceleme yapıldı (Harley and Prescott 2002; Pirinççioğlu 2010).

### **3.2.2.d. Hareket Testi**

Testi yapılacak bakteriler önce NB besiyerinde geliştirildi. Bu yöntemle inceleme yapabilmek için özel lamalar (ortası çukur lamalar) kullanıldı. Temiz bir lamelin dört köşesine çok az miktarlarda vazelin sürüldü ve taze sıvı kültürden bir öze dolusu alınarak lamelin ortasına konuldu. Çukur lam ters çevrilerek çukur kısmı kültürün üzerine gelecek şekilde kapatıldı. Lamı seri bir şekilde ters çevirerek lamelin üste gelmesi sağlandı ve lamelin üzerine konan sıvı kültürün asılı halde (boşlukla sarkar bir durumda) kaldığı kontrol edildi. Hazırlanan asılı damla preparatı mikroskopta incelendi (Saygılı 1995).

### **3.2.3. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.3.a. Bakteri İzolatlarının Gelişimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi**

Bakteri izolatları 1'er ml NB (pH: 7,0) besiyeri içeren tüplere inokule edilerek 45°C ve 55°C'de, 160 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68 ve 76. saatlerde 470 nm, 540 nm ve 600 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçülerek gelişim için en uygun süre ve dalga boyu tespit edildi (Dülger vd 1997; Matpan 2007; Pirinççioğlu 2010).

#### **3.2.3.b. Bakteri İzolatlarının Gelişimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

100 ml NB besiyerine (pH: 7,0) izolatlardan 1'er ml ekim yapıldı ve 20-25-30-35-40-45-50-55-60-65-70°C'de her izolat için optimum üreme zamanında, 160 rpm çalkalayıcıda bekletildi ve kültürlerin 470 nm, 540 nm ve 600 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü (Harley and Prescott 2002).

### **3.2.3.c. Bakteri İzolatlarının Gelişimi Üzerine pH'nın Etkisi**

100 ml NB besiyerleri pH 3-4-5-6-7-8-9-10-11 olacak şekilde ayarlanıp hazırlandı ve 1'er ml izolatlardan ekim yapıldı. Her izolat optimum üreme zamanı ve sıcaklığında 160 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı ve kültürlerin 470 nm, 540 nm ve 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı (Dülger vd 1997).

### **3.2.3.d. Bakteri İzolatlarının Sodyum Klorür İhtiyaçlarının Belirlenmesi**

İzolatların sodyum klorür (NaCl) ihtiyaçlarının belirlenebilmesi amacıyla %2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 oranında sodyum klorür ihtiva eden NB besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerine herbir izolattan ekim yapılarak, optimum süre ve sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bakterilerin spektrofotometrede (470 nm, 540 nm ve 600 nm'de) absorbans ölçümleri yapılarak izolatların gelişim gösterdiği optimum tuz miktarları tespit edildi (Tamer vd. 1989).

### **3.2.3.e. Bakteri İzolatlarının Gelişimi Üzerine Oksijenin Etkisi**

İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla, deney tüplerinde hazırlanan Brain Heart Infusion Agar besiyerlerine herbir izolattan ekim yapıp karıştırılarak su içerisinde donması sağlandı. Uygun şartlarda inkübe edildikten sonra, tüp içerisinde üremiş oldukları alanlar esas alınarak izolatların oksijen istekleri tespit edildi (Pirinççioğlu 2010).

### **3.2.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.4.a. Amilaz Testi**

Bu test, bakteri izolatlarının amilaz enzimi aracılığıyla nişastayı parçalayıp parçalamadıklarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bakteri izolatları, %1 oranında nişasta ihtiva eden NA besi ortamına çizgi ekimi yapılarak 3 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda petriler, lügol çözeltisi ile muamele edilerek mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip ekim çizgileri etrafında açık zon oluşturanlar ise pozitif olarak değerlendirildi (Klement *et al.*, 1990).

#### **3.2.4.b. Katalaz Testi**

Katalaz enzimi, hücreler için zararlı olan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'i parçalayarak su ve oksijene dönüşümünde görev yapan bir enzimdir. Katalaz enzimin varlığını tespit etmek amacıyla, 18-24 saat içerisinde geliştirilen bakteri izolatlarından örnekler alınıp üzerine %3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edildi. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990).

#### **3.2.4.c. Oksidaz Testi**

Oksidaz testi, bakteri izolatlarının elektron transferinde görev yapan sitokrom C enzimine sahip olup olmadığını göstermektedir (Acar 2009). Bu test için N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride içeren özel stripler kullanıldı (Bactident Oxidase). Öze ile alınan bakteri izolatları sribin uç kısmına inokule edildi. Renk değişimi olanlar pozitif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002).

#### **3.2.4.d. Proteaz Testi**

Bu test, bakteri izolatlarının süt proteini olan kazeinin, proteaz enzimi varlığıyla hidrolizini tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Bu amaçla hazırlanan %10 skim milk içeren besi ortamına izolatlar çizgi ekim yapılarak 3 gün süreyle inkübe edildi. Kolonilerin etrafında oluşan zonlar pozitif olarak değerlendirildi (Matpan 2007).

#### **3.2.4.e. Lipaz Testi**

Bakteri izolatlarında yağları hidroliz eden lipaz enzimi varlığını analiz etmek amacıyla bu test yapılmaktadır. Bu amaçla; 1,25 g pepton, 0,75 g et özütü, 2,5 g tereyağı ve 3,79 g agar içeren besi ortamı (250 ml) hazırlanıp otoklavlandı. Hazırlanan besi ortamına bakteri izolatlarının çizgi ekimi yapılarak 3 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında görülen zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Sonuç çıplak gözle fark edilemediğinde petrilere  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi eklendi ve bu durumda yeşilimsi renk verenler pozitif olarak değerlendirildi (Pirinççioğlu 2010).

#### **3.2.4.f. Karbon Kaynağı Kullanımı**

Bakteri izolatlarının kullanabildiği karbon kaynaklarını tespit etmek amacıyla; gelişimin minimum olduğu 10 kat seyreltilmiş NB ve LB besiyerleri hazırlandı ve otoklavlandı. Daha sonra bu besiyerlerine %1 oranında miniporlu filtre ile steril edilen glukoz, galaktoz, fruktoz, sakkaroz (sükroz), maltoz, laktoz ve sodyum sitrat karbon kaynakları ilave edildi. Bakteri izolatlarından 1 ml alınarak hazırlanan besi yerlerine ekim yapıldı ve 1-3 gün süreyle inkübe edildi. Negatif kontrol olarak karbon kaynağı ilave edilmeyen besi ortamlarında geliştirilen kültürler kullanıldı. İzolatların gelişimini tespit etmek amacıyla 540 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılarak, absorbans değerleri belirlendi (Pirinççioğlu 2010).

### 3.2.5. Bakteri İzolatların Moleküler Tanılaması

#### 3.2.5.a. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında sıcak su kaynaklarından elde edilen bakteri izolatlarından DNA izole etmek için Lazo *et al.*(1987), Ausubel *et al.* (1994), Kohoodoo and Jaufferally-Fakim (2004)'in kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulandı.

1. DNA ekstraksiyonları amaçlanan bakteri izolatları NA besiyerine ekilerek optimum üreme sıcaklığına ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyondan sonra strainler, 2-3 öze dolusu toplanarak ağzı kapaklı, steril ve içerisinde, 800 µl STE tamponu (hücre duvarlarının parçalanıp hücre içeriğinin açığa çıkarılmasına neden olur) bulunan 1,5 ml'lik eppendorflara konuldu. Tüpler, karışım homojen oluncaya kadar vortekslendi.

3. Homojen tüpler 10 dk boyunca 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım uzaklaştırılarak pelet üzerine 800 µl STE tamponu ilave edildi. 10 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi.

4. Tüplerden süpernatant kısım uzaklaştırıldı, pelet üzerine 400 µl STE tamponu ilave edildi ve karışması sağlandı.

5. Homojen hale gelen tüpteki karışım, su banyosunda 75°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.

6. 30 dk'lık inkübasyondan sonra tüpler üzerine %10'luk SDS'den 50 µl ilave edilerek disülfid bağlarının hidrolizi amaçlandı. Daha sonra proteinaz K enziminden 2µl ilave edildi ve su banyosunda 40°C'de 1 saat inkübe edildi.

7. İnkübasyon sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler üzerine, tüp içerisindeki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M aralığında olacak bir şekilde 5 M NaCl ile tüpteki hacmin 0,1'i kadar %10'luk CTAB/0,7 M NaCl ilave edildi ve ayarlandı. Tüpler su banyosunda 65°C'de 10 dk boyunca inkübe edildi.

8. İnkübasyonun ardından tüplerdeki hacim kadar 24:1 kloroform:izoamilalkol (Kloroform, protein denatürasyonu için kullanılır ve organik kısım ile sıvı fazın



ayrılmasına neden olur. İzoamilalkol, parçalanmalar sırasında oluşabilecek köpürmeleri önler) ilave edildi ve 10 dk süresince çalkalayıcıya bırakıldı.

9. Çalkalayıcıdan alınan tüpler, 14 000 rpm'de 15 dk +3°C'de santrifüjlendi.

10. Üstteki kısım yeni steril ve soğutulmuş tüpler içerisine alındı ve tüplerdeki hacmin 0,1'i kadar %10 CTAB/0,7 M NaCl (tüp içerisinde kalmış olabilecek polisakkarit kalıntılarını uzaklaştırır) eklendi.

11. Tüpler 65°C'de su banyosu içerisinde 10 dk boyunca inkübe edildi.

12. Su banyosundan çıkarılan tüpler üzerine içinde bulunan miktar kadar 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 15 dk boyunca çalkalandı.

13. Çalkalamadan sonra tüpler 15 dk boyunca 14 000 rpm'de santrifüjlendi, daha sonra elde edilen üst kısım yeni ve steril tüplere aktarıldı.

14. Tüplere aktarılan üst fazın üzerine eşit hacimde -20°C'de muhafaza edilen 24:1 kloroform:izoamilalkol çözeltisi eklendi.

15. Karışım çalkalayıcıda 10 dk çalkalanarak tüpler 10 dk, 14 000 rpm'de santrifüjlendi.

16. Oluşan üst kısım yeni steril ve soğukta bekletilmiş tüplere transfer edildi ve içindeki hacmin 0,8'i kadar, daha önceden -20°C'de bekletilen izopropanol ilave edildi. Bu sayede DNA'nın iplik formda çökmesi sağlandı. İzopropanol eklenen tüpler karıştırılarak DNA'ların toplanması sağlandı.

17. DNA'ları çöktürülen tüpler -20°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

18. -20°C'de 1 gece bekletilen tüpler, 14 000 rpm'de, -2°C'de, 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Dipte kalan pelete daha önceden -20°C'de muhafaza edilen %70'lik etil alkolden 500µl eklenerek tüpler, yeniden 14 000 rpm'de -2°C'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Peletin tamamen kuruması için tüpler, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

19. Tüplere 50 µl TE çözeltisi konularak DNA'nın çözünmesi sağlandı. 30 dk bekletildi ve üzerlerine 2 µl RNAse eklendi.

21. Tüpler, -80°C'deki derin dondurucuda kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

### **3.2.5.b. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi**

Agaroz jel elektrofrez, Görmez (2011) tarafından kullanılan yöntemden modifiye edilerek uygulandı. 1,0 g agaroz tartıldı ve üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklendi ve karışım mikrodalga fırında çözdürüldü. Çözünme işlemi takiben soğutularak içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan ethidium bromür eklendi. Hazırlanan jel karışımı elektrofrez için özel olarak tasarlanmış içerisinde tarakların bulunduğu küvete dökülerek 30 dk boyunca jelin donması ve katılaşması beklendi. Taraklar dikkatlice çıkarılarak, 1X TAE tamponu ihtiva eden elektrofrez tankına alındı. Taraklarla oluşturulan çukurların ilk kuyusuna 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp) konuldu. Yükleme yapılacak örneklerden 10 µl alınarak öncelikle 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve kuyulara yüklendi. Jel sistemi hazırlandıktan sonra düzenek, 90 voltta 1 saat yürütüldü. İşlem akabinde oluşan DNA bantları, ethidium bromür yardımıyla görüntülendi ve analiz edildi (Görmez 2011).

### **3.2.5.c. Bakteri İzolatlarının ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PCR Yöntemiyle Gen Profillerinin Belirlenmesi**

PCR yapılacak her bir örnek için; 10,2 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl Gitschier Buffer, 2,5 µl DMSO, 1,25 µl BSA, 1,25 µl dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 10 mM), 4 µl ERIC R ve 4 µl ERIC F, 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 1,5 µl kalıp DNA kullanılarak mix hazırlandı.

Örnekler PCR cihazına konuldu ve denaturasyon basamağı için 94°C'de 7 dk ve takip eden denaturasyon için 94°C'de 1 dk, başlangıç basamağı için 53°C'de 1 dk ve uzama basamağında ise 65°C'de 8 dk olmak üzere, bu üç basamak için toplam 35 tekrar ve son tekrarda uzama basamağında 65°C'de 16 dk olacak şekilde programlandı ve istenen DNA bölgeleri çoğaltıldı (Görmez, 2011).

### **3.2.5.d. ERIC PCR Ürünlerinin Elektroforezi**

1,0 g agaroz tartıldıktan sonra üzerine 100 ml 1X TAE tamponu ilave edilerek karışım iyice homojen olana kadar mikrodalga fırında çözdürüldü. Çözünme işlemini takiben soğutularak içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan ethidium bromür eklendi. Hazırlanan jel karışımı elektroforez için özel olarak tasarlanmış içerisinde tarakların bulunduğu elektroforez küvetine dökülerek 30 dk boyunca jelin donması ve katılaşması beklendi. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak, 1X TAE tamponu ihtiva eden elektroforez tankına alındı. Taraklarla oluşturulan çukurların ilk kuyusuna 1 kb DNA markırı konuldu. Yükleme yapılacak örneklerden 10 µl alınarak öncelikle 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve kuyulara yüklendi. Jel sistemi hazırlandıktan sonra düzenek, 90 volta 1 saat yürütüldü. İşlem akabinde oluşan DNA bantları, ethidium bromür yardımıyla görüntülendi ve analiz edildi (Görmez 2011).

### **3.2.5.e. Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

ERIC PCR sonucunda farklı bant profili sergileyen izolatların proteaz aktivitesinin tespiti amacıyla NA besiyeri %10 oranında skim milk içerecek şekilde hazırlandı. Bakteriler besiyerine inoküle edildi ve optimum sıcaklıkta, 3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Besi ortamında proteolitik zon oluşturan izolatlar belirlendi ve hidroliz zonlarının çapları kıyaslanarak göreceli olarak en iyi proteaz üreticisi olan suşlar belirlendi (Matpan 2007).

### **3.2.5.f. Proteaz Aktivitesi Gösteren Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu**

ERIC PCR sonucunda farklı bant profili sergileyen ve akabinde yapılan proteaz aktivitesi sonucunda pozitif olarak değerlendirilen izolatların genomik DNA'ları 16S rRNA bölgesi evrensel primerleri (forward; 27F=5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve reverse; 1492R=5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. 16S rRNA PCR yöntemi, Görmez (2011) tarafından kullanılan protokolden modifiye edilerek uygulandı. PCR işlemi için numune başına 10X PCR tamponundan 3 µl; dNTP mixinden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM) 0,6 µl;

forward ve reverse primerlerden 3'er µl; DMSO'dan 1,2 µl; MgCl<sub>2</sub>'dan (50 µM) 1,8µl; 5 unit/µl *Taq* DNA polimerazdan 0,3 µl ve sdH<sub>2</sub>O'dan 12,1 µl olacak şekilde toplam 25µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımlara 5 µl template DNA eklenerek toplam hacim 30 µl 'ye tamamlandı. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirildi.

Döngü protokolü; 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, takiben 34 döngü 94°C'de 1 dk denatürasyon, 34 döngü 48°C'de 1 dk bağlanma ve 34 döngü 72°C'de 1,5 dk uzama basamakları ile son olarak 72°C'de 8 dk uzama basamağından oluşacak şekilde ayarlandı ve 16S bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

### **3.2.5.g. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektrofrez**

1,0 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde çözdürüldü. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Akabinde elle dokunulabilir dereceye kadar soğutularak içerisinde konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan ethidium bromür eklendi. Hazırlanan jel karışımı elektroforez için özel olarak tasarlanmış içerisinde tarakların bulunduğu küvete dökülerek 30 dk boyunca jelin donması ve katılaşması beklendi. Tarakları dikkatlice çıkarılan jel, 1X TAE tamponu ihtiva eden elektroforez tankına alındı. Taraklarla oluşturulan ilk kuyuya 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp) konuldu. Yükleme yapılacak örneklerden 10 µl alınarak öncelikle 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve sonra kuyulara yüklendi. Jel sistemi hazırlandıktan sonra düzenek, 90 voltta 1 saat yürütüldü. İşlem akabinde oluşan DNA bantları, ethidium bromür yardımıyla görüntülendi ve jel görüntüleme sistemi yardımıyla analiz edildi (Görmez 2011).

### **3.2.5.h. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Kompetant *E. coli* Hücrelerine Klonlanması**

#### **Kompetant Hücre Hazırlanması**

Çalışmada kompetant hücre yapımında *E.coli* JM101 straini kullanıldı. Bu amaçla LBA' da geliştirilen kültürlerden tek koloni alınarak LB-Broth besiyerinde 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası geliştirilen kültürlerden 1/10 oranında seyreltme yapılarak spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonucu elde edilen değerler 10 ile çarpılarak, ml cinsinden sonuçlar hesaplandı. Absorbans değeri OD600=0,1 olacak şekilde çalışma konsantrasyonu hazırlanarak 37°C'de 60-90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince 15 dk aralıklarla OD600 değeri 0,6'ya yaklaşıncaya kadar ölçümler alındı. Optimum değer görülünce örnekler +4°C'de 7 dk 4 500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine, 2 500 µl CaCl<sub>2</sub> eklendi ve tüpe hafifçe vurularak çözdürüldü. 45 dk boyunca buz üzerinde bekletilen örnekler +4°C'de 10 dk, 4 500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine yeniden 500 µl CaCl<sub>2</sub> eklenerek hassas bir şekilde pelet çözdürüldü ve örnekler 1 gece (12 saat) buzdolabında (+4°C) bekletildi (Tarakçioğlu, 2016).

#### **Ligasyon Basamağı**

5 µl 2X ligasyon buffer, 3 µl PCR ürünü, 1 µl 1:1 oranında sulandırılmış vektör (pGEM®-T Easy) ve 1 µl T4 DNA ligaz olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı PCR tüplerine dağıtılarak 16°C'de 14 saat cihazda bekletildi (Tarakçioğlu, 2016).

#### **Transformasyon**

Hazırlanan kompetant hücrelerden her bir eppendorf tüp içerisine 200 µl konuldu. Daha sonra 5 µl ligasyon ürünü tüplere dağıtıldı ve buz üzerinde 30 dk boyunca bekletildi. Akabinde 42°C'ye ayarlı su banyosunda 2 dk bekletilen örnekler üzerine 200 µl LB besiyeri eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda 40 µl X-gal ile 40 µl IPTG eklenerek hazırlanan amfisilinli katı besiyeri

üzerine örneklerden alınan üst fazın ekimi yapıldı. Hazırlanan petriyeler, 37°C'de 14 saat inkübasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü içermeyen örnek kontrol olarak kullanıldı (Sarı, 2016).

### **Koloni Seçme ve Sıvı Kültüre Alma**

Ligasyon süresi sonunda oluşan mavi ve beyaz renkli kolonilerden transformasyonun gerçekleştiği beyaz renkli kolonilerin seçimi için örnekler, +4°C'de 1 saat bekletildi. Seçilen beyaz koloniler ile PCR işlemi gerçekleştirildi.

### **Koloni PCR**

16,1 µl dH<sub>2</sub>O, 3 µl 10X PCR bufferı, 0,6 µl dNTP, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl T7 primeri (5'-AA TAC GAC TCA CTA TAG-3'), 1,5 µl SP6 primeri (5'-AT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'), 1,2 µl DMSO ve 0,3 µl Taq DNA polimeraz karışımından oluşan PCR master mixi içerisine seçilen koloniler inoküle edildi. PCR şartları; ön denatürasyon için; 94°C'de 2 dk, denatürasyon 94°C'de 30 sn, bağlanma 55°C'de 30 sn ve uzama için 72°C'de 2 dk olacak şekilde 35 döngü ve son uzama basamağı da 72°C'de 10 dk olacak şekilde oluşturuldu (Baltacı 2015).

PCR reaksiyonu sonucunda örneklerin görüntülenmesi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler jele yüklendikten sonra 90 voltta 1 saat yürütülerek transforme edilen geni taşıyan kolonilerden en net görüntü verenler seçildi. Seçilen koloniler plazmid izolasyonu için, amfisilin içeren LB sıvı besi yerine inoküle edildi.

## Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için LB besi yerine alınan kültürler 37°C'de 12 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda plazmid izolasyonu, plazmid DNA ekstraksiyon kiti (Vivantis GF-1) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre;

1. Falkon tüpü içerisinde 12 saat inkübasyona bırakılan örnekler, 6 000 g'de 2 dk santrifüj edildi.

2. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant uzaklaştırılıp oluşan pelet üzerine 250 µl Resüpsansiyon Solüsyonu ilave edilerek pipet yardımıyla çözdürüldü.

3. Örneklerin üzerine 250 µl Lizis Solüsyonu ilave edilip bir kaç kez ters çevrilerek hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonucunda tüplere 400 µl Nötralizasyon Bufferı ilave edilip beyaz bir çökelti oluşuncaya kadar bir kaç kez ters çevrilerek hafifçe karıştırıldı ve 14 000 g'de 10 dk santrifüj edildi.

5. Santrüj sonucunda oluşan süpernatanttan 650 µl alınarak içerisinde kolon bulunan eppendorf tüpüne aktarıldı ve 10 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kolona tutunamayan sıvı kısım uzaklaştırılarak bu işlem kalan süpernatantın tamamı için bir kaç kez tekrar edildi.

6. Eppendorf tüplerinin üzerine 650 µl Wash Buffer eklenerek 10 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında altta toplanan sıvı kısım uzaklaştırıldı.

7. Kolon, 1,5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 55 µl Elüsyon Bufferı ilave edildi. 1 dk bekleme süresinin ardından 10 000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

8. Elde edilen plazmidlerin konsantrasyonları nanodropta ölçüldü. Ayrıca plazmidler %1'lik agoroz jelde yürütülerek görüntülendi ve yeniden kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.5.1. 16S rRNA Sekans Analizi**

PCR ile amplifiye edilip pGEM-T Easy vektörü aracılığıyla klonlaması yapılan örneklerin 16S rRNA gen bölgelerinin baz dizi analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Plazmid örneklerinden 50 µl alınarak, sekans analizi için MedSanTek (Türkiye) firmasına gönderildi. Gelen sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak yorumlandı. Sekans dizileri Fasta formatına dönüştürüldü ve vektöre ait sekanslar tespit edilip, çıkarılarak dizi anlamlı hale getirildi. 16S rRNA dizileri Gen Bankasına (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) girilerek kayıtlı olan bakteriyel dizilerle kıyaslandı (BLAST analizi). Bu sayede bakteri izolatlarının tür seviyesinde tanılamaları yapıldı (Adıgüzel vd. 2015).

### **3.2.6. Termofilik Bakterilerin Proteaz Enzimi Üzerine Optimum Parametrelerin Araştırılması**

Proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla %10 oranında skim milk içeren besiyerine izolatların ekimi yapılarak, optimum sıcaklıklarda üç gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Oluşan zonlar değerlendirilerek, en iyi aktivite gösteren izolatlar belirlendi.

Proteaz enzimi aktivite tayini, 50 mM Glisin-NaOH tamponu (pH: 9,0) içerisinde %0,6 konsantrasyonda kazeinin substrat olarak kullanılmasıyla saptandı. Proteaz enzimi üretimi için özel bir besiyeri hazırlandı (g/l: kazein 5 g, pepton 5 g, yeast extract 2 g, NaCl 5 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g, CaCl<sub>2</sub> 0,1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g). Besi yerinin pH'sı %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 9,0 olarak ayarlandı. İzolatlar besiyerine inokule edilerek üç gün süreyle optimum sıcaklıklarında 150 rpm'de inkübe edildi. İzolatların aktivite tayini günlük kontrol edilerek en iyi üretimin gerçekleştiği süreler tespit edildi.

İnkübasyon sonrasında örnekler 20 dk boyunca +4°C'de 5000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında sıvı kısım yeni ve steril bir tüpe alındı. Enzim aktivite deneylerinde bu süpernatant ham enzim solüsyonu olarak kullanıldı. Enzim aktivite tayinini gerçekleştirmek amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi, 2,5 ml kazein çözeltisi (%0,6 kazein içeren pH 9,0, 50 mM Glisin-NaOH tamponunu) ile karıştırıldı ve 37°C'de 20



dk inkübasyona bırakıldı. Karışıma inkübasyon sonrasında 2,5 ml 0,1 M TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. 37°C’de 30 dakika bekledikten sonra karışım filtre kağıdından geçirilerek süzüldü. Yaklaşık 0,5 ml olan süzüntü üzerine 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 2,5 ml ve 1 N Folin-ciocalteu’s phenol reaktifinden de 0,5 ml eklenip 30 dakika boyunca oda şartlarında inkübe edildi. Spektrofotometre cihazı kullanılarak 660 nm’de çözeltilerin absorbansları saptandı. 1 EU/ml (bir ünite) alkalen proteaz aktivitesi kazein substratının parçalanması ile 1 dk’da 1µg tirozinin oluşması için gerekli olan enzim miktarı olarak tespit edildi. Her örnek için ölçüm, 3 paralel tüpte 3 kez yinelendi.

Enzim aktivitesi hesaplamalarında tirozine ait ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi amacıyla; stok tirozin çözeltisinden konsantrasyonları; 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 200 µg/ml olan tirozin çözeltileri hazırlandı ve her bir çözeltiden 0,5 ml alınarak 2,5 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,5 ml 1N Folin-ciocalteu’s phenol çözeltisi ile 30 dk boyunca inkübe edildi. Süre sonunda çözeltilerin 660 nm’de absorbansları alındı ve tirozin konsantrasyon eğrisi oluşturuldu. Tirozine ait ekstinksiyon katsayısı, grafiğin eğiminden belirlendi ve enzim aktiviteleri şu formül kullanılarak hesaplandı (Uzel and Hameş-Kocabaş 2006; Tekin 2008; Sarı 2011);

$$\text{Proteaz Aktivitesi (E.U/ml) Faktörü} = \frac{(A660/Egim) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme}$$

### **3.2.6.a. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Stabilitésinin Belirlenmesi**

İzolatlara ait fermantasyon sıvıları toplanarak filtrasyonla hücrelerinden ayrıldı ve ham enzim solüsyonu olarak enzimin optimum sıcaklık saptanmasında kullanıldı. Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini gözlemlemek amacıyla kültür süpernatantlarının (enzimin) 5°C’lik artışlarla 35-75 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde substrat çözeltisiyle Glisin-NaOH tamponu (pH: 9, 50 mM ile hazırlanmış) içerisinde aktivite ölçümleri yapıldı (Uzel and Hameş-Kocabaş 2006). En

yüksek aktivitenin gözlemlendiği değer 100 olarak kabul edilip diğer sonuçlar buna göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslanarak grafikleri çizildi.

Enzimin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla; 40, 50, 55 ve 60°C sıcaklıklarda 1, 2 ve 3 gün boyunca Glisin-NaOH tamponuyla beraber inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlardan önce ve sonra enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bakterinin proteaz enziminin inkübasyonlardan önceki aktivitelere kıyasla, kalan yüzde aktivite hesaplandı. Bu hesaplamada inkübasyonların yapılmadığı enzim aktivite %100 olarak alındı ve kıyaslamalar bu değerler üzerinden yapıldı (Sarı 2011).

### **3.2.6.b. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi**

Proteaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini gözlemlemek amacıyla konsantrasyonu 50 mM olan farklı pH değerine (pH 6,0-13,0) sahip %0,6 kazein substratı içeren tamponlar (pH: 6,0-7,0 için sodyum fosfat tamponu; pH 8,0-9,0 için Tris-HCl; pH 10,0-13,0 için Glisin-NaOH tamponu) kullanıldı. Çizilen grafik üzerinde, proteaz aktivitesi bakımından en yüksek değer 100 olarak varsayıldı ve diğer sonuçlar buna göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslanarak grafikleri çizildi.

Enzim, pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla pH: 8, 9, 10 ve 11'de hazırlanmış tampon çözeltilerde; 1, 2 ve 3 gün boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar öncesinde enzim aktivite tayini yapıldı ve bu aktivite %100 olarak varsayıldı. İnkübasyon akabinde hesaplanan sonuçlar, kalan % aktivite olarak değerlendirildi (Sarı 2011).

### 3.2.6.c. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli İnhibitörlerin, Denaturanların ve Metal İyonlarının Etkisi

Kültür süpernatantları, 5mM konsantrasyondaki EDTA, EGTA, DTT, PMSF, üre ve %1 konsantrasyondaki SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile aynı oranda karıştırılarak 2 saat boyunca 37°C'de bekletildi. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı. İnkübasyonlar sonrası aktivite tayini yapılarak, kontrole göre kalan bağıl aktivite saptandı (Thumar and Shing 2007; Tekin 2008).

Çeşitli divalent metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkisini saptamak amacıyla kültür süpernatantları, 5 mM FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> ve CaSO<sub>4</sub> içeren tampon çözeltide 2 saat bekletildi ve akabinde kontrole karşı bağıl aktiviteleri hesaplandı. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı (Thumar and Shing 2007; Tekin 2008).

### 3.2.6.d. Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla, kazein substrat çözeltisinin konsantrasyonu 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve kazein konsantrasyonu değiştirilip enzim konsantrasyonu sabit tutularak aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar esas alınarak 1/S (substrat, kazein, mg/ml) değerine karşılık 1/V (reaksiyon hızı, E.U/ml) hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve bu grafikten  $K_m$  ve  $V_m$  (maksimum hız) değerleri belirlendi. Grafiğin x eksenini kestiği noktadan  $K_m$  değeri, y eksenini kestiği noktadan  $V_{max}$  değeri belirlendi (Lineweaver and Burk 1934).

### 3.2.6.e. Proteaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları

Proteaz aktivitesine sahip bakteri izolatlarına ait fermantasyon sıvıları toplandı ve filtrasyonla hücrelerinden ayrıldı. Elde edilen ham enzim solüsyonunun leke çözme gücünü test etmek amacıyla, steril edilerek kan ve çimen lekesi bulaştırılan kumaşlara, iki farklı uygulama ile denemeler kuruldu.

İlk uygulamada lekeli kumaş parçaları steril su, besiyeri, deterjanlı su, kültür süpernatantı ve deterjan-kültür süpernatantı içerisinde bekletildi. Kumaş parçalarının uygulamadan önce ve sonra fotoğrafları alınarak değerlendirme yapıldı.

İkinci uygulamada ise lekeli kumaş parçalarının üzerine steril su, besiyeri, deterjanlı su, kültür süpernatantı ve deterjan-kültür süpernatantı karışımları püskürtülerek uygulandı. Yine kumaş parçalarının uygulamadan önce ve sonra fotoğrafları alınarak değerlendirme yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Erzurum İli'nde yer alan Pasinler ve Ilıca sıcak su kaynaklarından farklı dönemlerde yapılan çalışmalarda çeşitli bakterilerin izolasyonun yapıldığı bilinmektedir (Adıgüzel 2006; Yılmaz vd. 2015; Tarakçıoğlu 2016). Ancak bu çalışma ile; daha önceden herhangi bir izolasyonun yapılmadığı Nenehatun sıcak su kaynağından ilk kez izolasyon yapılmış ve böylelikle mevcut bakteri florası da ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir. Yine bu bağlamda hem kış hem de ilkbahar döneminde su kaynaklarından örnekler alınmış ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu nedenlerle elde edilen sonuçların literatüre önemli katkılar sağlayacağı öngörülmüştür.

### 4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Uygun koşullar altında laboratuvara getirilen sıcak su kaynaklarından yapılan izolasyonlarda ilk olarak NA, TSA, LBA ve PCA besi ortamları kullanıldı. Bütün besi ortamlarının termofilik bakterileri gelişimine eşit oranda etki ettiği sonucuna varıldı. Tüm bu ortamlarda gelişen izolatların NA ve NB besiyerinde sorunsuz geliştiği tespit edildiğinden çalışmanın sonraki kısmında bu iki besi ortamı tercih edildi.

Yapılan izolasyonlarda, termofil ve hipertermofil özelliğe sahip olan izolatlar ve bunların optimum gelişim gösterdiği sıcaklıkları tespit etmek amacıyla, tüm izolasyonlar üç farklı sıcaklıkta (45, 55 ve 65°C) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda toplamda 85 izolat elde edildi. Bu izolatlardan Pasinler'den izole edilen toplam 23 izolatın 17 tanesinin (HK1-HK8; HY1-HY9) 45°C'de, 6 tanesinin (HK9-HK11; HY10-HY12) 55°C'de geliştiği; Ilıca'dan izole edilen 32 izolatın 21 tanesinin (IK1-İK10; IY1-IY11) 45°C'de, 11 tanesinin (İK11-İK16; IY12-IY16) 55°C'de geliştiği; Nenehatun'dan izole edilen 30 izolatın ise 20 tanesinin (NK1-NK9; NY1-NY11) 45°C'de, 10 tanesinin de (NK10-NK14; NY12-NY16) 55°C'de geliştiği tespit edildi. Çalışmada; izole edilen bakterilerle yapılan sıcaklık taramalarında 65°C'de gelişen hipertermofil izolatlar rastlanmadı. İnkübasyonların sonunda elde edilen saf kültürlerden stok kültürler hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

## 4.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının morfolojik özelliklerini tespit etmek amacıyla; hücre morfolojisi, Gram boyama, spor boyama ve hareketlilik testleri yapıldı. Yapılan testler sonucunda izolatların morfolojik olarak tamamının çubuk şeklinde olduğu, Gram boyama, spor boyama ve hareketlilik testi sonuçları arasında ise farklılıklar olduğu tespit edildi. Pozitif ve negatif olarak değerlendirilen testlerin sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterildi.

## 4.3. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının fizyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla, gelişimleri için uygun inkübasyon süreleri, sıcaklıkları, pH'ları, NaCl oranları ile atmosferik O<sub>2</sub> kullanımları tespit edildi. Yapılan literatür taramaları sonucunda bakteri izolatlarının fizyolojik aktivitelerinin tespiti için farklı dalga boylarının kullanıldığına rastlandı (Matpan 2007; Sarı 2016). Bu nedenle çalışmalar 470, 540 ve 600 nm'de yapılarak 3 farklı absorbans değeri alındı ve sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirmeler yapıldı. 470, 540 ve 600 nm'de yapılan ölçümlerde sonuçların benzer olduğu ve bunun sonucunda da bu dalga boylarının bakterilerin fizyolojik özelliklerini belirlemede kullanılabileceği tespit edildi. Çizelge 4.1.'de verilen sonuçlara göre izolatlar için en uygun inkübasyon süresinin çoğunluğunda 28 ila 44. saatler arasında olduğu, bazı türlerde de 52 ila 68. saatler arasında olduğu saptandı. İzolatların minimum 30, maksimum 55°C sıcaklıklarda gelişim gösterdiği, pH ve NaCl değerlerinin de izolatlara göre farklılık gösterdiği tespit edildi. Atmosferik O<sub>2</sub> kullanımına göre de izolatların aerob veya fakültatif anaerob olduğu gözlemlendi.

**Çizelge 4.1. İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri**

Bakteri İzolatları	Morfolojik Testler				Fizyolojik Testler				
	Stok Kodu	Morfoloji	Gram Boyama	Endospor	Hareket	İnk. Süresi	Sıcaklık	pH	NaCl
HK1, HK4, HK5, HK6, HK7, HK9, HK11, IK2, IK7, IK10, IK12, IK13, IK16, NK1, NK3, NK5, NK10, HY2, HY6, HY7, IY1, IY11, IY15, NY2	Çubuk	+	+	+	28-44	30-50	6-8	5-10	Fakültatif Anaerob
HK2, HK3, HK8, IK3, IK5, IK6, IK8, NK7, NK8, NK9, HY9, HY12, IY3, IY4, IY6, IY8, IY9	Çubuk	+	+	+	52-68	40-50	6-10	3-6	Fakültatif Anaerob
HK10, IK1, NK2, HY11, IY2, IY12, NY7, NY10, NY11, NY12, NY15	Çubuk	-	-	+	28-44	30-40	6-8	2-5	Aerob
IK4, IK9, NY6, HY4, NY5	Çubuk	+	+	+	52-68	35-50	7-10	4-7	Fakültatif Anaerob
IK11, IK14, NY1	Çubuk	-	-	+	28-44	40-50	6-10	4-6	Aerob
IK15, HY3	Çubuk	+	+	+	28-44	40-50	6-7	2-6	Aerob
NK4, NY8, NY14	Çubuk	+	+	+	52-68	35-50	4-7	2-4	Fakültatif Anaerob
NK6, NK12	Çubuk	-	-	+	28-44	30-55	6-10	3-5	Aerob
NK11, HY10, NY4, NY16	Çubuk	-	-	+	52-68	40-50	5-8	2-7	Aerob
NK14, HY1, HY5, IY14	Çubuk	+	+	+	52-68	40-50	5-9	2-10	Aerob
NK13	Çubuk	-	-	-	52-68	35-60	5-9	2-3	Aerob
HY8, IY5	Çubuk	-	-	+	52-68	35-50	6-8	6-10	Aerob
IY7, IY10	Çubuk	-	+	+	28-44	35-55	4-6	2-6	Fakültatif Anaerob
IY13	Çubuk	-	-	+	52-68	35-50	6-8	6-10	Aerob
IY16, NY3, NY9	Çubuk	+	+	+	52-68	35-45	5-9	6-10	Aerob
NY13	Çubuk	-	-	+	52-68	35-40	6-8	3-6	Fakültatif Anaerob

#### 4.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının biyokimyasal özelliklerini tespit etmek amacıyla uygulanan amilaz, katalaz, oksidaz, proteaz ve lipaz testi sonuçları ile izolatların karbon kaynağı kullanım sonuçları çizelge 4.2.'de gösterildi.

**Çizelge 4.2. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri**

Bakteri izolatları	Biyokimyasal Özellikler					Karbon Kaynağı Kullanımı						
	Amilaz	Katalaz	Oksidaz	Proteaz	Lipaz	Glikoz	Galaktoz	Fruktoz	Sakkaroz	Maltoz	Laktoz	Soyum Sitrat
HK1, HK4, HK5, HK6, HK7, HK9, HK11, IK2, IK7, IK10, IK12, IK13, IK16, NK1, NK3, NK5, NK10, HY2, HY6, HY7, IY1, IY11, IY15, NY2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HK2, HK3, HK8, IK3, IK5, IK6, IK8, NK7, NK8, NK9, HY9, HY12, IY3, IY4, IY6, IY8, IY9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
HK10, IK1, NK2, HY11, IY2, IY12, NY7, NY10, NY11, NY12, NY15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
IK4, IK9, NY6, HY4, NY5	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IK11, IK14, NY1	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
IK15	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
NK4, NY8, NY14	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
NK6, NK12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
NK11, HY10, NY4, NY16	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
NK14, HY1, HY5, IY14	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
NK13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
HY3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HY8, IY5	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
IY7, IY10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
IY13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IY16, NY3, NY9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NY13	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+



## **4.5. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması**

### **4.5.1. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu**

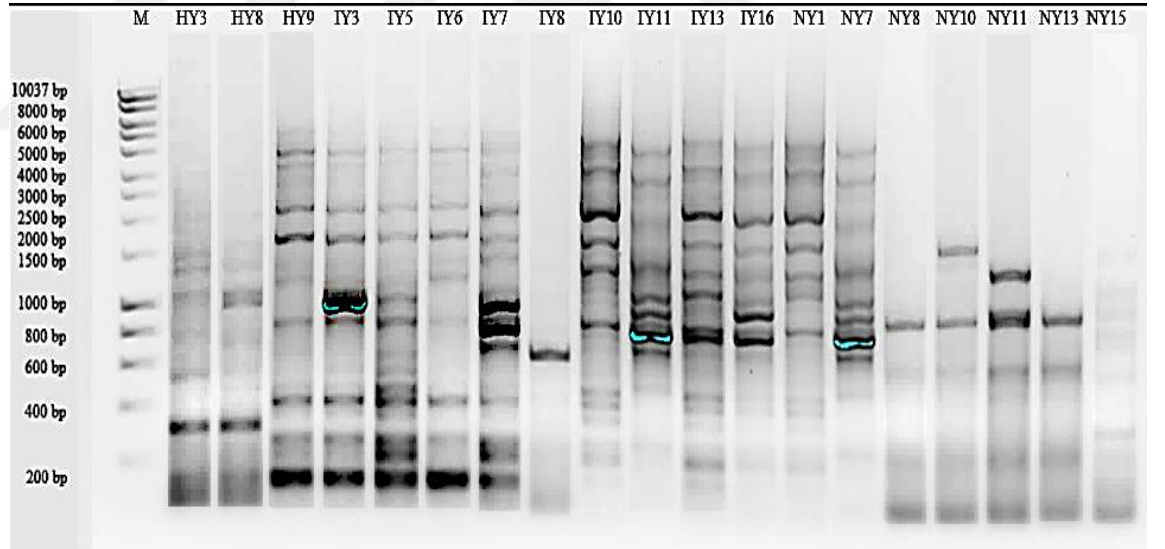
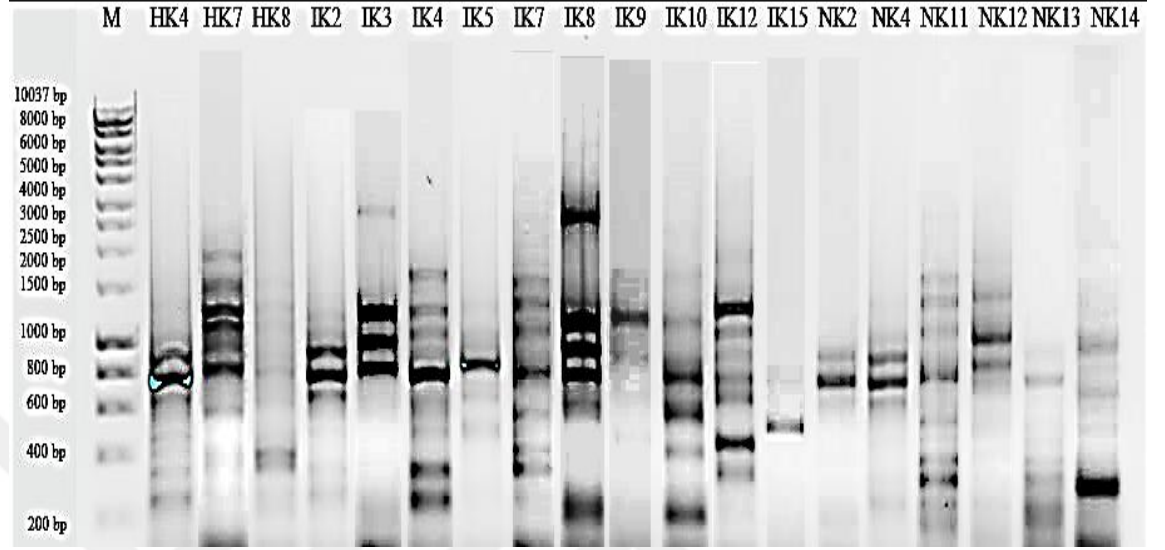
Çalışmada izole edilen bakterilerin tümünün DNA izolasyonları manuel olarak gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları ölçüldü (680,3-932,5 ng/μl) ve DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonraki aşamalarda kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **4.5.2. Bakteri İzolatlarının ERIC PCR Yöntemiyle Gen Profillerinin Belirlenmesi ve ERIC PCR Ürünlerinin Elektroforezi**

Yapılan ERIC PCR yöntemi sonucunda, toplamda izole edilen 85 bakteri izolatının 38 tanesinin farklı bant oluşturduğu tespit edildi. Farklı bant profili sergileyen izolatların genomik parmak izi analiz sonuçları Şekil 4.1.'de gösterildi. Sonuçlara göre HK4'ün 200-800 bp aralığında 7 bant, HK7'nin 600-2000 bp aralığında 7 bant, HK8'in 200-800 bp aralığında 3 bant, IK2'nin 600-1000 bp aralığında 3 bant, IK3'ün 800-3000 bp aralığında 4 bant, IK4'ün 200-1500 bp aralığında 8 bant, IK5'in 400-800 bp aralığında 3 bant, IK7'nin 200-1500 bp aralığında 7 bant, IK8'in 200-3000 bp aralığında 6 bant, IK9'un 800-1000 bp aralığında 2 bant, IK10'un 200-1000 bp aralığında 5 bant, IK12'nin 200-1500 bp aralığında 7 bant, IK15'in 400-600 bp aralığında 1 bant, NK2'nin 600-800 bp aralığında 2 bant, NK4'ün 400-800 bp aralığında 3 bant, NK11'in 200-1500 bp aralığında 10 bant, NK12'nin 600-1500 bp aralığında 4 bant, NK13'ün 200-600 bp aralığında 4 bant, NK14'ün 200-800 bp aralığında 4 bant içerdiği gözlemlendi.

Yine HY3'ün 200-1500 bp aralığında 6 bant, HY8'in 200-1500 bp aralığında 3 bant, HY9'un 200-6000 bp aralığında 9 bant, IY3'ün 200-6000 bp aralığında 8 bant, IY5'in 200-6000 bp aralığında 10 bant, IY6'nın 200-6000 bp aralığında 8 bant, IY7'nin 200-6000 bp aralığında 12 bant, IY8'in 600-800 bp aralığında 1 bant, IY10'un 200-6000 bp aralığında 10 bant, IY11'in 400-6000 bp aralığında 9 bant, IY13'ün 200-6000 bp aralığında 12 bant, IY16'nın 400-6000 bp aralığında 11 bant, NY1'in 200-6000 bp aralığında 11 bant, NY7'nin 200-6000 bp aralığında 11 bant, NY8'in 800-

1000 bp aralığında 1 bant, NY10'un 800-2000 bp aralığında 2 bant, NY11'in 200-1500 bp aralığında 4 bant, NY13'ün 200-1000 bp aralığında 3 bant, NY15'in 200-400 bp aralığında 1 bant içerdiği gözlemlendi.



Şekil 4.1. İzolatların ERIC PCR bant görüntüleri (a), (b).

### **4.5.3. Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

ERIC PCR sonuçlarına göre farklı bant profili sergileyen izolatlar proteaz aktivitesi açısından değerlendirildi ve en iyi aktivite gösteren izolatların enzim aktivite tayinleri yapıldı. %10 skim milk içeren besiyerlerinde kazeinin hidrolizi sonucunda proteolitik zon oluşturan izolatlar belirlendi. Çalışmada 29 izolatın proteaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.

Proteaz aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı substratlarla enzim aktivitesi tespiti yapıldığına rastlandı. Gupta *et al.* (2002b), yapmış oldukları bir çalışmada alkalen proteazların geniş substrat spesifikliğine sahip olmasına karşın sentetik substratlara ve doğal proteinlere karşı daha aktif olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda yapılan literatür araştırmaları sonucunda bir süt proteini olan kazeinin; hemoglobin ve BSA gibi diğer proteaz substratlarına göre daha fazla aktivite gösterdiğine rastlandı. Aynı zamanda Matpan (2007), yaptığı çalışmada mikroorganizmaların proteaz enzimi vasıtasıyla kazeinin hidrolizini tespit etmek amacıyla % 10 oranında skim milk içeren besiyeri hazırlamış ve proteaz aktivitesini belirlemiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde en iyi aktivitenin kazein varlığında gerçekleştiği görüldüğünden çalışmada substrat olarak kazein tercih edildi.

### **4.5.4. Proteaz Aktivitesi Gösteren Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu ve 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi**

Proteaz aktivitesi tespit edilen izolatların 16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

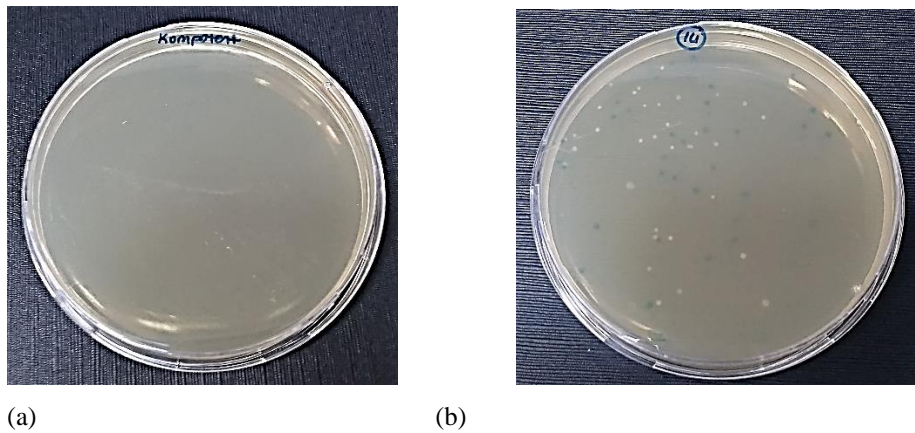
### **4.5.5. 16S PCR Ürünlerinin Kompetent *E.coli* Hücrelerine Klonlanması**

Bakterilerin tanılanmasında kullanılan 16S rRNA gen bölgesinin baz dizi analizi gerçekleştirilirken oluşacak kayıpların minimize edilmesi amacıyla klonlama yapılması önerilmektedir. Bu bağlamda çalışmada öncelikle izolatların kompetent

*E.coli* hücrelerine klonlanması gerçekleştirildi. Bu bağlamda bakteriler, kompetent hale getirilerek ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. X-Gal ve IPTG içeren amfisilinli besi yerine ekim yapılan bakterilerde inkübasyonun ardından mavi-beyaz kolonilerin oluşumu gözlemlendi. Kontrol olarak sadece ligasyon ürününü içermeyen kompetentlerin ekimi yapıldı. İnkübasyon süresi sonucunda, kontrol olarak ekim yapılan petride herhangi bir gelişime rastlanmazken diğer petrilere mavi-beyaz koloniler gözlemlendi. Oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz olanların geni aldığı kabul edildi.

Vektör üzerinde klonlamanın yapıldığı kısımda (çoklu klonlama bölgesi, MCS)  $\beta$ -galactosidase geni (LacZ geni) bulunmakta ve eğer klonlama başarılı olmamışsa bu gen aktif olarak ortamdaki laktozu parçalamaktadır. Klonlamanın başarılı olduğu durumlarda ise bu gen bölgesi bozulmakta ve yerine istenilen gen yerleşmektedir. Bu durumda  $\beta$ -galactosidase geninin bütünlüğü bozulacağı için besiyerinde bulunan laktoz parçalanmamaktadır.

Çalışmada IPTG;  $\beta$ -galactosidase geni için bir uyarıcı, X-gal ise laktoz analogu olarak kullanıldı. X-gal  $\beta$ -galactosidase geni aktif olduğu zaman, oluşan enzim ile parçalanacağı ve mavi renk oluşacağı için mavi koloniler istenilen geni almamış olarak kabul edildi. Beyaz kolonilerde ise gen aktarımı olduğundan ve dolayısıyla  $\beta$ -galactosidase geni sentezlenemediğinden X-gal parçalanmadı ve böylece mavi renk oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Petride mavi-beyaz koloni görüntüsü a) Kontrol petri, b) Mavi-beyaz koloniler

Bu bağlamda her petri için 4 beyaz koloni belirlendi ve koloni PCR yöntemiyle doğrulama işlemi yapıldı. Her petri için, DNA markırında 1500 bç hizasında bant veren en parlak koloni seçildi ve antibiyotikli besiyerine aktarılarak plazmid izolasyonu aşamasına geçildi. Plazmid DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon akabinde elde edilen plazmidler, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Plazmidlerin absorbans ölçümleri alındıktan sonra sekans analizleri gerçekleştirildi.

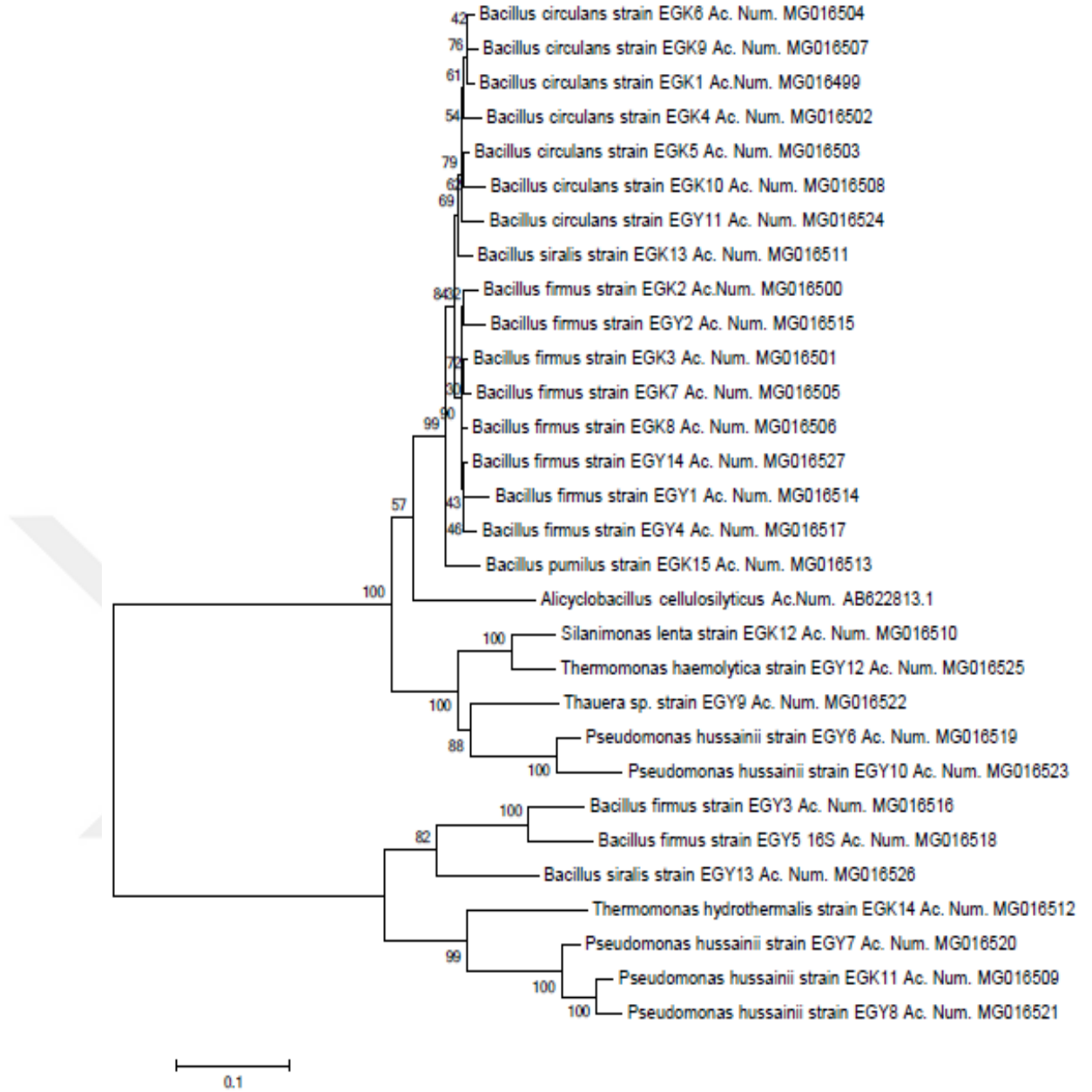
#### **4.5.6. 16S rRNA Sekans Analizi Sonuçları**

Canlıların filogenetik olarak sınıflandırılmasında kullanılan 16S rRNA gen bölgesi izolatların tür seviyesinde tanılanması içinde en çok tercih edilen bölgedir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, 16S rRNA PCR ürünlerinin direkt sekans analizine gönderilmediği, bu bölgenin kompotent bir bakteri aracılığıyla klonlaması yapıldıktan sonra elde edilen plazmitlerin sekanslandığı tespit edildi (Tarakçıoğlu 2016; Sarı 2016). Bu nedenle çalışmada PCR yöntemi ile çoğaltılıp pGEM-T Easy vektörü aracılığıyla klonlanan bölgenin sekans analizi gerçekleştirildi.

16S rRNA gen bölgesine ait sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak yorumlandı. Dizilerin Fasta formatı üzerinde vektöre ait sekanslar çıkarılarak dizi anlamlı hale getirildi. Elde edilen dizi, Gen Bankasında var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırıldı (BLAST analizi) ve filogenetik ağaçları çıkarıldı (Şekil 4.3). Böylece izolatların tür seviyesinde tanıları yapıldı ve GenBank Numaraları alındı (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** İzolatların Sekans Analizlerine Göre Tanı Sonuçları ve Genbank Numaraları

İzolatin Kodu	Tanı Sonucu	Genbank Numarası	NCBI kodu	Benzerlik Oranı	Baz Uzunluğu
HK4	<i>Bacillus circulans</i>	MG016503	EGK5	%99	1486 (bç)
HK7	<i>Bacillus circulans</i>	MG016504	EGK6	%99	1485 (bç)
HK8	<i>Bacillus firmus</i>	MG016505	EGK7	%99	1485 (bç)
IK2	<i>Bacillus circulans</i>	MG016499	EGK1	%99	1481 (bç)
IK3	<i>Bacillus firmus</i>	MG016500	EGK2	%97	1512 (bç)
IK5	<i>Bacillus firmus</i>	MG016501	EGK3	%98	1491 (bç)
IK7	<i>Bacillus circulans</i>	MG016502	EGK4	%98	1484 (bç)
IK8	<i>Bacillus firmus</i>	MG016506	EGK8	%99	1486 (bç)
IK10	<i>Bacillus circulans</i>	MG016507	EGK9	%98	1489 (bç)
IK12	<i>Bacillus circulans</i>	MG016508	EGK10	%97	1501 (bç)
IK15	<i>Bacillus siralis</i>	MG016511	EGK13	%98	1546 (bç)
NK2	<i>Pseudomonas hussainii</i>	MG016509	EGK11	%98	1474 (bç)
NK12	<i>Silanimonas lenta</i>	MG016510	EGK12	%98	1484 (bç)
NK13	<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	MG016512	EGK14	%95	1506 (bç)
NK14	<i>Bacillus pumilus</i>	MG016513	EGK15	%98	1491 (bç)
HY3	<i>Bacillus siralis</i>	MG016526	EGY13	%91	1269 (bç)
HY9	<i>Bacillus firmus</i>	MG016527	EGY14	%98	1496 (bç)
IY3	<i>Bacillus firmus</i>	MG016514	EGY1	%97	1478 (bç)
IY6	<i>Bacillus firmus</i>	MG016515	EGY2	%97	1496 (bç)
IY7	<i>Bacillus firmus</i>	MG016516	EGY3	%97	1496 (bç)
IY8	<i>Bacillus firmus</i>	MG016517	EGY4	%97	1495 (bç)
IY10	<i>Bacillus firmus</i>	MG016518	EGY5	%97	1497 (bç)
IY11	<i>Bacillus circulans</i>	MG016524	EGY11	%97	1496 (bç)
IY13	<i>Thermomonas haemolytica</i>	MG016525	EGY12	%97	1489 (bç)
NY7	<i>Pseudomonas hussainii</i>	MG016519	EGY6	%97	1471 (bç)
NY10	<i>Pseudomonas hussainii</i>	MG016520	EGY7	%96	1503 (bç)
NY11	<i>Pseudomonas hussainii</i>	MG016521	EGY8	%97	1476 (bç)
NY13	<i>Thauera</i> sp.	MG016522	EGY9	%96	1498 (bç)
NY15	<i>Pseudomonas hussainii</i>	MG016523	EGY10	%92	1553 (bç)



Şekil 4.3. İzolatların filogenetik ağacı.

16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987; Kimura 1980) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı. İzolatların filogenetik ağacı MEGA-6 programı kullanılarak çizildi. Analiz işlemi 29 adet nükleotit dizisini kapsamaktadır. *Alicyclobacillus cellulosityticus* (AB622813.1)'un uygun dış grup olarak belirlendiği filogenetik analizde bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak seçildi.

Yapılan sekans analizi sonucunda elde edilen dizilerin Genbank numarası alındı. Stok kodları NK13, HY3, NY10 ve NY15 olan izolatların Genbankası'nda bulunan verilerle benzerliği %97'nin altında bulundu. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile sekans analizi sonuçlarına göre büyük bir oranda *T. hydrothermalis*, *B. sivalis* ve *P. hussainii* oldukları düşünülse bile Ad-Hoc komitesinin 2002 yılında almış olduğu kararlar doğrultusunda değerler %97'nin altında çıktığı için bu izolatların yeni bir tür olarak değerlendirilebilecekleri fikri doğmaktadır. Bu yüzden daha kapsamlı tanı teknikleriyle (örn, hibridizasyon çalışmaları) daha ileri bir tanıya ihtiyaç duyulmaktadır.

Genellikle termofilik kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların *Bacillus* cinsi olduğu görülmekte ve yapılan çalışmalarda morfolojik ve biyokimyasal özellikler bakımından benzerlik gösteren izolatların tanı sonuçlarının da hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Akhmaloka *et al.* 2006; Acar 2009; Adiguzel vd. 2009; Başbülbul 2009; Türker ve Özcan 2015; Yanmış vd. 2014). Bu çalışmanın sonucunda da tanısı yapılan 29 izolatın 20 tanesinin *Bacillus* cinsi olduğu ve izolatların çoğunda morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinin de birbirini desteklediği gözlemlendi.

Yapılan araştırmalar göstermektedir ki *B. circulans* türü bakteriler; çubuk şeklinde, Gram pozitif, endospor oluşturan, hareketli bakterilerdir. Besi yerinde genellikle 2 günde, 35-50°C sıcaklık, 6-9 pH aralığında ve %5-10 NaCl konsantrasyonunda fakültatif anaerob olarak gelişebilmektedir. Bu bakteriler; nişastayı sindirebilen, katalaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, galaktoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz ve laktozu kullanabilen bakterilerdir.(Pettersson *et al.* 2000; Peak *et al.* 2011; Seiler *et al.* 2013).

*B. firmus* bakterileri ise çubuk şeklinde, Gram pozitif, endospor oluşturan, hareketli bakterilerdir. Besi yerinde genellikle 3 günde, 40-50°C sıcaklık, 6-11 pH aralığında ve %2-7 NaCl konsantrasyonunda fakültatif anaerob olarak gelişebilmektedir *B. firmus* bakterileri ise nişastayı sindirebilen, katalaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, fruktoz, sakkaroz ve maltozu kullanabilen bakterilerdir (Pettersson *et al.* 2000; Vaz-Moreira *et al.* 2012; Seiler *et al.*



2013). Çalışma kapsamında izole edilen *B. firmus* izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test ile moleküler tanı sonuçları birlikte değerlendirildiğinde stok kodu IY7 ve IY10 olan, tanısı *B. firmus* olarak yapılan izolatların literatürdeki verilerden oldukça farklı sonuçlar verdiği görülmektedir.

*P. hussainii* çubuk şekilli, Gram negatif, endosporsuz, hareketli bakterilerdir. 15-40°C sıcaklık, 6-8 (opt. 7) pH aralığında ve %1-5 NaCl konsantrasyonunda aerob olarak 2 gün içinde gelişebilmektedirler. Besi yerindeki nişastayı sindirebilen, katalaz ve oksidaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, galaktoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz ve laktozu kullanabilen bakterilerdir (Hameed *et al.* 2014). *Pseudomonaslar* termofilik bakteri değil termotolerant bakterilerdir. Çalışmamızın neticesinde bu gruba ait bakteriler izole edilmiş, tanılanmıştır.

*B. siralis* çubuk morfolojisinde, Gram pozitif, endospor oluşturan hareketli bakteriler olup 50°C'ye varan sıcaklık değerlerinde, optimum pH: 7'de %0-7 arası NaCl konsantrasyonunda 2 gün içinde gelişebilmektedirler. Katalaz ve oksidaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikozu kullanabilen bakterilerdir (Pettersson *et al.* 2000; Vaz-Moreira *et al.* 2012). Sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmada elde edilen iki *B. siralis* izolatının biyokimyasal testlere verdikleri yanıtların farklı olduğu göze çarpmaktadır. *B. siralis* IK15 izolatının biyokimyasal test sonuçlarının literatürdeki verilerle paralel olduğu ancak, *B. siralis* HY3 izolatının bu verilerden farklı sonuçlar verdiği görülmektedir.

*S. lenta* ise çubuk morfolojisinde, Gram negatif, endosporsuz ve hareketli bakteridir. 25 ile 53°C sıcaklık, 6-10 pH aralığında ve %3-5 NaCl konsantrasyonunda aerob olarak 2 gün içinde gelişebilmektedir. Nişastayı sindirebilen, katalaz ve oksidaz pozitif, kazein ve yağların hidrolizini yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, früktoz ve maltozu kullanabilen bakterilerdir (Lee *et al.* 2005). *B. pumilus*, çubuk şekilli, Gram pozitif, endospor oluşturan hareketli bakteriler olup 40-50°C sıcaklık değerlerinde, pH: 5-9'da %0-10 arası NaCl konsantrasyonunda 3 gün içinde aerob olarak gelişebilmektedirler. Oksidaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, galaktoz, fruktoz, maltoz ve sodyum sitratı kullanabilen bakterilerdir (Pan *et al.* 2012).

*T. hydrothermalis* çubuk şekilli Gram negatif, endospor bulundurmayan, hareketsiz bakterilerdir. Besi yerinde genellikle 3 günde, 30-60°C sıcaklık, 5-9 pH aralığında anaerob olarak gelişebilmektedir. Katalaz ve oksidaz pozitif, kazein ve yağların hidrolizini yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikozu kullanabilen bakterilerdir (Saha *et al.* 2005). *T. haemolytica* çubuk şekilli Gram negatif, endospor oluşturmayan, hareketli bakterilerdir. Bu bakteriler 3 günde, 37-50°C sıcaklıkta aerob olarak gelişebilmektedirler. Katalaz ve oksidaz pozitif, kazein ve yağların hidrolizini yapabilen bakterilerdir (Busse *et al.* 2002; Alves *et al.* 2003).

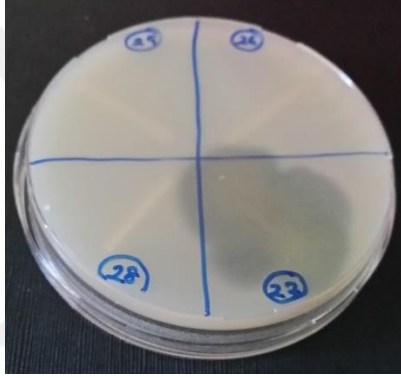
*Thauera* cinsi bakteriler, çubuk morfolojisinde, Gram negatif, endosporsuz, hareketli bakteriler olup 25-40°C sıcaklıkta optimum pH: 7-8 aralığında gelişim gösterebilen, hem aerob hem de anaerob olarak gelişebilen bakterilerdir. Katalaz ve oksidaz pozitif, kazein hidrolizi yapabilen, karbon kaynağı olarak da glikoz, galaktoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz, laktoz ve sodyum sitratı kullanabilen bakterilerdir (Macy *et al.* 1993; Mechichi *et al.* 2002).

Sonuçlar değerlendirildiğinde *B. circulans*, *P. hussainii*, *S. lenta*, *B. pumilus*, *T. hydrothermalis*, *T. haemolytica*, *Thauera* izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarının literatürdeki çalışmalarda rastlanan sonuçlara paralellik gösterdiği göze çarpmaktadır. Filogenetik ağaç incelendiğinde *Bacillus* cinsi bakterilerin Gram pozitif özelliklerine göre bir arada toplandıkları göze çarpmaktadır. Ancak daha önceden morfolojik-fizyolojik ve biyokimyasal testlerde oldukça farklı sonuçlar gösteren izolatların (*B. firmus* IY7 ve IY10 izolatları ve *B. sivalis* HY3 izolatu) bu filogenetik ağaçta da olması gereken *Bacillus*ların bulunduğu bölgede olmadığı ve farklı bölgelerde dallandığı görülmektedir. Bazı *Bacillus* türlerinin Gram reaksiyonu açısından değişkenlik gösterdiği bilindiğinden tanıma muhtemel hatalarda olabileceği göz önünde tutularak bu izolatlarla ilgili bir takım testler yapılarak ilerleyen çalışmalarda bu durumun aydınlatılması sağlanacaktır.

## 4.6. Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üzerine Optimum Parametrelerin Araştırılması

### 4.6.1. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların proteaz aktivite testleri, % 10 skim milk içeren besiyerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla izolatlar besi ortamlarına çizgi ekim ile ekilip belirlenen optimum sıcaklıkta 3 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda izolatların skim milk hidrolizi sonucu oluşturduğu proteolitik zonlar değerlendirilerek en iyi proteaz aktivitesi gösteren 2 izolat belirlendi (Şekil 4.4)



(a) 27; *B. pumilus* NK14

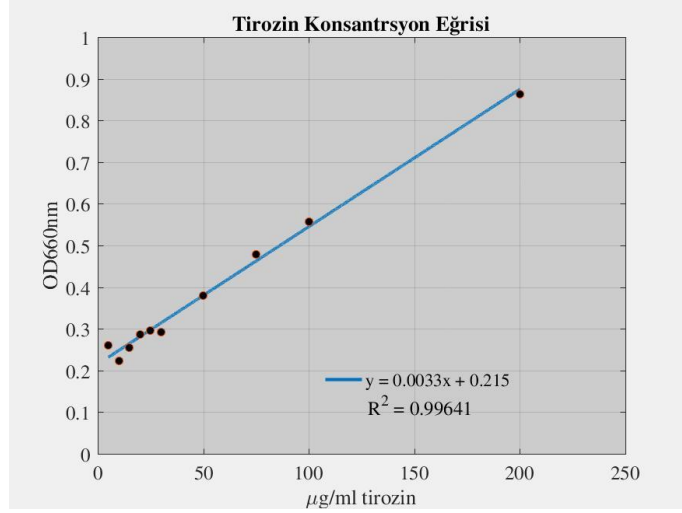


(b) 34; *T. haemolytica* IY13

**Şekil 4.4.** Petri üzerinde en iyi aktivite gösteren izolatlar

Proteaz aktivitesine göre seçilen *B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 ile enzim deneylerine devam edildi.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan tirozinin ekstinksiyon katsayısını belirlemek amacıyla tirozinin stok çözeltisinden seyreltmeler yapıp dilüsyonların 660 nm’de absorbansları ölçülerek tirozinin konsantrasyon eğrisi çizildi ve bu eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı belirlendi (Şekil 4.5).

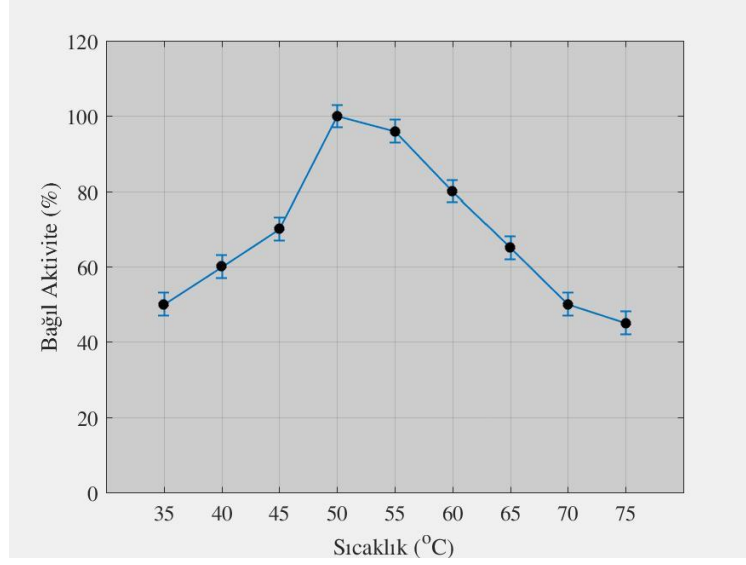


**Şekil 4.5.** Tirozin konsantrasyon eğrisi

Grafiten çıkan sonuç doğrultusunda, alkalen proteaz aktivitesi hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı olarak 0,0033 µg/ml kullanıldı. Bu doğrultuda *B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 izolatu için en yüksek enzim aktivitesi 3. gün tespit edilmiş olup aktivite değerleri sırasıyla 91,17 EU/ml ve 101,33 EU/ml olarak belirlenmiştir.

#### **4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi**

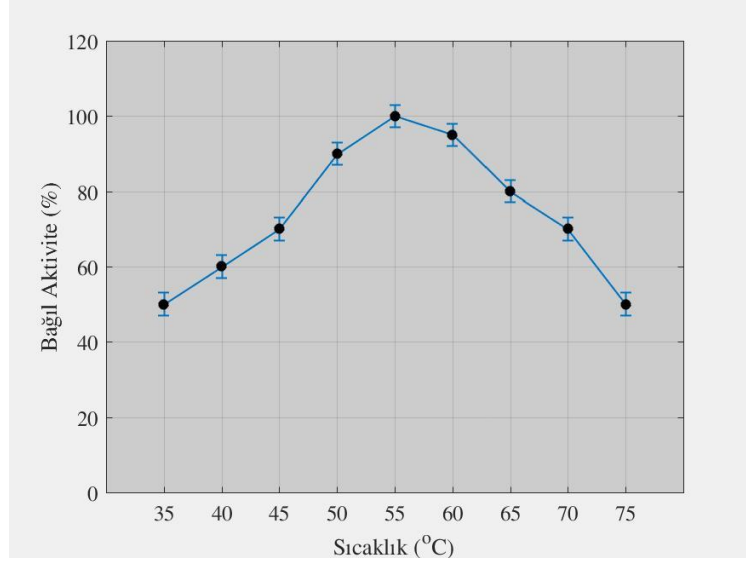
*B. pumilus* NK14 izolatının proteaz üretimi için en uygun sıcaklığını belirlemek amacıyla, kültür süpernatantlarının 5°C'lik artışlarla 35-75°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde pH 9,0'da hazırlanan subsrat çözeltisiyle aktivite ölçümleri yapıldı. Proteaz enziminin aktivitesinin en iyi olduğu aralık 45-65°C ve enzimin optimum sıcaklığı ise 50°C olarak belirlendi. İzolatın gösterdiği en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilerek diğer sonuçlar buna göre bağlı aktivite bakımından değerlendirildi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** *B. pumilus*'un sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi

*B. pumilus* NK14 izolatının sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla enzim; 40, 50, 55 ve 60°C sıcaklıklarda 1, 2 ve 3 gün boyunca Glisin-NaOH tamponuyla beraber inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlardan önce ve sonra enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bakterinin proteaz enziminin inkübasyonlardan önceki aktivitelere kıyasla, kalan yüzde aktivite hesaplandı. Bu hesaplamada inkübasyonların yapılmadığı enzim aktivite %100 olarak alındı ve kıyaslamalar bu değerler üzerinden yapıldı. 1 günlük inkübasyon sonunda 45 ve 50°C'lerde enzimin stabilitesinin yaklaşık olarak %10 ve %16 azaldığı, 55°C'de aktivitesinin yaklaşık olarak %15'ini, 60°C'de %28'ini kaybettiği gözlemlendi. 2. günde yapılan aktivite tayinlerine göre 40°C'de enzim stabilitesinin %26 azaldığı, 50 ve 55°C'de %35 ve %40'ını, 60°C'de %75'ini kaybettiği gözlemlendi. 3. günde yapılan tayinlerde de 40°C'de aktivitesinin %65'ini, 50 ve 55°C'de de yaklaşık olarak %80 ve %82'sini, 60°C'de %95'ini kaybettiği gözlemlendi.

*T. haemolytica* IY13 izolatının proteaz üretimi için en uygun sıcaklığını belirlemek amacıyla, kültür süpernatantlarının 5°C'lik artışlarla 35-75°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde pH 9,0'da hazırlanan substrat çözeltisiyle aktivite ölçümleri yapıldı. Proteaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 50-65°C olarak, optimum sıcaklık ise 55°C olarak belirlendi. En yüksek aktivite %100 olarak kabul edildi ve diğer sıcaklık sonuçları buna göre değerlendirildi (Şekil 4.7.)



**Şekil 4.7.** *T. haemolytica* IY13'ün Sıcaklığa Bağlı Proteaz Aktivitesi

*T. haemolytica* IY13 izolatının sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla enzim; 40, 50, 55 ve 60°C sıcaklıklarda 1, 2 ve 3 gün boyunca Glisin-NaOH tamponuyla beraber inkübe edildi. İnkübasyonlardan önce ve sonra enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bakterinin proteaz enziminin inkübasyonlardan önceki aktiviteleri %100 olarak alındı ve buna kıyasla, kalan yüzde aktiviteleri hesaplandı. 1 günlük inkübasyon sonunda 45, 50, 55 ve 60°C'lerde enzimin aktivitesinin %5, %18, %20 ve %30'unu kaybettiği gözlemlendi. 2. günde yapılan aktivite tayinlerine göre 40 ve 50°C'de %28 ve %32'sini, 55°C'de %45'ini ve 60°C'de de %80'ini kaybettiği gözlemlendi. 3. günde yapılan tayinlerde de 40°C'de aktivitesinin %75'ini, 50°C'de %70'ini, 55°C'de yaklaşık olarak %95'ini ve 60°C'de tamamını kaybettiği gözlemlendi.

Elde edilen optimum sıcaklık değerleri *B. pumilus* NK14 izolatı için 50°C, *T. haemolytica* IY13 izolatı için de 55°C olarak tespit edilmiş olup bu sonuçların, termofilik proteaz enzimi için karakteristik olduğu doğrulandı. Bu sonuçlar literatürdeki verilerle paralellik göstermektedir. Termofilik bakterilerden elde edilen proteaz enziminin optimum aktivitesi genellikle 50-70°C aralığında değişmektedir. Gupta *et al.* (2001), *Bacillus* cinsi bir bakteriden elde ettikleri proteaz enziminin aktivitesinin 60°C'de optimum olduğunu, enzimin 1 saatten fazla 45°C'de kararlılığını koruduğunu belirtmişlerdir. Chang *et al.* (2003), *Bacillus clausii* bakterisinden elde ettikleri proteaz enziminin 60-65°C aralığında optimum aktivite gösterdiğini, 1 saatlik inkübasyondan sonra 55°C'de kararlılığını koruduğunu ancak 60°C'de 30 dk

inkübasyon sonrasında %45 oranında aktivite kaybettiğini göstermişlerdir. Zhang *et al.* (2003), *B. pumilus* bakterisinden elde ettikleri proteaz enziminin optimum 55°C’de, 30-60°C sıcaklık değerlerinde en iyi aktiviteyi gösterdiğini belirtmişler, 50°C’de 30 dk inkübasyonda aktivitesinde %47 oranında bir azalma olduğunu, 10 dk 70°C’de inkübasyonunda da aktivitesinin tamamını kaybettiğini bildirmişlerdir.

Sarnaik *et al.* (2006), *B. cereus*’dan elde ettikleri enzimin 30-60°C aralığında (optimum 55°C) aktiviteye sahip olduğunu, 80°C’de ise tamamen inaktif olduğunu belirtmişlerdir. Alpan (2008), çalıştığı termofilik izolatın proteaz enzim aktivitesinin 50-70°C değerlerinde, 70°C’de ise optimum olduğunu ve 75°C’de aktivitesini %90 oranında; 80°C’de %75; 85°C’de %40 ve 90°C’de yaklaşık %20 koruduğunu belirtmiştir. Tekin (2008), elde ettiği izolatın proteaz enziminin aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını 50-60°C olarak, optimum sıcaklığı ise 50°C olarak belirlemiştir. 50°C’de bu enzimin aktivitesi %100 iken 55°C’de %85’e düştüğünü gözlemlemektedir. 50°C’de enzimin 20 dakika ve 4 saat boyunca aktivitesini koruduğunu söylemiştir.

Sarı (2011), *B. circulans* M34’den proteazının sıcaklığının optimum 50°C olduğunu ve 40°C’de bir saat içinde kararlılığını büyük oranda koruduğunu, ancak enzimin 50, 60 ve 70°C’de kararlılığının ciddi oranda azaldığını belirtmiştir. Raval *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada haloalkalifilik bir bakteri olan *Bacillus pseudofirmus*’in proteaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklık aralığının 50-80°C olduğunu, optimum sıcaklığın ise 50°C olduğunu göstermişlerdir. 2 saat 50°C’de inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin %40, 60°C’de %65, 70°C’de %70 ve 80-90°C’de ise %50 oranında stabil kaldığını belirtmişlerdir. Vijayaraghavan *et al.* (2014), *B. cereus* strain AT bakterisinin proteaz aktivitesi üzerine yapmış oldukları çalışmada, enzim aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığının 40-50°C ve optimum sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu tespit etmişlerdir. 1 saat 50°C’de % 69 stabil olduğunu ve bu değer 60°C’deki stabiliteye göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Pant *et al.* (2015), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus subtilis* bakterisinin 45°C’de optimum aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Yılmaz vd., (2015) ise yapmış oldukları bir çalışmada *B. licheniformis* A10 straininin proteaz

enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 70°C’de olduğunu gözlemlemiş, 60-70°C arasında 1 saat boyunca enzim aktivitesinin %90 stabil olduğu sonucuna varmışlardır.

El-Gendi *et al.* (2016), *Bacillus methylotrophicus* SCJ4 straininin proteaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklık aralığının 50-70°C, optimum sıcaklık değerinin ise 55°C olduğunu ve 80°C’de enzimin aktivitesini %80 oranında kaybettiğini gözlemlemişlerdir. Narval *et al.* (2016), *B. subtilis* MTCC 10422 adlı strain üzerine yapmış oldukları bir çalışmada en uygun proteaz aktivitesinin 35-65°C’ler arasında olduğunu ve optimum sıcaklık değerinin de 45°C olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim 50 dk boyunca 35°C’de % 99,9 stabil iken 40°C’de %82 oranında stabil kalmış, bu çalışmada sıcaklık artışının stabiliteyi olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır. Hammami *et al.* (2017), ise *B. invictae* isimli bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışma neticesinde bakterinin enzim üretimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğunu, 3 saat boyunca enzimin 30-40°C arasında %100 stabil, 50°C’de ise %64 stabil olduğu sonucuna varmışlardır. Hussain *et al.* (2017), *B. subtilis* bakterisinin enzim üretimi için en uygun sıcaklığın 57°C olduğu, Marathe *et al.* (2017), ise yine *Bacillus* cinsi bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, optimum proteaz aktivite sıcaklığının 55°C olduğu sonucuna varmışlardır.

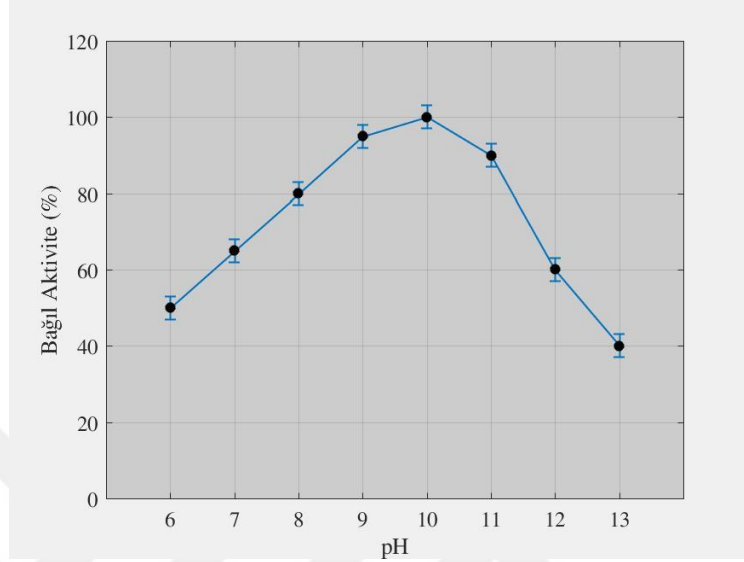
*B. pumilus* NK14 izolatı için 3 günlük inkübasyon sonunda 40°C’de aktivitesinin %65’ini kaybederek, *T. haemolytica* IY13 izolatı için ise 50°C’de, aktivitesinin %70’ini kaybederek en stabil durumu sergilediği görülmektedir. İnkübasyon sürelerinin daha önce yapılan çalışmalara göre uzun tutulduğu düşünülürse her iki izolatın proteaz enziminin oldukça stabil olduğu sonucuna varılabilmektedir.

#### **4.6.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisi ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi**

*B. pumilus* NK14 bakterisinin proteaz üretimi için en uygun pH’sını belirlemek amacıyla kültür süpernatantları, 50 mM konsantrasyonda farklı pH değerine sahip çeşitli tamponlarda (pH 6,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu, pH 7,0; Sodyum fosfat tamponu, pH 8,0-9,0; Tris-HCl, pH 10,0, 11,0, 12,0, 13,0; Glisin-NaOH) hazırlanan % 0,6 kazein substratıyla optimum sıcaklıkta (50°C) muamele edildi.



Proteaz enziminin en iyi çalıştığı pH aralığı 8,0-11,0 ve optimum pH ise 10,0 olarak belirlendi. En yüksek aktivite %100 olarak kabul edilerek diğer pH sonuçları bu bağlamda değerlendirildi (Şekil 4.8).

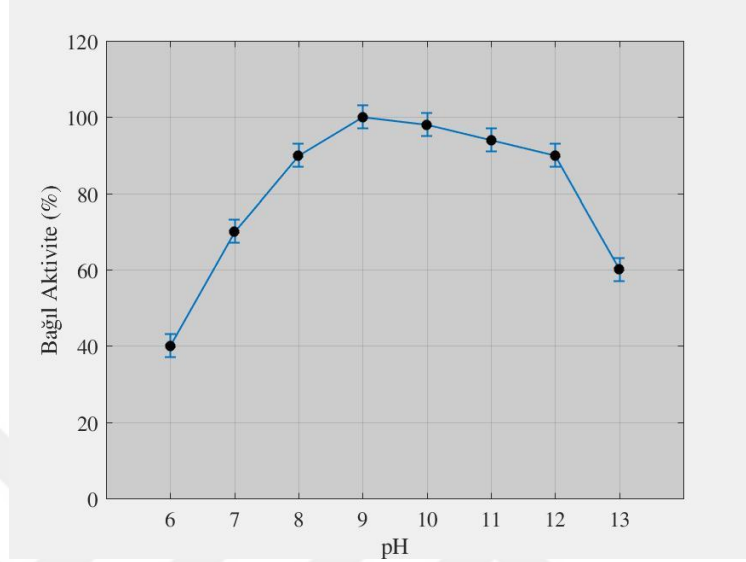


Şekil 4.8. *B. pumilus* NK14'ün pH'ya bağlı proteaz aktivitesi

*B. pumilus* NK14 bakterisinin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim, 30°C'de pH: 8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0'de; 1, 2 ve 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süreler öncesi ve sonrasında enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bakterinin proteaz enziminin inkübasyonlar öncesi aktiviteleri %100 olarak alındı ve bu değer ile kıyaslanarak kalan yüzde aktiviteleri hesaplandı. 1. gün sonunda tüm değerlerde enzim stabilitesini korudu ve aktivitesi % 100 olarak kaldı. 2. gündeki inkübasyon sonunda pH: 8,0 ve 9,0 'da enzimin stabilitesi değişmeyerek %100 olarak kaldı. pH: 10,0'da enzimin aktivitesinin % 5'ini, pH: 11,0'de %12'sini kaybettiği gözlemlendi. Yine 3. günde pH: 8,0 ve 9,0'da enzimin aktivitesinin %15'ini, pH: 10,0 değerinde %24'ünü, pH:11,0'de yaklaşık olarak %30'unu kaybettiği tespit edildi.

*T. haemolytica* IY13 bakterisinin proteaz üretimi için en uygun pH'sını belirlemek amacıyla kültür süpernatantları 50 mM konsantrasyonda, farklı pH değerine sahip çeşitli tamponlarda (pH 6,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu, pH 7,0; Sodyum fosfat tamponu, pH 8,0-9,0; Tris-HCl, pH 10,0, 11,0, 12,0, 13,0; Glisin-NaOH) hazırlanan % 0,6 kazein substratıyla, optimum sıcaklıkta (55°C) muamele edildi.

Proteaz enziminin en iyi çalıştığı pH aralığı 8,0-12,0 ve optimum pH ise 9,0 olarak belirlendi. En yüksek aktivite %100 olarak kabul edilip diğer pH sonuçları bu bağlamda değerlendirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *T. haemolytica* IY13'ün pH'ya bağlı proteaz aktivitesi

*T. haemolytica* IY13 bakterisinin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim, 30°C'de pH:8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0'de 1, 2 ve 3 gün boyunca inkübe edildi. Bu süreler sonunda enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bakterinin proteaz enziminin kalan yüzde aktivitesi hesaplandı. Bu hesaplamada inkübasyonu yapılmamış enzimin aktiviteleri %100 olarak alındı ve kıyaslamalar yapıldı. 1. gündeki inkübasyon sonunda pH: 8,0, 9,0 ve 10,0'da enzimin stabilitesi değişmeyerek %100 olarak kaldı. pH: 11,0'de ise aktivitesinin yaklaşık % 10'unu, 2. günde pH: 8,0'de aktivitesinin %8'ini, pH; 9,0 ve 10,0'da aktivitesinin yaklaşık %15'ini, pH: 11,0'de aktivitesinin %23'ünü kaybettiği belirdi. 3. günün sonunda pH: 8,0 ve 9,0'da aktivitesinin %28'ini, pH: 10,0'da aktivitesinin yaklaşık olarak %30'unu, pH: 11,0'de % 40'ını kaybettiği tespit edildi.

*B. pumilus* NK14 izolatu için optimum pH'nın 10,0, *T. haemolytica* IY13 izolatu için ise optimum pH'nın 9,0 olduğu tespit edildi. Sonuçlar dikkate alındığında ve literatürdeki verilerle kıyaslandığında aktiviteleri belirlenen proteazların alkalen proteaz oldukları anlaşıldı. Gupta *et al.* (2001), çalışmalarında *Bacillus* sp.'den elde ettikleri proteaz enziminin optimum pH aralığını 11,0 olarak belirtmiş, 1 saat boyuca 25°C'de inkübasyonu neticesinde pH 60-12,0 aralığında stabil kaldığını

gözlemlemiştir. Yine Zhang *et al.* (2003), *B. pumilus*'dan elde ettikleri proteaz enziminin pH 6,0-11,0'de kararlılığını koruduğunu ve pH 10,0'da optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Erarslan vd., (2004), *B. clausii* GMBAE 42 izolatından elde ettikleri proteaz enziminin optimum pH'sını 11,3 olarak belirlemiş, oda sıcaklığında 4 günlük stabilite değerlendirmesi sonucunda pH 9,0-11,5 değerlerinde aktivitesinin tamamını korurken, pH 12,0-13,0 arasında %30'luk bir aktivite kaybı olduğunu gözlemlemiştir.

Nasri *et al.* (2006), *B. licheniformis* RP1 izolatına ait proteaz enziminin pH 7,0-13,0 değerlerinde aktivite gösterdiğini, optimum pH'sının da 10,0-11,0 olduğunu belirlemişlerdir. 40°C'de, 1 saatlik farklı pH uygulamaları sonucunda enzimin pH: 8,0-10,0'da stabil olduğunu, pH 11,0'de %96, pH 12,0'de %72 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Alpan (2008), yapmış olduğu çalışmada, iki farklı izolattan elde ettiği proteaz enzimlerinin pH 6,0-11,0 aralığındaki aktivitelerini belirlemiş optimum pH'larını 9,5 ve 9,0 olarak bulmuştur. Enzimler pH 8,0-10,5 aralığında stabilite bakımından %85 ve %75 aktivite göstermişlerdir. Tekin (2008), yaptığı çalışmada izolatlarından elde ettiği alkalin proteaz enziminin pH aralığının, 50°C'de 10,0-12,0, optimum pH değerinin ise 11,0 olduğunu belirtmiştir. Enzimin optimum pH 11,0'de bağıl enzim aktivitesini %100, pH 10,5'de %97, pH 11,5'de %96 olarak ölçmüştür. 30°C'de ise enzimin optimum pH'sı olan 11,0'de 20 dk ve 3 gün boyunca stabilitesini koruyarak %100 kaldığını belirlemiştir.

Raval *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada haloalkalifilik bir bakteri olan *B. pseudofirmus*'in proteaz enzimi üretimi için en uygun pH aralığının 8,0-11,0, optimum pH'nın ise 10,0 olduğunu göstermişlerdir. 24 saat boyunca pH 8,0-11,0 aralığında enzim aktivitesinde minimal düzeyde kayıp söz konusu olduğundan bu aralıkta enzimin stabil olduğu sonucuna varmışlardır. Vijayaraghavan *et al.* (2014), *B. cereus* strain AT bakterisinin proteaz aktivitesi üzerine yapmış oldukları çalışmada, enzim aktivitesi için en uygun pH aralığının 6,0-10,0 olduğunu ve optimum pH'nın 9,0 olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim stabilitesinin pH 8,0'de %98, pH 9,0'da %100 ve pH 10,0'da % 47,5 olduğunu gözlemlemiştir. Yılmaz vd., (2015), yapmış oldukları bir çalışmada *B. licheniformis* A10 straininin proteaz enzim aktivitesi için en uygun pH aralığının 7,5-10,5 ve optimum pH'nın 9,0 olduğunu, El-Gendi *et al.* (2016),

*B. methylotrophicus* SCJ4 straininin proteaz enzimi için optimum pH'nın 9,0 olduğunu ve pH: 10,0'da stabilitesinin %20'sinin kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

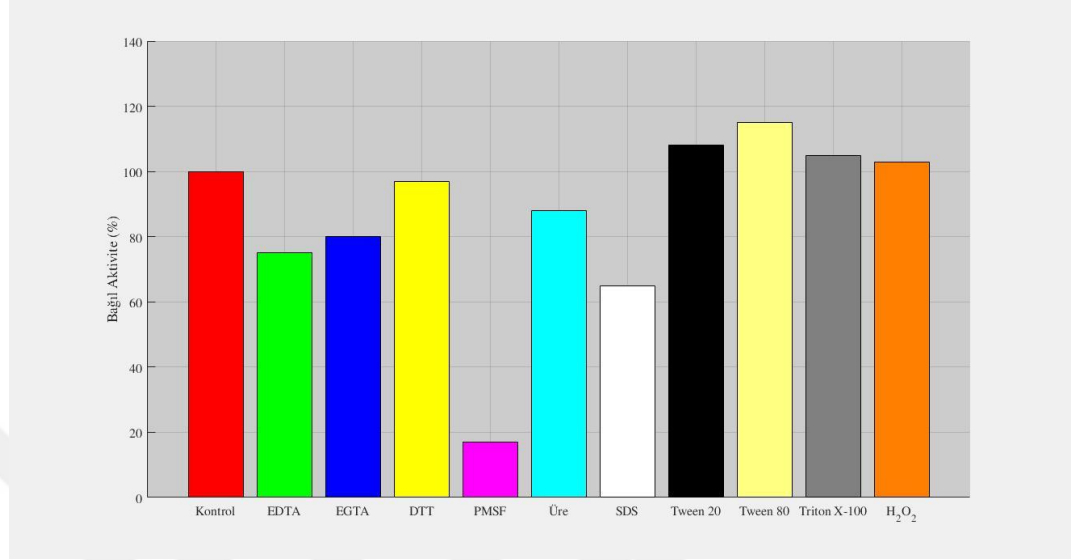
Narval *et al.* (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *B. subtilis* MTCC 10422 için en uygun pH aralığının 5,0-8,0 ve optimum pH'nın da 6,0 olduğunu gözlemlemişlerdir. Sarkar and Paul (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus* sp. DSP2 isimli strainin enzim aktivitesinin pH 6,0-8,0 aralığında (opt. 6,0) maksimum olduğunu, Hammami *et al.* (2017), ise *B. invictae* isimli bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışma neticesinde bakterinin enzim aktivitesi için en uygun pH aralığının 8,0-12,0 ve optimum pH'nın ise 9,0-11,0 olduğunu, 60 dk boyunca 40°C'de pH 6,0 ve 13,0 aralığında enzim aktivitesinin %81'den fazlasının stabilitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Hussain *et al.* (2017), *B. subtilis* bakterisinin enzim üretimi için en uygun pH aralığının 8,0-11,0 olduğunu (opt. 8,0), Marathe *et al.* (2017), ise *Bacillus* sp. cinsi bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, optimum proteaz aktivite pH'sının 10,0 olduğu sonucuna varmışlardır.

*B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 izolatları için 3 günlük inkübasyon sonunda aktivitelerinin sırasıyla %15 e %28'ini kaybetmeleriyle en stabil durumun, pH 8,0 ve 9,0'da olduğu sonucuna varıldı. Proteaz enziminin deterjan sanayi uygulamalarında pH stabilitesi önemli bir kriterdir. Yapılan çalışma neticesinde her iki izolat için de pH 8,0 ve 9,0 değerlerinin oldukça stabil olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca diğer pH değerlerinde de enzim aktivitesinin 3 günlük inkübasyona rağmen %50'nin altına düşmediği gözlemlendi. Bu durum göz önüne alındığında, elde edilen proteaz enziminin raf ömrü bakımından dayanıklı olabileceği öngörüldü.

#### **4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkisi**

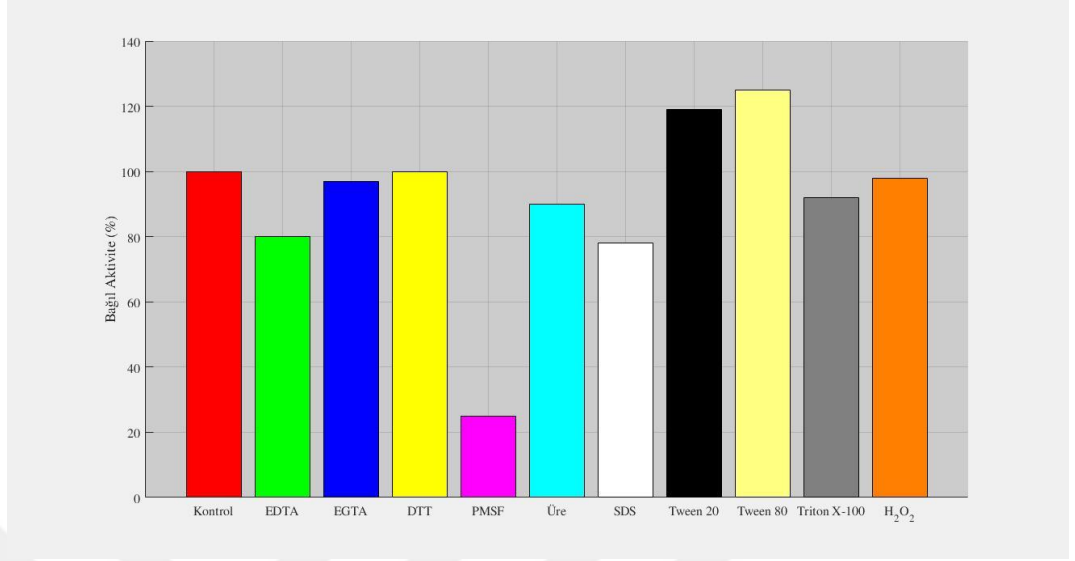
*B. pumilus* NK14'ün kültür süpernatantı 5mM konsantrasyonlardaki EDTA, EGTA, DTT, PMSF, üre ve %1 konsantrasyondaki SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile aynı oranda karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı. İnkübasyonlar sonrası aktivite tayini yapılarak, kontrole göre kalan bağıl aktivite saptandı. Oranlar %

olarak Şekil 4.10’inde verildi. Bu sonuçlara göre kalan bağıl aktiviteler; EDTA %75, EGTA %80, DTT %97, PMSF %17, üre %88, SDS %65, Tween 20 %108, Tween 80 %115, Triton X-100 %105 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> %103 olarak hesaplandı.



**Şekil 4.10.** Bazı inhibitör ve denatüranların *B. pumilus* NK14’ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi

*T. haemolytica* IY13’ün kültür süpernatantları; 5mM konsantrasyonlardaki EDTA, EGTA, DTT, PMSF, üre ve %1 konsantrasyondaki SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile aynı oranda karıştırılarak 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı. İnkübasyonlar sonrası aktivite tayini yapılarak, kontrole göre kalan bağıl aktiviteleri saptandı. Oranlar % olarak Şekil 4.11’inde verildi. Bu sonuçlara göre kalan bağıl aktiviteler; EDTA %80, EGTA %97, DTT %100 (değişmedi), PMSF %25, üre %90, SDS %78, Tween 20 %119, Tween 80 %125, Triton X-100 %92 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> %98 olarak hesaplandı.



**Şekil 4.11.** Bazı inhibitör ve denatüranların *T. haemolytica* IY13'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi

Zhang *et al.* (2003), yapmış oldukları bir çalışmada *B. pumilus* bakterisinden elde ettikleri proteaz enziminin 1 mM PMSF ile muamelesi sonucu tamamen inhibe olduğunu, 1 mM EDTA ile %16, 10 mM EDTA ile %51 oranında aktivite kaybettiğini, Nasri *et al.* (2006), yapmış oldukları bir çalışmada, *B. licheniformis* RP1'nin alkali proteazının 5 mM PMSF ile tamamen aktivitesini kaybettiği, %0,1 ve %0,5 SDS ile %9 ve %27 oranında aktivitesini kaybettiği, 5mM EDTA ile aktivitesinin %70 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca iyonik olmayan sürfaktanların aktivite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Ryu *et al.* (2008), *Bacillus sp.*'nin %1 konsantrasyonundaki SDS ilavesi ile enzim aktivitesinin %23 oranında azaldığını, Triton X-100 ile %17, Tween 80 ile ise %24 oranında arttığını, 2mM EDTA ile %35,7 oranında inhibe olduğunu ve yine 1mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu yayınlamışlardır. Jain *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus sp.* cinsi bir bakterinin proteaz enzim aktivitesinin 5 mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 2 mM EDTA ile %7, 5 mM EDTA ile de %51 oranında inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin, Tween 80, Triton X-100, SDS ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı stabilitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *B. pumilis* MCAS8'den elde ettikleri proteaz

enziminin PMSF ile büyük bir oranda inhibe olduğunu, DTT ile aktivitenin %88'e, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile de yine %88'e düştüğünü gözlemlemişler; Triton X-100 ile %105'e, Tween 80 ile %112'ye ve son olarak SDS ile %120'ye çıktığını tespit etmişlerdir. EDTA, EGTA ve ürenin aktiviteyi olumsuz etkilediğini vurgulamışlardır (%74, %72, %18).

Karbalaei-Heidari *et al.* (2013), yapmış oldukları bir çalışmada halofilik bakteri *Salinivibrio* sp. MS-7'den elde ettikleri proteaz enziminin, 3,3 mM PMSF ile tamamen inhibe olduğunu, 10 mM'lık EDTA ile %5, 6 mM'lık üre ile %76 aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. %1 lik SDS ile %10,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile %75, Triton X-100 ile %94,7, Tween 20 ve Tween 80 ile %100 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Raval *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada haloalkalifilik bir bakteri olan *B. pseudofirmus*'in proteaz enzimi aktivitesi üzerine %1 oranındaki SDS'in 30 dk'da %60 oranında bir kayba neden olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan kalan aktiviteyi, EDTA %98, DTT ise %88 oranına kadar düşürdüğünü, PMSF'nin büyük bir oranda inhibe ettiğini, Tween 20 ile aktivitenin %80, Tween 80 ve Triton X-100 ile büyük bir oranda stabil olduğunu belirtmişlerdir. Vijayaraghavan *et al.* (2014), proteaz enzim çalışmasında %1 SDS'in aktiviteyi artırdığını (118,2), PMSF ile büyük oranda inhibe olduğunu, Tween 20 ile aktivitenin %124, Tween 80 ile ise %107 ve Triton X-100 ile %128 olduğunu gözlemlemişlerdir. Yılmaz vd., (2015) *B. licheniformis* A10 strainde PMSF'nin büyük bir oranda olmakla beraber yine SDS, EDTA, üre, Tween 20, Tween 80, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Triton X-100'ün aktiviteyi inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

El-Gendi *et al.* (2016), *B. methylotrophicus* SCJ4 straininin proteaz enzimi için SDS ve EDTA'nın inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (%62 ve %98). Narval *et al.* (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *B. subtilis* MTCC 10422 adlı straininin proteaz aktivitesi üzerine EDTA'nın inhibe edici etkisinin olduğunu vurgulamışlardır. Hammami *et al.* (2017), ise *B. invictae* ile yapmış oldukları bir çalışma neticesinde bakterinin enzim üretimi üzerine EDTA'nın inhibe edici özelliği olduğunu tespit etmişlerdir. PMSF'nin enzimi büyük oranda inhibe etmekte olduğunu gözlemlemişler, Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100'ün %1 lik konsantrasyonunun enzim aktiitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmazken %5'lik konsantrasyonun aktiviteyi sırasıyla %16, %17 ve %53 oranında inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Marathe *et al.* (2017), *Bacillus* sp. cinsi bir bakteri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, SDS'in proteaz

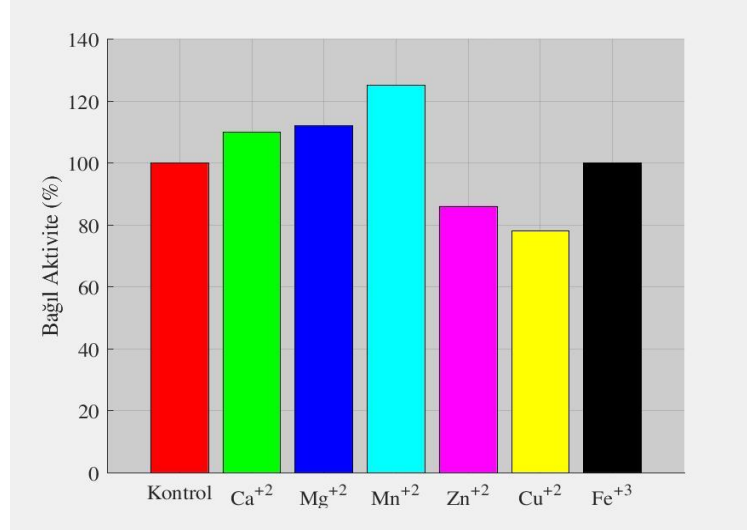
enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkide olduğunu ispat etmişlerdir. Yine aynı çalışmada Tween-20'nin %5 ve Triton X-100'ün %5 oranında aktiviteyi olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır.

PMSF, serin proteaz enziminin aktif bölgesinde yer alan serin, lizin, arjinin, triptofan ve histidin aminoasitlerini değiştirerek enzimi inhibe etmektedir. Çalışmada *B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 izolatlarına ait proteaz enzimlerinin 5 mM PMSF varlığında tamamen olmasa bile büyük bir oranda inhibe olduğu gözlemlendi. Bu nedenle her iki enzimin de serin alkalen proteaz ailesine dahil olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca her iki enzimin de 5 mM konsantrasyondaki EDTA varlığında aktivite kaybına uğradığı tespit edildi. Bu bağlamda enzimlerin metal bağlama bölgelerinin olduğu, yani metalloproteaz ailesine de dahil olabileceği düşünüldü.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, okside edici bir ajandır ve alkalen proteaz enzimleri eğer bu ajana karşı stabilite gösteriyorsa, beyazlatıcı deterjan formüllerine karşı uygun olabileceği söylenmektedir. Bu yüzden özellikle deterjan sanayisinde kullanılacak enzimlerin bu ajana karşı dirençli olması beklenmektedir. Çalışmada *B. pumilus* NK14'ün proteaz enziminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajanının %1'lik konsantrasyonunda aktivitesinin % 3 oranda arttığı, *T. haemolytica* IY13'ün ise %2 oranında azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajanının bu izolatların proteaz aktivitesine büyük bir etkisinin olmadığı ve deterjan sanayisinde bu enzimlerin kullanılabilir olduğu tespit edildi.

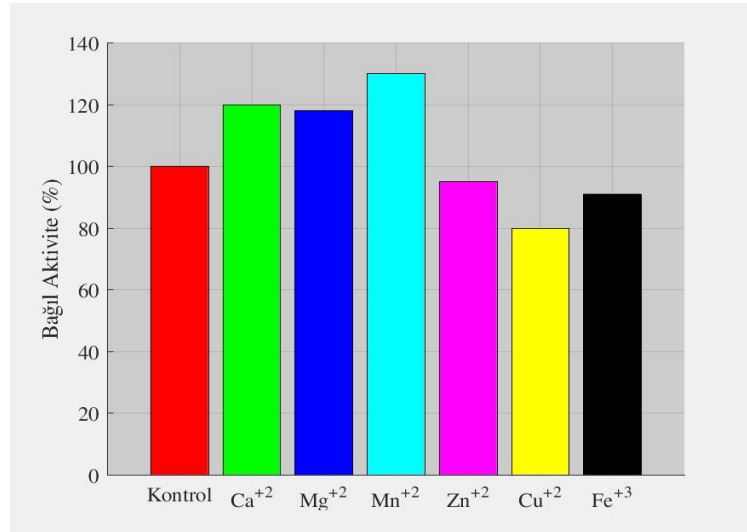
*B. pumilus* NK14 kültür süpernatantları, çeşitli divalent metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkisini saptamak amacıyla, 5mM FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> ve CaSO<sub>4</sub> çözeltileri varlığında inkübe edildi ve akabinde kontrole karşı kalan bağıl aktiviteleri hesaplandı. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.12'sinde gösterildi. Sonuçlara göre Fe<sup>+3</sup> iyonu aktivite üzerinde herhangi bir etkide bulunmamışken aktiviteyi artıran iyonların Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>; aktiviteyi azaltan iyonların da Zn<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> olduğu tespit edildi. Buna göre kontrole göre bağıl aktivite değerleri; Ca<sup>+2</sup> % 110, Mg<sup>+2</sup> % 112, Mn<sup>+2</sup> % 125, Zn<sup>+2</sup> % 86, Cu<sup>+2</sup> %78, Fe<sup>+3</sup> % 100 olarak belirlendi.





**Şekil 4.12.** Bazı metal iyonlarının *B. pumilus* NK14'ten elde edilen proteaz enziminin aktivitesine etkisi

*T. haemolytica* IY13 kültür süpernatantları, çeşitli divalent metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkisini saptamak amacıyla, 5mM FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> ve CaSO<sub>4</sub> varlığında inkübe edildi ve akabinde kontrole karşı kalan bağlı aktiviteleri hesaplandı. Kontrol olarak, bu maddelerin ilave edilmediği kültür süpernatantları kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.13'ünde gösterildi. Sonuçlara göre aktiviteyi artıran iyonlar Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> iken aktiviteyi azaltan iyonlar da Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> olduğu tespit edildi. Buna göre kontrole göre bağlı aktivite değerleri Ca<sup>+2</sup> % 120, Mg<sup>+2</sup> % 118, Mn<sup>+2</sup> % 130, Zn<sup>+2</sup> % 95, Cu<sup>+2</sup> % 80, Fe<sup>+3</sup> % 91 olarak belirlendi.



**Şekil 4.13.** Bazı metal iyonlarının *T. haemolytica* IY13'ten elde edilen proteazenziminin aktivitesine etkisi

Zhang *et al.* (2003), *B. pumilis*'ten elde ettikleri proteaz enziminin aktivitesinin 10 mM  $Ca^{+2}$  ile yaklaşık olarak %20 arttığını, 10mM  $Mg^{+2}$  ile %15 arttığını,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  ilaveleri ile %15-20 azaldığını açıklamışlardır. Erarslan vd., (2004), *B. clausii* GMBAE 42 izolatından elde ettikleri proteaz enziminin 5mM  $Cu^{+2}$  ile %40,  $Mn^{+2}$  ile %16,  $Ca^{+2}$  ile %12 oranında inhibe olduğunu,  $Zn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının ise aktiviteye herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Sarnaik *et al.* (2006), *B. cereus* MCM B-326 izolatından elde etmiş oldukları termofilik proteaz enzim aktivitesinin  $Fe^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonları ile %30 ve %60 oranında azaldığını,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  iyonları ile ise aktivitenin tamamen kaybedildiğini gözlemlemişlerdir. Alpan (2008), yapmış olduğu tez çalışmasında izolatının alkali proteaz aktivitesinin, 2 mM  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  ilaveleri ile artış gösterdiğini rapor etmiştir.  $Ca^{+2}$  metal iyonunun %165 oranı ile diğer metal oranlarına kıyasla aktiviteyi en çok artıran iyon olduğunu belirtmiştir. 10 mM  $CuCl_2$  ilavesinin, enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi oluşturduğunu ve enzim aktivitesini düşürdüğünü gözlemiştir. Bir diğer izolatının proteaz enzim aktivitesinin 2 mM  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$  ve 10 mM  $FeCl_3$  ilaveleri ile arttığını belirlemiştir. Enzim aktivitesini en fazla %136 oranı ile 10 mM  $FeCl_3$ 'ün yükselttiğini rapor etmiştir.  $MnCl_2$ ,  $ZnCl_2$  ve  $CuCl_2$ 'ün enzim aktivitesini düşürerek aktivite üzerinde inhibitör etkide olduğunu belirtmiştir.

Tekin (2008), yapmış olduğu tez çalışmasında,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini araştırmıştır.  $Ca^{+2}$  iyonunun proteaz enzim aktivitesini sadece %1 oranında artırdığını,  $Mg^{+2}$  iyonunun %4,  $Fe^{+2}$  iyonunun %3 oranında azalttığını,  $Zn^{+2}$  iyonunun ise aktivite üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını gözlemlemiştir. APT5 alkalin proteazının aktivitesinin diğer iyonlarla aynı karakteristik özellikleri gösteren  $Mn^{+2}$  iyonu ile %153 oranında artırdığını belirlemiştir. Bu nedenle de  $Mn^{+2}$  iyonunun bu proteaz enzimi için kofaktör etkisi olduğunu vurgulamıştır. Jain *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus* sp. cinsi bir bakteriden elde ettikleri proteaz enziminin aktivitesi üzerinde;  $Ca^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığını (%109, %198);  $Cu^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının da aktiviteyi düşürdüğünü (%37, %7, %5) gözlemlemişlerdir.

Jayakumar *et al.* (2012), yapmış oldukları bir çalışmada *B. pumilis* MCAS8 izolatının enzim aktivitesinin  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarıyla arttığını (%107, %107);  $Fe^{+3}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarıyla ise azaldığını (%21, %22), Karbalaeei-Heidari *et al.* (2013), ise yine  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığını (%117, %131),  $Zn^{+2}$  iyonunun ise aktiviteyi azalttığını (%85) gözlemlemişlerdir. Raval *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada haloalkalifilik bir bakteri olan *B. pseudofirmus*'in proteaz enzimi aktivitesi üzerinde  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının %2-6 oranında düşüşe neden olduğunu,  $Ca^{+2}$ 'un ise aktivite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Vijayaraghavan *et al* (2014), *B. cereus* strain AT bakterisinin proteaz aktivitesi üzerine yapmış oldukları çalışmada,  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini artırmasına (%104 ve %107) rağmen,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$ 'nin aktiviteyi düşürdüğünü (%68,5, %60 ve %84) gözlemlemişlerdir. Yılmaz vd., (2015) yapmış oldukları bir çalışmada *B. licheniformis* A10 straininin proteaz enzim aktivitesi üzerine  $Zn^{+2}$ 'nin olumsuz etkisi varken  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi yükselttiğini vurgulamışlardır. Narval *et al* (2016), ise *B. subtilis* MTCC 10422 kodlu strainin enzim aktivitesi için  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$ 'nin aktive etkisinin (%206, %198),  $Zn^{+2}$ 'nin ise inhibitör etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sarkar and Paul (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus* sp. DSP2 isimli strainin enzim aktivitesi üzerine  $Fe^{+3}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının inhibe edici,  $Mn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının ise aktive edici etkisi olduğunu, Hammami *et al* (2017), ise *B. invictae* isimli bir bakterinin enzim üretimi üzerine  $Zn^{+2}$  iyonunun olumsuz etki gösterdiğinin ve  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  iyonlarının ise herhangi bir etkisinin bulunmadığı sonucuna varmışlardır. Hussain *et al* (2017), *B. subtilis* bakterisinin enzim üretimi üzerine  $Mg^{+2}$ 'nin aktive edici rol oynadığını ancak  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  iyonlarının inhibe edici etkide olduğunun sonucuna varmışlardır.

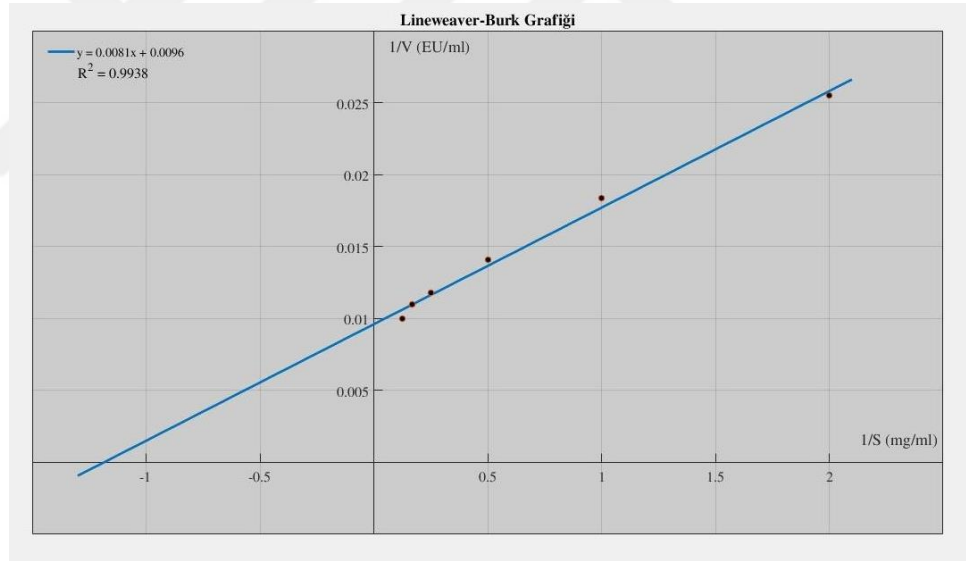
Alkalen proteaz enzimleri aktivite gösterebilmeleri için  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi metal iyonlarına ya da bu iyonların farklı formlarına gereksinim duymaktadırlar. Özellikle de *Bacillus* cinsi bakterilerde bu metal iyonları enzim kararlılığını artırmaktadır. Enzimin yüksek sıcaklık değerlerine karşı gösterdiği kararlılığı sürdürmesinde ve enzimin aktif formunu korumasında bu iyonların etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Kumar and Takagi 1999). Yapılan bu çalışmada da  $Ca^{+2}$ ,

Mn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> iyonlarının aktiviteyi olumlu etkilediği gözlemlendi. Bu metal iyonlarının her iki izolatin proteaz enzimi için kofaktör olabileceği düşünüldü.

#### 4.6.5. Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri

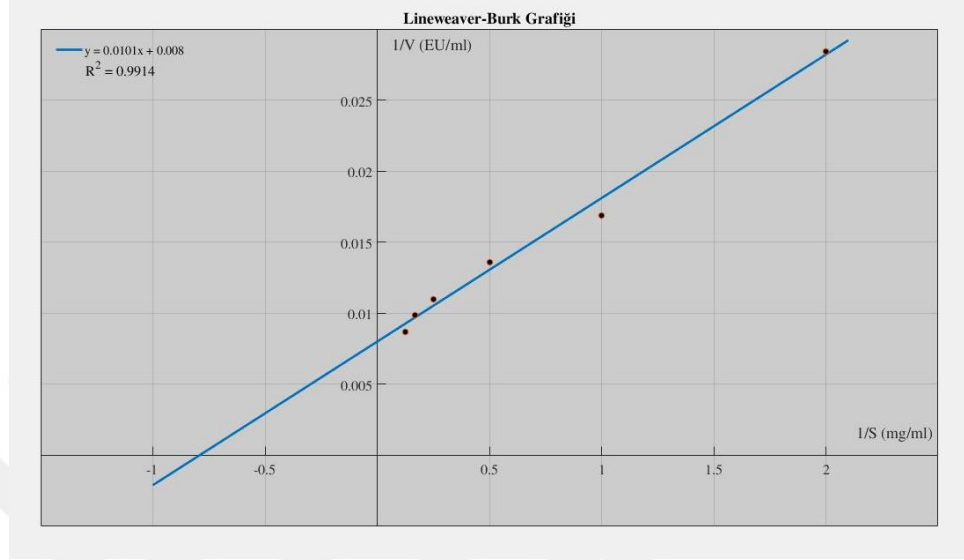
Kazein substratının miktarı değiştirilerek enzimin konsantrasyonu sabit tutulup aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve bu grafiklerden  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri hakkında bilgi edinildi. Grafiğin x eksenini kestiği noktadan  $K_m$  değeri, y eksenini kestiği noktadan  $V_{max}$  değeri belirlendi.

*B. pumilus* NK14 için bulunan denklemden yola çıkarak doğrunun x eksenini kestiği noktadan  $K_m$  değeri 0,673 mg/ml, y eksenini kestiği noktadan da  $V_{max}$  değeri 99 EU/ml olarak belirlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *B. pumilus* NK14'ün Lineweaver-Burk grafiği

*T. haemolytica* IY13 için bulunan denklemden yola çıkarak doğrunun x eksenini kestiği noktadan  $K_m$  değeri 1,262 mg/ml, y eksenini kestiği noktadan da  $V_{max}$  değeri 125 EU/ml olarak belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *T. haemolytica* IY13'ün Lineweaver-Burk grafiği

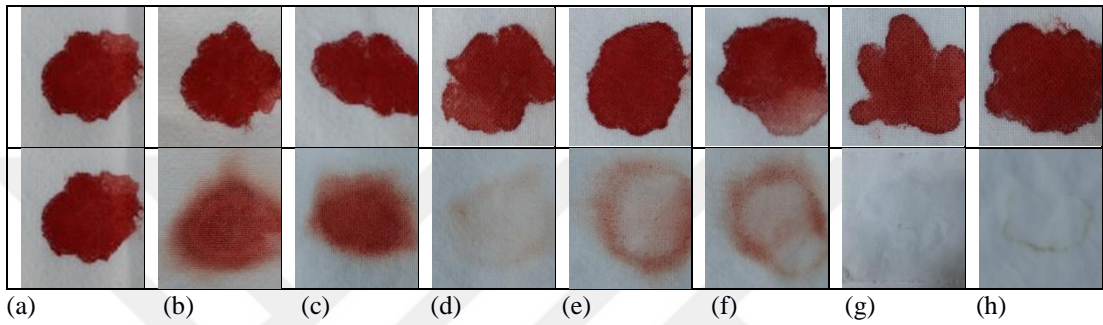
Karbalaeei-Heidari *et al.* (2013), yapmış oldukları bir çalışmada halofilik bir bakteri olan *Salinivibrio* strain MS-7'nin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 1.14 mg/ml, 130 U/mg olarak belirlemişlerdir. Raval *et al.* (2014) yapmış oldukları bir çalışmada *B. pseudofirmus* bakterisinin proteaz enzimine ait  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 0.08 mg/ml ile 1150 U/ml, Yılmaz vd., (2015) ise yapmış oldukları bir çalışmada

*B. licheniformis* A10 strainine ait  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini; 0.033 mg/ml ve 8,17 mmol/ml.min olarak hesaplamışlardır. Narval *et al.* (2016), *B. subtilis* MTCC 10422 adlı strain üzerine yapmış oldukları bir çalışmada en uygun proteaz aktivitesi için  $K_m$  değerini; 5 mg/ml, Hussain *et al.* (2017), *B. subtilis* bakterisinin enzim üretimi için en uygun  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini; 0.090 mg/mL ile 200 U/mL olarak belirlemişlerdir.

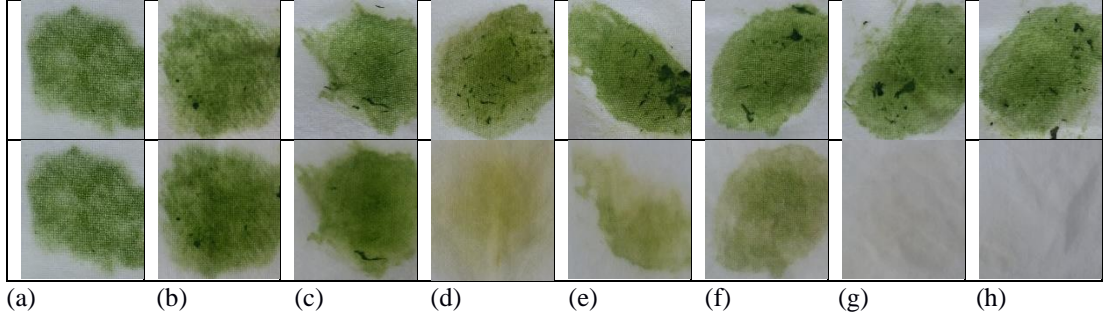
Yapılan literatür incelemeleri sonucunda  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin değişen aralıklarda hesaplanmış olduğu ve belirgin bir aralığının olmadığı göze çarpmaktadır. Bu çalışma neticesinde hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri de literatürdeki verilerin arasında bir değer göstermektedir.

#### 4.6.6. Proteaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları

Proteaz enziminin deterjanlarda leke çıkarıcı etkilerini araştırmak amacıyla yapılan ilk uygulamada; lekeli kumaş parçaları steril su, besiyeri, deterjanlı su, kùltür süpernatantı ve deterjan-kùltür süpernatantı içerisinde bekletildi. Kumaş parçalarının uygulamadan önce ve sonrasına ait değerlendirme Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’inde gùsterildi.

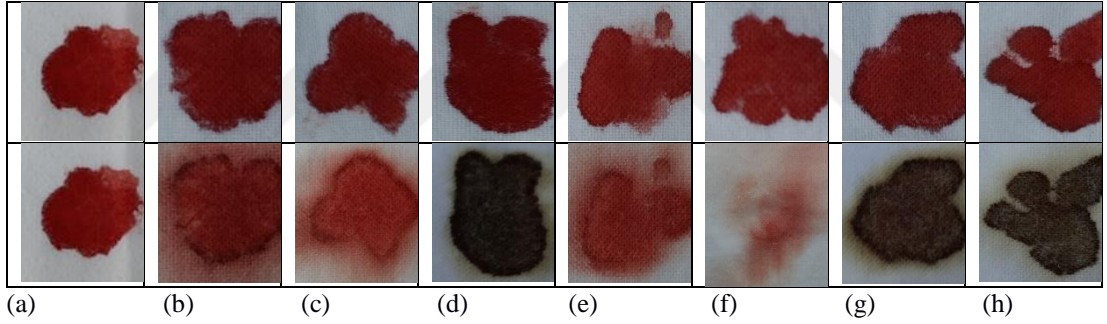


**Şekil 4.16.** Proteaz enziminin kan lekesi üzerine etkisi a) Kontrol, b) Distile su ile muamele, c) Besiyeri ile muamele, d) Deterjan ile muamele, e) *B. pumilus* NK14 proteazı ile muamele, f) *T. haemolytica* IY13 proteazı ile muamele, g) *B. pumilus* NK14 proteazı ve deterjan ile muamele h) *T. haemolytica* IY13 proteazı ve deterjan ile muamele.

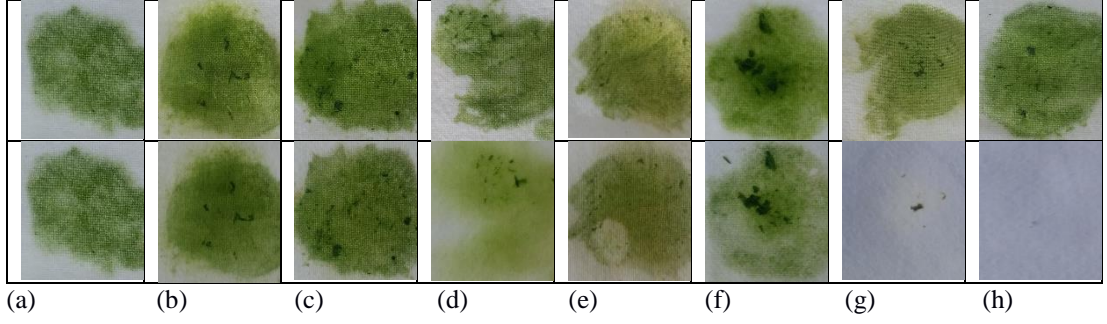


**Şekil 4.17.** Proteaz enziminin çimen lekesi üzerine etkisi a) Kontrol, b) Distile su ile muamele, c) Besiyeri ile muamele, d) Deterjan ile muamele, e) *B. pumilus* NK14 proteazı ile muamele, f) *T. haemolytica* IY13 proteazı ile muamele, g) *B. pumilus* NK14 proteazı ve deterjan ile muamele h) *T. haemolytica* IY13 proteazı ve deterjan ile muamele

İkinci uygulamada ise lekeli kumaş parçalarının üzerine steril su, besiyeri, deterjanlı su, kültür süpernatantı ve deterjan-kültür süpernatantı karışımları püskürtülerek uygulandı. Kumaş parçalarının uygulamadan önce ve sonrasına ait değerlendirme Şekil 4.18 ve 4.19’unda belirtildi.



**Şekil 4.18.** Proteaz enziminin kan lekesi üzerine püskürtme sonuçları a) Kontrol, b) Distile su ile muamele, c) Besiyeri ile muamele, d) Deterjan ile muamele, e) *B. pumilus* NK14 proteazı ile muamele, f) *T. haemolytica* IY13 proteazı ile muamele, g) *B. pumilus* NK14 proteazı ve deterjan ile muamele h) *T. haemolytica* IY13 proteazı ve deterjan ile muamele



**Şekil 4.19.** Proteaz enziminin çimen lekesi üzerine püskürtme sonuçları a) Kontrol, b) Distile su ile muamele, c) Besiyeri ile muamele, d) Deterjan ile muamele, e) *B. pumilus* NK14 proteazı ile muamele, f) *T. haemolytica* IY13 proteazı ile muamele, g) *B. pumilus* NK14 proteazı ve deterjan ile muamele h) *T. haemolytica* IY13 proteazı ve deterjan ile muamele

Görüldüğü üzere izolatların, deterjanla birlikte kullanımı lekelerin çıkarılmasında oldukça etkilidir. Bu nedenle elde edilen izolatların deterjan sanayide leke çıkarmada etkili olabileceği ve deterjanlara katkı maddesi olarak eklenebileceği önerilmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan izolasyonlarda toplam 85 bakteri izole edildi. Bu bakterilerin 23 tanesi Erzurum İli'nde bulunan Hasankale ilçesinde yer alan sıcak su kaynaklarından, 32 tanesi Ilıca sıcak su kaynaklarından ve 30 tanesi de Nenehatun sıcak su kaynaklarından izole edildi. Çalışmada kış (Aralık-Ocak) ve bahar dönemlerinde (Nisan) su kaynaklarından örnekler alınarak izolasyonlar bunlar üzerinden gerçekleştirildi. Farklı dönemlerde alınan örnekler arasında dönemsel olarak mikroorganizma içeriğinde büyük farklılıklara rastlanmadı. Çalışmada Hasankale ve Ilıca sıcak su kaynaklarından elde edilen izolatlar arasında benzerlikler görülmesine karşın Nenehatun sıcak su kaynaklarından yapılan izolasyonlarda Türkiye sıcak su kaynaklarında da daha önceden tespit edilmeyen ülke için yeni kayıt olabilecek izolatlar tespit edildi (*Silanimonas lenta*, *Thermomonas hydrothermalis*, *Thermomonas haemolytica*, *Thauera* sp.)

Çalışmada yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatlar, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri tespit edilerek konvensiyonel olarak tanılandığı gibi moleküler tanı ve sınıflandırmada genel olarak tercih edilen 16S rRNA gen sekansları çıkarılıp var olan diğer türlerle kıyaslanarak da aralarındaki benzerlik ve farklılıklar değerlendirildi. Bakterilerin tanılanmasında kullanılan ve evrimsel olarak korunmuş gen bölgelerinin dizi analizini çıkarmak için öncelikle tüm izolatların DNA'ları izole edildi. Öncelikle izolatların gen profillerini ve aralarındaki akrabalığı moleküler boyutta belirlemek amacıyla ERIC PCR yapıldı. ERIC PCR sonucunda aynı genetik profili sergileyen izolatlar belirlenip farklı olarak seçilen 38 izolat çalışmanın sonraki aşamalarında kullanıldı.

ERIC PCR ile farklı bant profiline sahip olduğu tespit edilen 38 izolat proteaz aktivitesi açısından değerlendirildi. Bu amaçla izolatlar %10 oranında skim milk içeren besiyerlerine ekilerek 3 gün boyunca inkübe edildi ve petri üzerinde zon oluşturan toplamda 29 örneğin proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Tüm izolatların en büyük zon oluşumunu üçüncü günde gösterdiği belirlendi.

Proteaz enzim aktivitesi gösteren izolatların 16S rRNA gen bölgeleri PCR ile amplifiye edildi ve tür seviyesinde tanıların yapılması amacıyla öncelikle komponent *E.coli* hücrelerine klonlandı. Sırasıyla ligasyon, transformasyon ve koloni PCR işlemleri gerçekleştirildi. Koloni PCR sonucunda en parlak bant veren örneklerin plazmit izolasyonları yapıldı ve sekans analizi için MedSanTek firmasına gönderildi. Gelen sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak yorumlandı ve genbankasındaki verilerle kıyaslanarak izolatların 28 tanesinin tür seviyesinde bir tanesinin de cins seviyesinde tanısı yapıldı. Toplamda sekans analizine tabii tutulan izolatların 9 farklı türe ait olduğu tespit edildi. İzolatlara ait filogenetik ağaç çizilerek birbirleriyle akrabalık ilişkileri ortaya konuldu.

Petri deneylerinde proteaz enzimi ürettiği tespit edilen 29 izolatın içerisinde en iyi aktivite gösteren *Bacillus pumilus* NK14 ve *Thermomonas haemolytica* IY13 izolatları seçilerek bu iki izolatın enzim aktivite tayinleri yapıldı. İzolatların proteaz enzim aktivitesini değerlendirmek amacıyla %0.6 konsantrasyonda kazeinin substrat olarak kullanıldığı besi ortamına ekimleri yapıldı ve üç gün boyunca enzim aktiviteleri ölçülerek en yüksek aktiviteyi gösterdikleri süre tespit edildi. Her iki izolatın da maksimum enzim aktivitesini üçüncü günde gösterdiği belirlendi. Her iki izolat için de deneyler üç kez tekrar edildi ve ortalama değerler alınarak sonuçlar yorumlandı.

*B. pumilus* NK14 izolatının optimum enzim aktivitesi gösterdiği sıcaklık aralığı 45-65°C ve optimum sıcaklığı ise 50°C olarak belirlendi. İzolatın 3 günün sonunda 40°C sıcaklık değerinde, diğer sıcaklık değerlerine kıyasla daha stabil olduğu gözlemlendi. Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde ise optimum pH'sının 10.0 olduğu, bu değerden yola çıkarak bu enzimin bir alkalın proteaz olabileceği düşünüldü ve 3 günlük inkübasyon sonrasında pH 8 ve 9'da stabilitesini koruduğu gözlemlendi.

*T. haemolytica* IY13 izolatı için maksimum enzim aktivite aralığı 50-65°C, optimum 55°C, optimum pH'sı ise 9 olarak tespit edildi. İzolatın 3 günlük inkübasyon sonunda 50°C sıcaklık aralığında ve pH 8 ile 9 değerlerinde diğer değerlere oranla daha stabil olduğu belirlendi. Bu enzimin de optimum pH'sı göz önüne alındığında alkalın proteaz olabileceği düşünüldü.

*B. pumilus* NK14 ve *T. haemolytica* IY13 izolatlarının her ikisinin enziminin de PMSF ile büyük bir oranda inhibe olduğu, EDTA, EGTA, üre ve SDS ile aktivitesinin düştüğü; Tween 20 ve Tween 80 ile aktivitesinin arttığı belirlendi. PMSF ile inhibe olmaları enzimlerin serin proteaz olduğunu, EDTA ile inhibe olmaları da enzimlerde metal bağlanma bölgelerinin olduğunu düşündürdü. Yine her iki izolatta da Ca, Mg<sup>+2</sup> ve Mn iyonlarının aktiviteyi artırdığı görüldü. Bu nedenle bu iyonların enzimler için kofaktör olabileceği sonucuna varıldı.

İzolatların enzim aktivite tayinlerinin son basamağında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Enzim için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek için substratın değişen konsantrasyon değerlerine karşı aktivite tayinleri yapıldı. Veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten *B. pumilus* NK14 için sırasıyla  $K_m$  0,673 mg/ml ve  $V_{max}$  EU/ml olarak; *T. haemolytica* IY13 için ise  $K_m$  1,262 mg/ml ve  $V_{max}$  da 125 EU/ml olarak bulundu.

Sonuç olarak bu çalışma ile Erzurum ilinde bulunan sıcak su kaynaklarından farklı zamanlarda örnekler alınarak bu örneklerden termofilik bakterilerin izolasyonu ve morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri yanında moleküler düzeyde de tanılaması gerçekleştirildi. Özellikle daha önceden çalışılmamış Nenehatun sıcak su kaynağından ilk kez izolasyon yapılarak mevcut bakteri florası da ilk kez bu çalışma ile tespit edildi. Çalışmada Türkiye için yeni rapor olabilecek izolatlar tanındı. İzolatların proteaz enzim aktiviteleri belirlenerek en iyi aktivite gösteren iki izolatın enzim aktivite tayinleri yapıldı. Bu sayede biyoteknolojik ve endüstriyel açıdan öneme sahip olabilecek organizmalar belirlenerek literatüre kazandırıldı. Ayrıca bu tez çalışmasından daha pek çok çalışmaya kaynak olabilecek verilere ulaşıldı.

Çalışmanın sonuçlarına istinaden çıkarılabilecek öneriler;

\* Çalışmada en iyi proteaz enzim aktivitesi gösteren iki izolat çalışıldı. Biyoteknolojik açıdan önemli olan termofilik proteaz enziminin daha fazla ve farklı organizmalardan elde edilmesi adına diğer izolatlara ait proteaz enzimlerinin de aktiviteleri belirlenebilir.

\* Çalışmada proteaz enziminin aktivite tayini yapılırken saf enzim yerine kültür süpernatantı kullanılmıştır. Bu çalışma temel alınarak proteaz enzimlerinin değişik metotlar kullanılarak saflaştırma işlemleri yapılabilir ve sonuçlar saf enzim üretimi üzerinden değerlendirilebilir.

\* Tanıması yapılmış olan izolatların biyoteknolojik açıdan önemli olan diğer termofilik enzimler açısından da taraması yapıp endüstriyel açıdan önemi belirlenerek literatüre kazandırılabilir.

\* 16S rRNA analizi sonucunda tür seviyesinde tanılanması yapılan izolatlardan daha önceden Türkiye için rapor edilmemiş olan izolatların biyoteknolojik önemleri belirlenerek başka çalışmalara kaynak oluşturulabilir.

## KAYNAKLAR

- Acar, S., 2009. Hasandabal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Açıkalın, H.D. ve Müştak, H.K., 2016. Bakteriyel Taksonomi ve Yeni Türlerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University/Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Vol. 13 Issue 1, p50-57. 8p 13.
- Adiguzel A., I. K., Sahin F., Ozbek T., Gulluce M., Belduz A.O., Baris O., 2011. Molecular Diversity of Thermophilic Bacteria Isolated From Erzurum City Pasinler Hot Spring (Erzurum/Turkey). Turkish Journal of Biology, 35(3): 267-274.
- Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin ,F., Sengul, M., 2006. RAPD and FAME analysis of *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 34(5): 424-432.
- Adiguzel, A., Nadaroglu, H. and Adiguzel, G., 2015. Purification and Characterisation of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and Its Applications in Some Fruit Juices. Journal of Food Science and Technology, DOI 10.1007/s13197-014-1609-y
- Aguilar, A., 1996. Papers presented at the First International Congress on Extremophiles Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations. FEMS Microbiology Reviews, 18(2): 89-92.
- Akhmaloka, A. S., S. Nurbaiti, I. N. Tika and F. M. Warganegara, 2006. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium From Papandayan Crater. Proceeding ITB on Engineering Sciences, 38B:1, 110.
- Akkaya, S.E. ve Kıvanç, M., 2009. Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram Negatif Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri 1.
- Alexander, S.K. and Strete, D., 2001. Microbiology: a photographic atlas for the laboratory. Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Alpan, L. G., 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Alves, M. P., Rainey, F. A., Nobre, M. F., & da Costa, M. S. 2003. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., a new slightly thermophilic  $\gamma$ -proteobacterium isolated from a hot spring in central Portugal. Systematic and applied microbiology, 26(1), 70-75.
- Amin, A., Ahmed, I., Salam, N., Kim, B. Y., Singh, D., Zhi, X. Y. & Li, W. J. (2017). Diversity and Distribution of Thermophilic Bacteria in Hot Springs of Pakistan. Microbial ecology, 1-12.
- Andrade, C.M., Pereira Jr, N. and Antranikian, G., 1999. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. Revista de Microbiologia, 30(4), pp.287-298.
- Antranikian, G., Vorgias, C.E. and Bertoldo, C., 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. In Marine biotechnology I (pp. 219-262). Springer Berlin Heidelberg.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Medisan Yayın Serisi, no:46, Ankara.

- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivüchelvi, M., and Kalaichelvan, P. T., 2007. Purification and Partial Characterization of Serine Protease from Thermostable Alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. World journal of Microbiology Biotechnology, vol. 23, p. 475–481.
- Asad, W., Asif, M. A. R. I. A., and Rasool, S. A. 2011. Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. WA21. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2), 1045-1052.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology, 13(4), pp.202-206.
- Bahçeci, H., 2004. Tuz Gölü Bakteri İzolatlarının Yağ Asidi Metil Ester Analizi ve Hücre Dışı Enzimlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A. and Suharto, A.R., 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. FEMS Microbiology Letters, 200(1), pp.103-109.
- Baltacı, M. Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi,
- Baltacı, O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, A., 2016. Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary. Research an biotechnological enzyme potential, 10.1080/01490451.2015.1137662.
- Başbülbül, G., 2009. Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L. and Aragno, M., 1996. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). Applied and Environmental Microbiology, 62(5), pp.1723-1727.
- Beg, Q. R. and Gupta, R., 2003. Purification and Characterization of an Oxidation-Stable, Thiol- Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. Enzyme and Microbial Technology, vol.32, p. 294-304.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K. and Gupta, R., 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. Process Biochemistry, 37(10), pp.1103-1109.
- Beldüz, A. O., Dülger, S., Demirbağ, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endosporeforming Bacterium. Int J Syst Evol Micr, 53: 1315-1320.
- Bilgehan, H., 2002. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Meta Basım, Fakülteler Kitabevi, Barış yayınları, p.4-10.
- Busse, H. J., Kämpfer, P., Moore, E. R. B., Nuutinen, J., Tsitko, I. V., Denner, E. B. M., & Salkinoja-Salonen, M. S. 2002. *Thermomonas haemolytica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium from kaolin slurry. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52(2), 473-483.
- Carpenter, P.L., 1972. Microbiology. W.B. Saunders Company, Canada, Chapter 4, p. 64-77.
- Castro, G.R., 1999. Enzymatic Activities of Proteases Dissolved in Organic Solvent. Enzyme and Microbial Technology, Vol.25, p. 689-694.

- Castro, H., Abreu, P., Geraldo, R., Martins, R., Santos, R., Loureiro, N., Cabral, L. and Rodrigues, C. 2010. Looking at the Proteases from a Simple Perspective. *Journal of Molecular Recognition*, 24, 165-181.
- Chang, C. S., Joo, H. S., Kumar, C.G., Park, G. C., Paik, S.R., 2003. Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease from *Bacillus clausii* I-52: Production And some Properties. *Journal of Applied Microbiology*, 95:267-272.
- Chen, M.Y., Wu, S.H., Lin, G.H., Lu, C.P., Lin, Y.T., Chang, W.C. and Tsay, S.S., 2004. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), pp.1849-1855.
- Cohn, F., 1875. Untersuchungen Tiber Bacterien. *Beihge zur Biologie der Pflanzm*, vol.1, p. 127-222.
- Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akkoc, N. and Akcelik, M., 2009. Isolations of  $\alpha$ -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*, 78(1), pp.56-66.
- Cordeiro C. A. M., Martins M. L. L., Luciano A. B., 2002. Production and Properties of  $\alpha$ -Amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.33, p.57-61.
- Çetinkaya, Esin. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Gıdalardan İzole Edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* Suşlarının Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Ankara 2011.
- Çevik, S., 2010. Ege Bölgesi Sıcak Su Kaynakları ve Toprak Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Aktinomisetlerin Proteaz Üretimlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova İzmir.
- De Clerck, E. and 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(4), pp.611-617.
- De Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., & Mellado, E. (2013). Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. *Life: Open Access Journal*, 3(1), 38–51.
- De Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J. and Gonzalez Villa, T., 2006. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. *Protein and peptide letters*, 13(7), pp.645-651.
- Demirjian D. C., Varas F. M., and Cassidy C. S., 2001. Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, vol.5, p.144-151.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G. and Wen, T. 2010. Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101, 7100–7106.
- Derekova A., Sjöholm C., Mandeva R., Kambourova M., 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a Novel Thermophilic Bacterium Isolated from Rupi Basin (Bulgaria). *Extremophiles*, vol. 10, p. 1-4.
- Dhamodharan Ramasamy, Ajay Kumar Mishra, Jean-Christophe Lagier, Roshan Padhmanabhan, Morgane Rossi, Erwin Sentausa, Didier Raoult and Pierre-Edouard Fournier A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2014), 64, 384–391
- Doddapaneni, K., Tatineni, R., Vellanki, R., Rachcha, S., Anabrolu, N., Narakuti, V. and Mangamoori, L. 2009. Purification and Characterization of a Solvent and

- Detergent-Stable Novel Protease from *Bacillus cereus*. Microbiological Research, 164, 383-390.
- Dülger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dülger, S., Demirbağ, Z., Beldüz, A.O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol., 54: 1499-1503.
- Dworkin, M.(Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.(Editors), 2006. The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- Elazzazy, A. M., Abdelmoneim, T. S., & Almaghrabi, O. A. 2015. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. Saudi journal of biological sciences, 22(4), 466-475. ISO 690
- El-Gendi, S.M., Helal, S.F. and Nagem, S.A., 2016. Mismatch repair protein expression status in Egyptian colorectal carcinoma: a single-centre study. Egyptian Journal of Pathology, 36(2), pp.185-193.
- Erarslan, A., Denizci, A. A., Kazan, D., Abeln, E. C. A. 2004. Newly Isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an Alkaline Protease Producer Capable to Grow Under Highly Alkaline Comditions. Journal of Applied Microbiology, 96; 320-327.
- Folmsbee, M., Duncan, K., Han, S.O., Nagle, D., Jennings, E. and McInerney, M., 2006. Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacilluslicheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. Systematic and applied microbiology, 29(8), pp.645-649.
- Fritze D., 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. The American Phytopathological Society Publication, vol. 94, p. 11.
- Fujiwara S (2002) Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. Journal of Bioscience and Bioengineering 94, 518-525
- Gençkal, H. and Tari, C. 2006. Alkaline Protease Production from Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from Natural Habitats. Enzyme and Microbial Technology, 39, 703-710.
- Gerze, A. & Kimya-Metalurji Fakültesi (2003). Proteaz enziminin *bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* bakteri türlerinden kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi.
- Gessesse, A., Kaul, R., Gashe, B. and Mattiasson, B. 2003. Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather. Enzyme and Microbial Technology, 32, 519-524.
- Ghafoor, A. and Hasnain, S. 2010. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 Strain Isolated from Ornamental Plant Nursey. Polish Journal of Microbiology, 59(2), 107-112.
- Ghorbel, B., Kamoun, A. and Nasri, M. 2003. Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1. Enzyme and Microbial Technology, 32, 513-518.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M., 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. Enzyme and Microbial Technology, 32(5), pp.513-518.



- Gomes, J., Steiner, W., 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Extremophiles*, 42(4): 223-235.
- Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C., 2002. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environmental microbiology*, 4(11), pp.770-773.
- Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C., 2005. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles*, 9(1), pp.75-79.
- Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., 1993. Roots of Bacterial Systematics. In *Handbook of New Bacterial Systematics*, Ed: M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. Academic Press, London, 3-56.
- Grzonka Z, Kasprzykowski F, Wiczak W (2007). Cysteine proteases, In *Industrial Enzymes*, Springer, Dordrecht.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. 2002b. An Overview on Fermentation, Downstream Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:381-395.
- Gupta, R., Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K. 2001. Characterization and Wash Performance Analysis of An SDS-Stable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17:493-497.
- Güder, S., 2014. *Scytilidium thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
- Gül-Güven, R., Güven, K., Poli, A., Nicolaus, B., 2008. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a Thermophilic Bacterium Isolated from A Hot Spring in Batman. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54: 327-334.
- Gümüşel, F. 2002. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü. Kocaeli Sanayii İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi, 73-135 s.
- Güven, R.G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9, pp.1-10.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N. and Kamoun, A. 2009. Two Detergent Stable Alkaline Serine-Proteases from *Bacillus mojavenensis* A21: Purification, Characterization and Potential Application as a Laundry Detergent Additive. *Bioresource Technology*, 100, 3366-3373.
- Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S. (2001). Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from mesophilic and thermostable enzymes and site-directed mutagenesis. *FEMS microbiology letters*, 195(1), 67-72.
- Haki G. D., Rakshit S. K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes a Review. *Bioresource Technology*, vol. 89, p. 17-34.
- Haki, G. D. R., A.K. , *Bioresource Technology*, 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes. a review: 17-34.
- Hameed, A., Shahina, M., Lin, S. Y., Liu, Y. C., & Young, C. C. 2014. *Pseudomonas hussainii* sp. nov., isolated from droppings of a seashore bird, and emended descriptions of *Pseudomonas pohangensis*, *Pseudomonas benzenivorans* and *Pseudomonas segetis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(7), 2330-2337.
- Hameş-Kocabaş, E.E. and Uzel, A., 2007. Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments. *Annals of microbiology*, 57(1), pp.71-75.

- Hammami, A., Hamdi, M., Abdelhedi, O., Jridi, M., Nasri, M., & Bayouhd, A. 2017. Surfactant-and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. *International journal of biological macromolecules*, 96, 272-281.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 3578-3583.
- Haque, Anwarul & J Russell, Nicholas. (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *International journal of food microbiology*. 98. 23-34. 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.025.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology* 4th Edition. The McGraw-Hill Companies: New York.
- Hasanekoğlu, İ. ve Yeşilyurt, S., 2002. *Mikrobiyoloji*, Erzurum.
- Hawumba J. F., Theron J., Brožze V. S., 2002. Thermophilic Protease Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. *Current Microbiology*, vol.45, p. 144-150.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, s 532-562.
- Hough, D. W. and M. J. Danson, 1999. Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol*, 3(1): 39-46.
- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. and Zhang, Y. 2003. Purification And Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease With Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 46, 169-173.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003-1.
- Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., & Iqbal, H. M. 2017. Alkaline Protease Production Using Response Surface Methodology, Characterization and Industrial Exploitation of Alkaline Protease of *Bacillus subtilis* sp. *Catalysis Letters*, 147(5), 1204-1213.
- Iino, T., Mori, K., Uchino, Y., Nakagawa, T., Harayama, S., & Suzuki, K. I. 2010. *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1376-1382. ISO 690.
- Imhoff J.F. 2003. Phylogenetic Taxonomy of The Family Chlorobiaceae on The Basis of 16S rRNA and Fmo (Fenna-Matthews-Olson Protein) Gene Sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol.53, p. 941-51.
- İnce, E., 2006. Isolations of extreme thermophilic anaerobic bacteria produce xylanase and determination of their enzymes properties.
- Jain, D., Pancha, I., Mishra, S.K., Shrivastav, A. and Mishra, S., 2012. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. *Bioresource technology*, 115, pp.228-236.
- Jaswal RK, and Kocher GS (2007). Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility. *The Internet J. Microbiol.*, Vol. 4, No. 1.

- Jayakumar, R., Jayashree, S., Annapurna, B., & Seshadri, S. 2012. Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and its applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(7), 1849-1866.
- Johnson, J.L., 1985. 1 Determination of DNA Base Composition. *Methods in microbiology*, 18, pp.1-31.
- Joo, H. and Chang, C. 2005. Oxidant and SDS-stable Alkaline Protease from a Halotolerant *Bacillus clausii* I-52: Enhanced Production And Simple Purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497.
- Kalın, R., 2012. Peroksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi Tekniği İle Karaturp (*Raphanus sativus* L.) Ve Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Karbalaei-Heidari, H.R., Shahbazi, M. and Absalan, G., 2013. Characterization of a novel organic solvent tolerant protease from a moderately halophilic bacterium and its behavior in ionic liquids. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(3), pp.573-586.
- Kazan D., Denizci A. A., Kerimak M. N., ve Eraslan A., 2005. Purification and Characterization of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42 J. *Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 32, p. 335–344.
- Keha, E., Küvrevioğlu. Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayımları*, 97-125, Erzurum.
- Kıran E. Ö., Çömlekçioğlu U., Dostbil N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1).
- Kıvanç, A. V., 2008. Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram (+) Basillerin İzolasyonu ve İdentifikasyon Yöntemleri. 02: 61-70.
- Kim, S., Kim, Y. and Rhee, I. 2001. Purification And Characterization of A Novel Extracellular Protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Archives of Microbiology*, 175, 458–461.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., 1990. *Methods in Phytopathology*. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Kristjansson, J.K. (1991). *Thermophilic Bacteria*. Taylor & Francis
- Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1992. *Thermophilic Bacteria*. In: Kristjansson, JK (ed). *Thermophilic Bacteria*. London, CRC Press, Inc., Boca Raton. pp 1-18.
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial Alkaline Proteases: From A Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnol Advances* 17: 561-594.
- Kumar, M., Yadav, A. N., Tiwari, R., Prasanna, R. & Saxena, A. K. 2014. Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. *Annals of microbiology*, 64(2), 741-751.
- Kumar, S. and Nussinov, R. 2001. How Do Thermophilic Proteins Deal With Heat? *Cell Mol Life Sci*, 58(9): 1216-1233.
- Lee, E. M., Jeon, C. O., Choi, I., Chang, K. S., & Kim, C. J. 2005. *Silanimonas lenta* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic and alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 385-389.
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. *Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blacwell Scientific Publications. p216.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc*, 57, 685 1934.

- López, Ana & Alippi, Adriana. (2007). Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. *International journal of food microbiology*. 117. 175-84. 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.007.
- López-García, P. 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life? *Journal of Molecular Evolution*, 49(4), 439-452. doi:10.1007/PL00006567
- Macy, J. M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Sly, L. I. 1993. *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(1), 135-142.
- Madigan, M.T. and Martinco, J.M. and Parker, J., 2008. Prokaryotic Diversity The Archaea. *Brock Biology of Microorganisms*, 546-571.
- Madigan, M.T. and Martinco, J.M. and Parker, J., 2017. *Brock Biology of Microorganisms*,
- Mahajan, R. and Badgular, S. 2010. Biological Aspects Of Proteolytic Enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048-2068.
- Malle, D., Pıcarıma, J., Huwae, L.C., Rahmawati, I. and Purbowasıto, W., 2012. Isolation and Identification of a Thermostable Amylase-Producing Bacterium from Hatuasa Hotspring. *Microbiology Indonesia*, 6(2), p.5.
- Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., & Nair, S. S. 2017. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Marathe, S.K., Vashistht, M.A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S. and Nair, S.S., 2017. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Matpan, F., 2007. Diyadin (Ağrı) Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu ve Bazı Enzimleri Üzerinde Çalışmalar. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 2007.
- Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N., & Fuchs, G. 2002. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives of microbiology*, 178(1), 26-35.
- Miquel, P., 1888. Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C. *Ann Micrographic*, 1, 3.
- Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Erzurum.
- Müller, Jonas & Litsanov, Boris & Bortfeld-Miller, Miriam & Trachsel, Christian & Grossmann, Jonas & Brautaset, Trygve & A Vorholt, Julia. (2014). Proteomic analysis of the thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus* MGA3. *Proteomics*. 14. . 10.1002/pmic.201300515.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. and Arshad, M., 2009. *Rhizobacteria* containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(11), pp.1302-1309.
- Narwal, R. K., Bhushan, B., Pal, A., Panwar, A., & Malhotra, S. 2016. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation

- thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. LWT-Food Science and Technology, 65, 652-660.
- Nascimento W. C., Martins M. L. L., 2003. Production and Properties of an Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, vol.35, p.91-96.
- Nasri, M., Selami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. 2006. Stability of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in Commercial Solid Laundry Detergent Formulations. Microbiological Research.
- Nazina, T.N., Lebedeva, E.V., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Grigoryan, A.A., Sokolova, D.Sh., Lysenko, A.M and Osipov, G.A., 2004. *Geobacillus gargensis* sp. nov., A Novel Thermophile From A Hot Spring, And The Reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* Comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54 (6), 2019-2024.
- Nguimbi, E. and Li, Y. and Gao, B. and Li, Z. and Wang, B. and Wu, Z. and Yan, B. and Qu, Y. and Gao, P., 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic Myxobacteria ve Differentiation of Closely Related Strain. System. Appl. Microbiology, 26, 262- 268.
- Nicolaus, B., Improta, R., Manca, M.C., Lama, L., Esposito, E. and Gambacorta, A., 1998. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. Polar Biology, 19(2), pp.133-141.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K. and Sarnaik, S.S., 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. Bioresource technology, 98(6), pp.1238-1245.
- Ningthoujam, D.S. and Kshetri, P., 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus Subtilis* strain SH1. Aus J Basic and Appl Sci, 4, pp.5126-5134.
- Oberoi, R., Beg, Q., Puri, S., Saxena, R. and Gupta, R. 2001. Characterization And Wash Performance Analysis Of An SDS-Stable Alkaline Protease From A *Bacillus* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 493-497.
- Orhan, E., 2003. *Bacillus Subtilis* Ve *Bacillus Cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Önal, S., 2010. Enzimler, Bölüm 8. Moleküler biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.
- Özdemir S., 2004. Musa textilis Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermantasyon Tekniği ile (SSF) *Bacillus* sp'de  $\alpha$ - Amilaz Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi, D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özşahin A.D., 2006. Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus* sp. Suşlarından Elde Edilen Selülaz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Pan J, Huang Q, Zhang Y. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. Current microbiology. 2004;49(3):165-9. Accessed April 11, 2012.

- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Prasuna, R. G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science, 9(1), 50-55.ISO 690
- Pantazaki, A., Pritsa, A. and Kyriakidis, D., 2002. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. Applied microbiology and biotechnology, 58(1), pp.1-12.
- Park, C.H., Lee, S.J., Lee, S.G., Lee, W.S. and Byun, S.M., 2004. Hetero- and autoprocessing of the extracellular metalloprotease (Mpr) in *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 186(19), pp.6457-6464.
- Peak, K. K., Duncan, K. E., Luna, V. A., King, D. S., McCarthy, P. J., & Cannons, A. C. 2011. *Bacillus* strains most closely related to *Bacillus nealsonii* are not effectively circumscribed within the taxonomic species definition. International journal of microbiology, 2011.
- Pettersson, B., De Silva, S. K., Uhlén, M., & Priest, F. G. 2000. *Bacillus siralis* sp. nov., a novel species from silage with a higher order structural attribute in the 16S rRNA genes. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 50(6), 2181-2187.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B. and Tang, J., 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. Critical reviews in microbiology, 33(3), pp.183-209.
- Pirinçioğlu, H., 2010. Dargeçit ve Güçlükonak Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Podosokorskaya, O. A., Kadnikov, V. V., Gavrillov, S. N., Mardanov, A. V., Merkel, A. Y., Karnachuk, O. V., & Kublanov, I. V., 2013. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum Ignavibacteriae. *Environmental microbiology*, 15(6), 1759-1771.
- Poli A., Esposito E., Lama L., Orlando P., Nicolaus G., Appolonia F. D., Gambacorta A., Nicolausa B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a Thermophilic Amylase Producing Bacterium Isolated from Mount Rittmann (Antarctica). Systematic and Applied Microbiology, vol.29, p. 300-307.
- Rai, S.K. and Mukherjee, A.K., 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwi-prase) from *Bacillus subtilis* DM- 04. Biochemical Engineering Journal, 48(2), pp.173-180.
- Ramagoma, F., 2006. Development of a Lipase Gene Based Expression and Secretion System for the Protein Over-Production in *Bacillus licheniformis*. Master Thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State Bloemfontein, Republic of South Africa.
- Ramakrishna, D.P.N., Gopi Reddy, N. and Rajagopal, S.V. 2010. Purification and properties of an extracellular alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* MTTC- 10110. Intl. J. Biotechnol. Biochem., 6(4): 493-504.
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R.S., 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. Process Biochemistry, 44(3), pp.262-268.
- Rao, K. and Narasu, M. 2007. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. African Journal of Biotechnology, 6 (21), 2493-2496.

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635.
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R. 2009. Characterization of Thermo- and Detergent Stable Serine Protease From Isolated *Bacillus circulans* and Evaluation of Eco-Friendly Applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Raval, V.H., Pillai, S., Rawal, C.M. and Singh, S.P., 2014. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, 49(6), pp.955-962.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. and Barrett, A.J., 2007. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_1), pp.D320-D325.
- Reddy, L. Wee, Y. and Ryu, H. 2008. Purification and Characterization of An Organic Solvent and Detergent-Tolerant Novel Protease Produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1526-1533.
- Rodriguez Couto, S., Rodríguez, A., Paterson, R.R.M., Lima, N. and Teixeira, J.A., 2006. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Letters in applied microbiology*, 42(6), pp.612-616.
- Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Rudi, K., Zimonja, M., Trosvik, P. & Naes, T. (2007). Use of multivariate statistics for 16S rRNA gene analysis of microbial communities. *International journal of food microbiology*, 120(1), 95-99.
- Ryu, H-W., Reddy, L.V.A., Wee, Y.-J. 2008. Purification and Characterization of An Organic Solvent And Detergent-Tolerant Novel Protease Produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Saha, P., Krishnamurthi, S., Mayilraj, S., Prasad, G. S., Bora, T. C., & Chakrabarti, T. 2005. *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1491-1495.
- Sarı, B., 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin *Geobacillus galactosidasius* BS61 Bakterisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Sarı, E., 2011. *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Sarkar, D., & Paul, G. (2016). Extraction and Bio-chemical Characterization of Protease Enzyme from a Proteolytic bacteria Isolated from Dry Mixed Kitchen Waste. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(3), 268-276.
- Sarkar, D., & Paul, G. 2016. Extraction and Bio-chemical Characterization of Protease Enzyme from a Proteolytic bacteria Isolated from Dry Mixed Kitchen Waste. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(3), 268-276.
- Sarnaik, S.S., Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K. 2006. Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98: 1238-1245.
- Savas, Sumeyra & Adiguzel, Ahmet & Inan Bektas, Kadriye & Ozkan, Hakan & Gulluce, Medine & Sahin, Fikretin. 2009. Molecular characterization of

- thermophilic bacteria isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal Hot Spring. Roumanian Biotechnological Letters. 14. 4445-4454.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. and Engel, P.C., 1998. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 80(11), pp.933-941.
- Seiler, H., Wenning, M., Schmidt, V., & Scherer, S. 2013. *Bacillus gottheilii* sp. nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(3), 867-872.
- Sharmin, F. and Rahman, M. 2007. Isolation and Characterization of Protease Producing *Bacillus* strain FS-1. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 9, 1-10.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2001. Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem*, 36:781-785.
- Smith, N.C., Hennessy, J., Stead, D.E., 2001. Repetitive Sequence-Derived PCR Profiling Using the BOX A1R Primer for Rapid Identification of The Plant Pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 739-748.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S.T.C., 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*, vol. 20, p. 142-151.
- Spink, C.H., Chaires, J.B., 1999. Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA. *Biochemistry*, 38, 496-508.
- Stead, D. E., Hennessy, J., Wilson, J., 1998. Modern Methods for Identifying Bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 17-25.
- Sterner, R. and Liebl, W. 2001. Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(1): 39-106.
- Studdert, C.A., Herrera Seitz, M.K., Plasencia Gil, M.I., Sanchez, J.J. and de Castro, R.E., 2001. Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease. *Journal of basic microbiology*, 41(6), pp.375-383.
- Şahin, F., 2003. Moleküler tanı yöntemleri (Eds: Telefoncu A., Küfrevioğlu Ö. İ. Pazarlıoğlu, N., Biyoinformatik I). 22-28 Haziran, Lisansüstü Yaz Okulu, s237.
- Takenaka, S., Yoshinami, J., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P. and Yoshida, K. I. 2017. Characterization and mutation analysis of a halotolerant serine protease from a new isolate of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 1-8.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu. M. Ve Oğultekin. R., 3-4 Sınıf Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 81-90 (1989).
- Tanner, J.J., Hecht, R.M. and Krause, K.L., 1996. Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å resolution. *Biochemistry*, 35(8), pp.2597-2609.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum İlica Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Erzurum.



- Tari, C., Gençkal, H., Tokatlı, F., 2006. Optimization of a Growth Medium Using a Statistical Approach for the Production of an Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus* sp. L21 Process Biochemistry, vol.41, p. 659-665.
- Tekin, N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* Sp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi. Ankara.
- Tekincanli, M., Akatin, M. & Colak, A. (2015). Purification and characterization of a novel thermostable esterase from *Thermus* sp. NCCB 100425T /*Thermus* sp.NCCB 100425T'den yeni bir ısıya dayanıklı esterazın saflaştırılması ve karakterizasyonu. Turkish Journal of Biochemistry, 40(2), pp. 116-124.
- Thumar, J.T. and Singh, S.P., 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. Brazilian journal of Microbiology, 38(4), pp.766-772.
- Tolner, B., Poolman, B., and Konings, W.N., 1997. Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems To High Temperatures. Comp. Biochem. Physiol, 118A/3, 423-428.
- Topal, S, Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. Turk J Biol. vol., 24, p. 79-93.
- Trüper, H. G., 2005. International Perspectives on Taxonomy from the Past to the Future, vol. 71, p. 273.
- Turner, P., Mamo, G., and Karlsson, E. N., 2007. Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable Enzymes in Biorefining. Microbial Cell Factories, vol.6:9
- Türker C., Özcan, B.D., 2015. Alfa-amilaz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(6): 387-393.
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yılmaz, E. 2011. Optimal Conditions For Production Of Extracellular Protease From Newly Isolated *Bacillus cereus* Strain CA15. EurAsian Journal of BioSciences, 5, 1-9.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Vaz-Moreira, I., Figueira, V., Lopes, A. R., Lobo-da-Cunha, A., Spröer, C., Schumann, P., & Manaia, C. M. 2012. *Bacillus purgationiresistans* sp. nov., isolated from a drinking-water treatment plant. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62(1), 71-77.
- Venugopal, M. and Saramma, A. 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, Newly Isolated From A Mangrove Station: Characterization And Application In Laundry Detergent Formulations. Indian Journal of Microbiology, 47, 298-303.
- Vijayaraghavan, P., Lazarus, S. and Vincent, S.G.P., 2014. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. Saudi journal of biological sciences, 21(1), pp.27-34.
- Wang, SL1, L. Y., Liang, TW, Chio, SH, Ming, LJ, Wu, PC., 2009. Purification and Characterization Of Extracellular Lipases From *Pseudomonas monteilii* TKU009 By The Use Of Soybeans As The Substrate.
- Whitford, D., 2005, Protein structure and function, 212 p.

- Williams, R.A., Smith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J., 1996. *Thermus oshimai* sp. nov., Isolated From Hot Springs in Portugal, Iceland and The Azores, and Comment on The Concept of a Limited Geographical Distribution of *Thermus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(2), 403-408.
- Wiseman, A., 1987. The Application of Enzymes in Industry. *Handbook of Enzym Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. p. 274-373.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal For The Domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579.
- Xu, D. and Côte, J.C., 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rRNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), pp.695-704.
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y. and Wang, S. 2000. Production and Purification Of Protease From A *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 406-413.
- Yanmis, D., Adiguzel, A., 2014. Molecular Typing Of Thermophilic *Bacilli* Isolated From Different Hot Springs of Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 9: 83-88.
- Yılmaz, F., 2002. *Bacillus* Türleri. Bitirme Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Rize.
- Yılmaz, B., Baltacı, M. O., Sisecioglu, M., & Adiguzel, A. 2016. Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1241-1247.
- Zahoor, S., Javed, H.M. and Babar, M.E., 2016. Characterization of a novel hydrolytic enzyme producing Thermophilic bacterium isolated from the hot spring of Azad Kashmir-Pakistan. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- Zeigler, D.R., 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), pp.1893-1900.
- Zhang, Y., Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. 2003. Purification And Characterization Of An Extracellular Alkaline Serine Protease With Dehairing Function From *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, Vol 46, pp.169-173.
- Zvidzai, C. J., Zvauya, R., 2000. Purification of a Protease From an Alkalophilic *Bacillus subtilis* Isolated From a Zimbabwean Hot Spring. *Journal of Food Biochemistry*. vol 25, p. 1-13.

## ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir'de tamamladı. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2015 yılında derece ile mezun oldu. Eylül 2015'de, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2016 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne yatay geçiş yaptı.

Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde 2016 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

## EKLER

### EK.1. 16S rRNA Sekans Analizi Sonucunda Oluşturulan Diziler

>*Bacillus circulans* strain EGK1 Ac.Num. MG016499

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATCCTTTTTCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTG  
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGAGAGTGGAAT  
GAACGGTTTTCCGATTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACA  
AGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTAGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGA  
GTGCAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACCTGA  
CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTA  
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT  
AGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  
AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC  
TCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACA  
GGTGATGCATGCTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGGCGCAACCCTTGATCTTTAGTTGCCAGCCAATTCAGTTG  
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GATGGTACAAAGGGCAGCAAAGCCGCGAGGTGAGCAAATCCATAAAA  
CCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAA  
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT

GGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGG  
TG

>*Bacillus firmus* strain EGK2 Ac.Num. MG016500

TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGT  
CGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTG  
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC  
CGGGGCTAATACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAA  
GATGGTTTCGGCTATCACTTGCAGATGGGCCC GCGGCGCATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGAGTGAATGGAAGGTTTCCGGATTCGTAAA ACTTCTGTTGTAA  
GGGAAGAACCAAGTAACTGGAGTAACTGCCCGTAACTTGATCGGTAC  
CTAACCGAAAGGCCACGGCCTAACTACGTGCCAGGCAGCCGCCGTAA  
TACGTAGGTGGGCAAAGCGTTGTCCGGAAATTATTGGGCGTAAAGCGCG  
CGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGG  
GAGGGTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGA  
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG  
GCCAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACCGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATT  
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT  
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACAACCTAGGAGAT  
AGGGCGTTCCCTTCGGGGGACAGGATGACAGGTGGTGGCATGATCGTC  
GTCAGCTCGTGTCATTGAGATGCTGGGTTAAGTCCCGCCAACGAGCGCGC  
CAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC  
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCT  
GCGAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCATAAAACCAATTCTCAGTTCGGA  
TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGG  
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

CACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGK3 Ac. Num. MG016501

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGACGTG AATGGAAGGTTTTTCGGATCCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT ACCGGAGTAAC TGCCGTAACCTTGAACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG GCTAACTACGTGCCAGCAGGCCGCGGTAATAACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGAATTATTGGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGTTCCCTTAAGTCTG ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAATTTCCACGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCC GCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGG TGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCT TGACATCTCCTGACAACCCTAAGAGAATAGGGCGTTCCTTCGGGGGAC AGAATGACAGGTGCTGCATGCTGGTCGTCAGCTCGTGTCCTGAGATGTTG GGATTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTGAATCTTTAGATTGCCAGC ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT GCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCGAAT CCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG AAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC

CGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG  
ATGATTGGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGK4 Ac. Num. MG016502

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATCCTTTTCCTCTCATGGGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTG  
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATTG  
AAAGGGTTTCGGATCGTAAACTCCGGTGGTACGGGAAGAACAAGTACA  
AGAGTAACTGCCTGTACCTTGACCGTACCTAAACAGAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG  
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTAAAGTCTGATGTGA  
AAGCCACGGCTCAACCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGA  
GTGCAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTGA  
CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTA  
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT  
AGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  
AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGGAACCCTTACCAGGTCTTGACA  
TCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGGTCCCCTTCGGGGGACAGAGTTG  
ACAGGTGGTGCATGATTGGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGATA  
AGTTCCCGCAACGAGCGCGAACCCTTGATTCTTTTACTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGATGGTACAAAGGGCAGCAATACCGCGAGGTGAGCAAATCCCAT  
AAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCT  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG

TCGGTGGGGTAACTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATT  
GGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGK5 Ac. Num. MG016503

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCAGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATCCTTTTTCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTG  
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGACAGAACAAGTACAAG  
AGTAACTGCTTGTACCTTGACGATACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT  
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATTGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGC  
AGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAAGAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAC TGACGC  
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGT  
GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG  
CTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG  
TGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCC  
TCTGACACTCCTAGAGAATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGGACAGAGTGG  
ACAGGTGATGCATGGCTTGTCGTCAGCTCGTGTCCGTGAGAATGTCGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAAGCGCCAACCCCTGTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAACCGCGAGGTCGAGCAAATCCCA  
TAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGC  
TGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG



TCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATT  
GGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGK6 Ac. Num. MG016504

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATCCTTTTCCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTG  
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTTGATT  
GAACGGTTTTTCGGATTTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACA  
AGAGTAACTGCTTGTACCTTGACCGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GAATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTG  
AGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACTG  
ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT  
TAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC  
AAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGGTGG  
AGCATGTGGTTTTAATTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
CATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGT  
GACAGGTGGTGCATGATTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGGTTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTGATTCTTAGCTTGCCAGCATTAG  
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAACCGCGAGGTGAGCAAATCCCATA  
AAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTG  
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT

CGGTGGGGTAACTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATT  
GGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGK7 Ac. Num. MG016505

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACA  
GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
ACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGG  
CTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTT  
GATGAAGGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGGTTAGAGAAGAACAAGT  
ACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACG  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG  
TCCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGGTTCCTTAAGTCTG  
ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA  
CTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGC  
CCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGC  
CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTTACCAGGTCTTGA  
CATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGAT  
GACAGGTGATGCATGATTGTCGGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGGTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAATCTTTAGTTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCAT  
AAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG

TCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATT  
GGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGK8 Ac. Num. MG016506

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACA  
GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
ACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTAAAAGATGGTTTCGG  
CTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGG  
ATTGAAGGTTTCCGGATTCGTAAAACCTCTGTGGTTAGGGAAGAACAAGTA  
CCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  
CCGGGAATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGGTTCATTAAGTCTG  
ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA  
ACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG  
CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGT  
AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG  
CCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG  
GAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
ACATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGG  
ATGACAGGTGGTTGCATGATTGTCGTCAGCTCGTGTCATGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTCTTAGCTTGCGCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCA  
TAAAACCATTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC  
CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG

TCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATT  
GGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGK9 Ac. Num. MG016507

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATCCTTTTCCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTG  
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCTGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTCGACT  
GAACGGTTTTCCGGATTCGTAAACTCTGGTGTTAGGGAAGAACAAGTAC  
AAGAGTAAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGGAATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGGTCCTTTAAGTCTGAT  
GTGAAAGCACCACGGCCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGA  
CTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGC  
CCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGC  
CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG  
GAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
CATCCTCTGACACTCCTAGAGAATAGAACGTTCCCCTTCGGGGGACAGAG  
TGAAAGGTGGTGCATGGTGGTCGTTTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCCAACCCCTTGAATCCTTAGTTGCCAGCATT  
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAAACCGCGAGGTTCGAGCAAATCCC  
ATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG  
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC  
GGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAA

GTCGGTGTGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGAT  
TGGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGK10 Ac. Num. MG016508

GACGAACGCTGCCCCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACT  
TTAAAAGCTTGCTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  
GCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATAC  
CGGATAATCCTTTTTCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCT  
GTCGCTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG  
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT  
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAA  
GAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTTGAGTG  
CAGAAGAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
GTCGAGGGAACACCAGTGGCCGAAGGCGACTCTTTTGGTCTGTAACCTGAC  
GATGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGGATTTAGATACCCCTGG  
TAGTCCACGCCGGTAAAACGATGAGTGCCTAAAGTGTTAGAGCGTTTTCC  
CGCTCCTTTTAAGTGCTGCACCAAACGCATTTAAAGCACCTCCGCCTGGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGGCTGAAACTCAAAGGAGATTGATCGGGGGGCC  
CGCCACAAGCGGTGGAGCATTGTGGTTTTAATTCGAAGCCAGCGCCGAA  
GAACCTTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGT  
TCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT  
AGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC  
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAAACCGCGAGG  
TCGAGCAAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT  
CGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT

TTGTAACACCCGAAGTCGGTGTGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAG  
GTGGGATAGATGATTGGGGTG

>*Pseudomonas hussainii* strain EGK11 Ac. Num. MG016509

CACCCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCGAAGGTT  
AGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG  
ATAGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCACGGCTTGGCAACCCTCTGTAC  
CTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT  
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTG  
CCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAAGGGGTTGGCGCTCCGTT  
AACCGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGC  
AGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTC  
TCAGCATGTCAAGGCCAGGTTAAGGTCCTTCGCGTTGCTTCGAAATAAAC  
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAA  
ACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCC  
ACTAAGCTCTCAAGGAGCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGG  
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTG  
TCAGTATCAGTCCAGGTAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCATATC  
TACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACTACCCTTACCGTACTCT  
AGCCACGCAGTTTTGGAGGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTCACC  
TTCAACTTACGCAACCACCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAT  
TAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCC  
GTGCTTATTCTGTTGGTAAACGTCAAAACAGTAAGGTATTAACTTACTGCC  
CTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCCACAAC  
ACGCGCCATGGACTTGAATCAGGCTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCC  
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACT  
GATCATCCTCTCAGACCAGTTAACGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACC  
CCACCAACTAGCTAGTCGTACCTAGGCTCATCTAATAGCGTGAGGTCCGA  
AGATCCCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTC  
CAACTGTTGTCCCCCACTACTAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGT  
CCGCCGCTAAATCCAAGAGCAAGCTCTCTTCATCCGCTCGACTTGCATGT  
GTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT

>*Silanimonas lenta* strain EGK12 Ac. Num. MG016510

AGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAG  
CGCGGGGGCAACCCTGGCGGCAGCGGCGGACGGGTGAGGAATTCGTCC  
GAATCTGCCTTTTTGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCG  
CATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCACGCAGAAA  
GATGAGCCGACGACCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAG  
GCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA  
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTT  
CCCGGGTTGGTAAAGGCACTTTTGTCCCGAAAGAAATCCCTGAAGCTAAT  
ACATTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT  
GCCAGCAGCCGCCGGTAATACGAAGGGGTGCAAAGCGTTACTCGGAAAT  
TACTGGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTCGTAAAGTCTGATGTGAAAT  
CCCCGGGCTAACCTGGGACGTGCATTGGAAACTGGCGATCTAGAGTAC  
GGTAGAGGGTGGTGGAAATCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATC  
GGGAGGAACACTCGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCAGTACTGACGCT  
GAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGCTCATTTCCGGAGCTCAGTA  
TCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACCGGTCGCAAGA  
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGGAGTATG  
TGGGTTTAATTTTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCCTGGCCTTGACATC  
CACGGAACTTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTTGAGAAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGATGAGAAATGGTGGGTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTTGCCAGACACTCTCGAG  
TTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGCGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTION  
AATGGTGGGGACAGAGGGCTGCGATCCGGCGACGGTGAGCCAATCCCAG  
AAACCCCATCCCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAG  
CAGGTAGCTTAACCGCAAGGGGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGAC  
TGGGGTG

>*Bacillus soralis* strain EGK13 Ac. Num. MG016511

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCTTGC  
ACAAGAAAGCTTGCTTTCTTGTTGCTTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA  
CGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAATGCTTTTGAACACATGTTTCGAAAGCGGAAAGATGGTTT  
CGGCTATCACTTATAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA  
TCCGGAAGTTAACTTGTTTCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGGAAGCCA  
AGCCTAACTACCGTGCCAGGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAAGC  
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGGTTCTTTAAGT  
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG  
GGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTTTGGTC  
TGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT  
CCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTTTAATTTTCAAGCAACGCGAAGAACCTTTACCAGGT  
CTTTGACATCCTCTGCCACCCCTAGAGATAGGGCGTTCCCTTCGGGGGA  
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGATTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAATGG  
TGGATTAAGTTCCCGCAACGAGCGCCAACCCTTTTGAATTCTTAGTGGCC  
AGCATT CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA  
CGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCG  
AATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC  
ATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA  
CGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAC  
ACCCGAAGTCGGTGAGGTA ACTGGTGGTTTCACTGAGTATCTGATAAAAAG  
TAGTCGGAAATTCAGTGAAACCACTAGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGAC  
AGATGATTGGGGTG



>*Thermomonas hydrothermalis* strain EGK14 Ac. Num. MG016512

CACCCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCTTGCGGTT  
AAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC  
TAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGA  
GATGGGGTTTCTGGGATTGGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCCCTCTGTC  
CCCACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACT  
TGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGCTTGTCGCCGGCGGTCTCCTTAGAGT  
TCCCACCATCACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCC  
GGAGAACTTATATCCCCAAACAATTCTCACCGACACCGAGCTGACGACA  
GCCATGCAGGCACCTGTGTTACGGTGCCCCGAAGGCACTCCCCACATCTC  
TGCAGGATTTCCGTGCATGTCAAGACCAGGTAAAGGTTCTGCGCGTTGCA  
TCGAAATTAAACCCACATACTCCACCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAAT  
TCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTAAC  
GCGTTAGCTTCGAGACTGAGCGCCAAAGTGCACCCAACCTCCAGTTCGCA  
TCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACG  
CTTTCGTGCCTCAGTGTGCTGGTCCAGGGTGTGCGCCTTCGCCACTG  
GTGTTCCCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCGGGAATTCCACAC  
CCCTCTACCGCACTCGAGTCCGCCAGTTTCCAATGCCATTCCCAGGTTGA  
GCCCAGGGCTTTCACATCAGACTTAACAAACCACCTACGCACGCTTTACG  
CCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGCCACCCTTTCGTATTACCGCGGCTGC  
TGGCACGAAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCAGAACCACC  
CGAGGTATTAGCCCGATGCTTTTCTTCCAGGACAAAAGAGCCTTTACAAC  
CCGAGGGCCTTCCCTTCCACTCCAACGCGGCAATGACCTGGAGTCCACGGA  
GGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT  
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAT  
CGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCAAGTCCCGGCTTTCCCCGAAG  
GGCGCATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGACTGG  
GCAGATTCCCATGTATTCTCACCCGTCCGCCACTCGCCACCCATGGAGC  
AAGCTCCACTGTGCTGCCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCCTGCCGCCAG  
CGTTCACT

>*Bacillus pumilus* strain EGK15 Ac. Num. MG016513

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACA  
GAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAAT  
ACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGG  
CTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT  
GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA  
AATTGAAATGGTTTTTCGGATTCGTAAAGCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAA  
GTGCGAGAGTA ACTGGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA  
CGGCCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGGCGGTTTCTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA  
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG  
TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCC  
GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  
GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
GGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGT  
CTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAG  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG  
GCTAAGTCCCGCAACGAGACGCAACCCTTGGTATTCTTAAGTTGTCCAGC  
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT  
GCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAAT  
CCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTG  
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACC  
CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCA  
GATGATTGGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGY1 Ac. Num. MG016514

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAG  
ATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG  
GGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA  
CCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGGC  
TATCACTTACAGATGGGCCC GCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG  
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTCTATCGGGAGGCACCAGTAGG  
GAATCTTCCCCAAAGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGCGAGTG  
ATGAAAGTTTTTCGGATCGTAAA ACTCTGGTGTTAGGAAAGAACAAGTAC  
CGGAGTAATCTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGAGAAGGCCACG  
GCTAACTACGGTACCAGCAGCGCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG  
TCCGGAATTATTGGAGCGTAAAGCGCGCGGCCAGGCGGTTCTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGAGAGGGTTCATTGGAAACTGGGA  
ACCTGAGTGCAAAAGAGAAGGATGGGAATTCCACGGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTTGGCGATGGCGACTCTTGGTCT  
GTA ACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAATCAGATTAGATAACC  
TGGTAGTCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCC  
TATAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCC  
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA  
TCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGATGA  
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGC  
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT  
CAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAT  
GGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCATAAAACCA  
TTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGCAATCG  
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGG  
GGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGY2 Ac. Num. MG016515

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACA  
GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
ACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGG  
CTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGACAGTAGG  
GAATCTTCCGCAATGGACGACAGTCTGCACGGAGCAACCCCGCGTGAGT  
GATGAAAGTCTTCGGATCGTAAAACACTACTGTTGTTAGAGAGAGAACAAG  
TACCGGAATAACCGCCGGTACCTTGAGCGGTACATAACCAGAAAGCCAC  
GGCTATACTACGTGCCAGCAGCCGTGGTAATACCTAGGTGCCAAGCGTTG  
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCAGGCGGTTCCCTAAGTTCTG  
ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA  
CTTGAGTGCAGAAGAGGAAGAGTGGAATTCCACGGTGTAGCGGGTGAA  
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTC  
TGTA ACTGACGCTGAGGCCGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAGAGGG  
TTTCCGCCCTTTAGTTGCTGCAGCAAACCGCATTAAAGCACCTCCCGCCTG  
GGGAGTACGGCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGC  
ACAAGCGGTGAAGCATTGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTC  
ACACAGGTCTTGACATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTT  
CGGGGGACAGGATAACAGGTGGTGCTATGGTTGTCGTCACCTCGTGTCGT  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATACTTAGTTG  
ACAGCATAACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAACCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
ACACGTCCATATCAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTT  
AAGCGAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCG  
CCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTCGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
GTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGG  
TGGGACAGATGATTGGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGY3 Ac. Num. MG016516

CACCCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTT  
ACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAG  
AATGGTTTTATGGGATTCGCTTAACCTCGCGGTCTCGCAACCCTTTGTACC  
ATCCATAGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG  
ACGTGCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGT  
GCCACAACCTGAATGCTGGCAAATAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTTAACCACAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA  
CCTGTCATCCTGTCCCCGAAGGGGAACGCCCTATCTATAGGGTTGTCAC  
GAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCAC  
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGCCTT  
GCGGCCTGTACTTCCCCAGGCGGAGGGCTTAATGCGGTTGCTGCACAGCA  
TAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCAACTCATCGTTTACGGCGTGGA  
CTAACAGGGTAGTCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGC  
GGTCAGTTACAAGACCAAAGAAGTCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA  
CATCCTCTTACCGCATTTACCGCTACCACGTGGAATTCCACTCTTCCTCT  
TCTGCACTCAAGTTCCCCAGGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGG  
GGGCTTTCACACTCAAACATTAAGGAACCGCCTGCGCGGCGCTTACGCC  
CAATAATTCCGGAACAACGCTTGCCACCTACGTATATAACCGCGGCTGCTG  
GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGGCA  
GTTACTCCGGTACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTGATGATCCGAA  
AACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCG  
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC  
CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGT  
GAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAGT  
GATAGCCGAAACCATCTTTCAGCTTTCCTCATGTGAGGGAAAGAATTAT  
CCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTT  
GCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGACTTCAGGGAGCAAGCTCCC  
ATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTC

>*Bacillus firmus* strain EGY4 Ac. Num. MG016517

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCGACA  
GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAGGCTAAT  
ACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGG  
CTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA  
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGCGAAGAACAAGTACCG  
GAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCACAGCAGGCCGCGGTATATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGTTCCTTAAGTCTCGATGT  
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTG  
AGTGCAGAAAGAAGAAAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGGTGAATACGTA  
AGAGAATGTGGAGGAACCACAGTGGCGAAGCGACTTCTTTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGGCGCCGAAAGCGGTGGGGGAGGCCAAACAAGGATTA  
AATACCCTGGTAGTCCACCGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACCGGGGCCCGCAC  
AAGCGGTGGAGACATTGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCAGGTCTTGACATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCG  
GGGACACGAGTGACAGGTGTGTCCATGGTTGTTTCGTCAGCTCTGTGTCCG  
TGGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT  
GCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
ACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAA  
GCGAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCC  
TGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT  
AACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTG  
GGACAGATGATTGGGGTG

>*Bacillus firmus* strain EGY5 16S Ac. Num. MG016518

CACCCCAATCATCTGTCCCATGTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTT  
ACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAG  
AATGGTTTTATGGGATTCGCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACC  
ATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG  
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTG  
CCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA  
CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG  
TCATACTCGTCCCCGAGAGGGGAACGCCCTAATCTCTTAGGGTTGTCAG  
GAGATGTCAAGACCTGATAAAGTTCTTCGCGTGGCTTCGAATTAACCAC  
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTCCAGCCTT  
GCGGCCGTTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGGCACT  
AAAGGGCGGAAACCCTCTACACATTAGCAATCATCGTTTACGCGGTGGA  
CTAACAGGGTTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCCACGCTTTCGCGGCCTCAG  
CGTCAGTTACAGACCAAAGAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACA  
TCTTCCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTTCTCTTCTGC  
ACTCCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGAACCTCCCCGGTGGAGCCGGGGGCT  
TTCACATCAGAACTTAAGGAACCGCCTGGCGCGCGCTTACGCCAATAA  
TTCCGGGACAACGCCTGCCACCTCACGGTATTACCGCGGGCTGCGTGGCA  
CGTAGTTAGACGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGCCAAGATACCGGCAGTT  
ACTCCCGGGA ACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTGCACGATCCGAAAA  
CCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCCTCAGACATTCGTCACATTGAGG  
ATCAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT  
CCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGG  
TGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAG  
TGATAGCCGAAACCATCTTTCAGCTTTCCTCATGTGAGGGAAAGAATTA  
TCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGT  
TGCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTGACTTCAGGGAGCAAGCTCC  
CATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTC

>*Pseudomonas hussainii* strain EGY6 Ac. Num. MG016519

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGA  
AGAGAGCTTGCTCTTGGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG  
AATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCG  
CATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAG  
ATGAGCCTAGGTACGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG  
CGACGATCGTTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA  
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA  
TGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG  
GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTGATTGCCTT  
ACTGTTTTGACGTTACACAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAG  
CAGCCGCGGTAATACACAGCGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG  
TAAAGCGCGCGGTAGGTGGTGGCGTAAGTTGAAGTGAAATCCCCGGGCT  
TAACCTGGGAAGTGCCTCCAACTGCGTGGCTAGAGTACGGTAGAGGGT  
AGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  
CCAGTGGCGAAGCGACTACCTGGACTGATACTGAACACTGAGGTGCGAA  
AGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCGTAAAC  
GATGTCAACTAGCCGTTGGGCTCCTGAGAGCTTAGTGCGCAGCTAACGC  
ATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG  
AATTGACCGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG  
CAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTGGACATGCTGAGAAGTTCAGAG  
ATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTCTCGTGAGATGTTGGATTAAGTCCCGTAACGCACTTGCGCTA  
TACACGATTGACCTGAATTACCAGCACGATATGAATGCGCATCATGCTAA  
GCTAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC  
ATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGGTACA  
GAGGGTTGCCAAGCCGTGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCTATCGTA  
GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA  
ATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC  
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACC  
TTCGGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTG



>*Pseudomonas hussainii* strain EGY7 Ac. Num. MG016520

CACCCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCGAAGGTT  
AGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG  
ATAGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCACGGCTTGGCAACCCTCTGTAC  
CTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT  
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTG  
CCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGG  
GACCTTTAATCCGCATCACATTCGCATCAACACGAGCTGACGACATGCCA  
TTGCCATGCACCTGTGTCTGAAGTTTTCCCGGAAGGCACCAATCCCATCTC  
TGGAAGTTCTCAGCAATGTCAAGGCCAAGGTAAGGGTTCTTCGCGTT  
GCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA  
TTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCCGGTCAACTTAA  
TGCGTTAGCTGCGCCACTAAGCTCTCAAAGGAGCCCAACGGCTAGTTGAC  
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC  
ACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTAGTCGCCTTCGCCA  
CTGGTGTTCTTCTATATCTACGCATTTACCAGCTACACAGGAAATTCCA  
CTACCCTCTACCGTACTCTAGCCACGCAGTTTTGGAGGCAGTTCCCAGGG  
TTAAGCCCGGGGATTTACCTTCAACTTACGCAACCACCTACGCCGCCGC  
TTTACGCCCAAGTAAATCCGATTAACGCCTCGCCACCCCTCTGTATTACC  
GCGGCTGCTGGGCACAGAGTTAGGCCGGTTGCCTATCCTGTTGGTAACGG  
TCAAAACAGTAAGGTATTAACTTACTGACCTTCCTCCCAACTTAAAGTGC  
CTTACAATCCGAAGACCGTTCTTACCGACCACGCCGGGCATGGCTGGAT  
CAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG  
TCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTT  
AACGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCGTAC  
CTAGGCTCATCTAATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCCACTTTCTCCCGT  
AGGACGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTTCCAAGTGTGTTCCCCCACTACT  
AGGCAGATTCCTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTAAATCCAAGAGCA  
AGCTCTTTCATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTC  
AAT

>*Pseudomonas hussainii* strain EGY8 Ac. Num. MG016521

CACCCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCGAAGGTT  
AGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG  
ATAGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCACGGCTTGGCAACCCTCTGTAC  
CTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT  
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTG  
CCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGG  
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC  
CTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGC  
ATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATG  
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCG  
GCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTATGCGTTAGCTGCGCGCCACTAAGG  
CTCTCCAAGGAGGCCCAACGGCTAGGTGACTAACTGGTTTACGGGCGTG  
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGATTGCTCCCCACGCTTTCGCAACCTC  
CAGTGTCAGTATTCAGTCCAGGTAGTCGCATTCGCCACTGGGTGTCATCC  
TATATCTACCGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACTTACCCTCTACC  
GTACTCTAGCCACGCAGTTTTGGAGGCAGTCCCAGGGTAAGCCCGGGGA  
TTTCACCTTCAACTTAGCGCAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAA  
TTCCGAATAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCGGCGGCTGGCACAGAG  
TTAGTCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAACAGTAAGGTATTA  
TACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGAACTTCTTC  
ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATCATGGT  
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTG  
TGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTAGCGATCGTCGCCTTGGTAGGCCT  
TTACCCACCAACTAGCTAATCGTACCTAGGCTCATCTAATAGCGTGAGG  
TCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCAGTC  
GTTTCCA  
ACTGTTGTCCCCACTACTAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCAC  
CCGTCCGCGCTAAATCCAAGAGCAAGCTCTCTTCATCCGCTCGACTTGC  
ATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT

>*Thauera* sp. strain EGY9 Ac. Num. MG016522

ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGC  
GGGGGCTTCGGCCTGCCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCATCGG  
AACGTACCCAGTGGTGGGGGATAGCTCGGCGAAAGCCGGATTAATACCG  
CATACGCCCTGAGGGGGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCCATTG  
GAGCGGCCGATGTTCGGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAAAGGCTCACCAAG  
GCGGCGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACA  
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTC  
GGGTTGTAAAGCCTCTCTTCACAGTCGGGAAGAAAAGGCAGACTCTAAC  
ATAGGCCAGTTGCTGAACCGTACCGAACAGAATGAAGCACCGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA  
TACTTGGGCGTAAAGCGTGCGCCAGGCGGTTTGCTAAGACAGGTGTGA  
AATCCCCGGAGCTTAACCCTAGGAACCTGCGCTTGTGACCTGGCCAGCCT  
AGAGTACCGCCAGAGGGGGGGTGGAAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGC  
GTAGAGATGGGGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCTG  
TACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC  
CTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGGTCGTTTCGGGAGCGGTA  
ACGCACTGAGTGACGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGT  
ACCGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGAACCCCGCACAA  
GCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAAACCTTA  
ACCCTTGACATTGCCAGGAATCTTGGTGAGAAGCCGAGAGTGCCTCCGG  
GAGCCTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCCGTCAGCTCGTGGTCCTAGG  
GAAATGTTGGGATTTAGAGTCCCCGCAACACGAGCGGCAACCCTTGCCA  
CTAATTGCCATCATTGAGTTGGGCACTTTAGTGGGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAG  
GGCTTCACACGTCATAACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGA  
GGCGGAGCCAATCCCTACAAAGCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGC  
AACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTC  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG  
AGTGGGTTTCACCAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACC  
ACGGTGAGATTCATGACTGGGGTG

>*Pseudomonas hussainii* strain EGY10 Ac. Num. MG016523

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGA  
AGAGAGCTTGCTCTTGGATTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG  
AATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCG  
CATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAG  
ATGAGCCTAGGTACGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG  
CGACGATCGTTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA  
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA  
TGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG  
GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTT  
ACTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  
AATCAGCCCGCGTAGAGTGCTTGCATAAGTATGAAGGGGAAATTCCCC  
GGATCTAACCTGGGAGAACTGCGCTCCAAAACGGTCGTGTGCTAGGAGTA  
AGCGTAGAAGATGAGTGAAGATTTCCCTCTGGTTCGACGCGGTGAAATG  
CGTAGATATAGAGAAGGAACACCACCTGTGCGAAGGGCGACTACCTGGA  
CTCGATATCGTCACACTTAGAGGTGCGAAAGCGTGGGTGAGCAAACCAG  
GTATGAGATAACCCTTGGTAGGTCCCGACGCCGGTAAACGAGTGTTACAC  
TACCCGGTGGGGCTTCCTTGATGAGCTTAATGGGCGCAAGCTAAACGCAT  
TTAAGTTGACCCGCCTGGGGGATGTACGCCCGCAAGGGTTAAACTCCA  
AATGAAATTGACCGGGGGCCCGCACCAAGCCGGTGGGAGCATGTGGTTT  
TAATTCGAAAGCAACCGCGAAGAACCTTTACCTTGGCCCTGACATGCTGA  
AGAACTTTCCAGAAGAATGGATGGGTGCCCTTCCGGAAACTCAGAACA  
ACAAGTTGCTGCAATGGCCTGTCGGTCAGCTCCGTGTCCATGGAGAATGA  
TGGGGTTAAGGTTCCTGTAAGCGAGAGCCGCCAAACCACGTTGAGTCCCT  
TAGTTACCAGCACGTTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA  
AACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC  
CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG  
TGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCTATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG  
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGT  
CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG  
GAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGGTTAC  
CACGGAGTGATTCATGACTGGGGTG

>*Bacillus circulans* strain EGY11 Ac. Num. MG016524

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTT  
TAAAAGCTTGCTTTTAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC  
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  
GATAATCCTTTTCCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGT  
CACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT  
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGCGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGA  
GTAAGTACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT  
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGGAGGCGGGTCTCTTTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCACGCGCTCAACCCTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAAGTTGAG  
GTGCAGAAGAGGAACAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGGCG  
TAGAGATGATTGGAGGAACACCCAGTGGCGAAGCGGACTTCTTTGGTTCT  
TGTAAGTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAAGGATTAA  
AATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGGTGTAAAGG  
GTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGGCACTCCCGCCTGG  
GGACTAACGGCCGCAAGGCTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  
CACAAGCGGTTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAGACC  
TTACAGGTCTTGGACATCCTCTGGACACTCCTAGAGATAGGACGCTCCCC  
TTCGGGGGACAGAGTGACAAGTGGTGCATAGGGTGTGTCGTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGT  
TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAACCGCGAGGTC  
GAGCAAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG  
CCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
GTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGG  
TGGGATAGATGATTGGGGTG

>*Thermomonas haemolytica* strain EGY12 Ac. Num. MG016525

TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGCAGCAC  
AGTGGAGCTTGCTCCATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACG  
TGGGAATCTGCCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAAT  
ACCGCATGCGCCCTTCGGGGGAAAGCCGGGGACCTTCGGGCCTGGCGCG  
ATTGGATGAGCCCACGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAACGGCCCAC  
CAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA  
AGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTG  
GACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGC  
CCTCGGGTTGTAAAGGCTCTTTTGTCCGGAAAGAAAAGCACTCGGGTTAA  
TACCCCGGTGTCCTGACGGTACCGGAAGAAATAATGCACCGGCTAATCTT  
CGGGCCAGCAGCCGCGGTAATCACGAAGGGTGCAAGCGTAACTCGGAAT  
TACTGGGCGTAAAGCGTGCGTACGTGGTTCGTAAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCTGGGCTCAACCTTGGAATGGCATTGGAAACTGGCGGACTGGAGTGC  
GGTAGAGAGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGGAGA  
TCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAGCACCTGAC  
ACTGAGGCACGAAAGCGTGAGGAGGCAAACAGGATTAGAATACCCTGTA  
GTCCACCGCCCTAAACGATGCGAACTGCACGGTGGGTGCAACTTGGCAC  
CTCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG  
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG  
ATATTGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCCTTTACCTGGCCTGGA  
CATGCACGGAAGCTTCCAGAGATGGGAGTGTGCCTTCGGGAACCGTGAC  
ACAGGTTGTCTGCATGGCTGTGCCTCAACTCGTGTCGTGAGATGTTGTGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGAGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAAT  
GGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGCGACAAGCCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTA CTG  
AGCAGCATGGTGGGGACAGAGGGCTGCGATGCCGCGGGGCGGAGCCAAT  
CCCAGAAACCCATCCCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG  
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGTTGCACC  
AGAAGCAGGTAGCTTAACCGCAAGGAGGGCGCTCTCCACGGTGTGGCCG  
ATGACTGGGGTG

>*Bacillus siralis* strain EGY13 Ac. Num. MG016526

TTTAAGCCGAAGGTTCGATGCTATTCGGCGCATGGGCGCGGGATTAT  
CCCCACCTTCGGCCGGGTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGGGCCCAACT  
GAATGCTGGGACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC  
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTG  
TCCCCCGAAGGGGAACGCCCTATCTCTAGGGGTGGCAGAGGATGTCAAG  
ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGGTGCTTCGAAATCACACACCACATGCTCCA  
CCCCTTGTGCGGGCCCCCTCAATTCCCTTTGAGTTTCACCCTTGCGGCCGT  
ACTCCCAGGCGGAGAGGCTTAAGGCGTTTGCCGGCACCACCAAAGGG  
CGGAAACCCTCTAACCCTTAGCACCTCATCGTTTACGGCGGGGACTACC  
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCCTCAGGCGTCCA  
GTTACAGACCAAAGAGCCGCTTCGCCACTGGGGTTCCCTCCCACATCTC  
TACGCATCTCACCCCTACACCGTGGAATTCCGCTCTTCTCTTCTGCACTCA  
AAGTCCCCCAGTTTCCAAAGACCCTCCACCGGTTGAGGCCGGGGGGCTT  
TTCCCATTCAACTTAAAGAAACCGCCCTGCGCCCGCTTTTACGCCCAA  
AAATTCCGGACACAACGCCTTGCCACACCGACGCTATTTACCGGCGGCTT  
GCTGGCCACCGAAATTAGCCCGGGGCTTTTCTAGGGTAGGGAACCCGTCA  
AGGTACCGGCCAGTTACTCCGGTACTTGGTCCTCTCCGCTAACAACAGAA  
ATTTTACAATCCCAAACCCCTTCATCCACTCACGCGGCGTTTGGCTCCGTC  
AAACTTTGCGCCCATGCGGGAAAGATTCCCTACGGCTGCCTCCCGAAGAA  
GTCGGGGCCGGGGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGC  
GCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGC  
GCCGCGGGCCCATCTATAAGTGATAGCCGAAACCATCTTTCCGCTTTCGA  
ACATGTGTTCAAAGCATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTA  
TCCCAGTCTTATAGGCAGGTTGCCACGTGTTATCACCCGTCCGCCGCC  
AAGCAACAAGAAACCAAGCTTTCTTGTGCAAGCGCTCGACTTGCATGTAT  
TAGGCAGCGGCCAGCGTTCGTC

>*Bacillus firmus* strain EGY14 Ac. Num. MG016527

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACA  
GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
ACCGGATAATTCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTCGG

CTATCACTTACAGATGGGCCC GCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA  
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCCGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACC  
GGAGTAACTGCCGGTACCTTGAACGGTACCTAACCAGAAAGGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCCGCGCCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATG  
TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT  
GAGTGCAGAAGAAGAAGAGTGGAATTTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAA  
CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTTTTCCGC  
CCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTTACCAGGTCTTG  
ACATCTCCTGACAAATCCTAAGAGAATAAGGCGTTCCCCTCCGGGGGAC  
AGAATGGACACGTGGTGCCATGGTTGTCGTCAAGCCTCGTGTCCGTGGAA  
AATGTTTTTGGGGACTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGT  
TGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTT  
AAGCGAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCG  
CCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT  
GTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGG  
TGGGACAGATGATTGGGGTG