



**TÜRKİYENİN FARKLI BÖLGELERİNDE BULUNAN  
KAPLICALARDAN ALINAN ÖRNEKLERDEN TERMOFİLİK  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KONVENSİYONEL VE  
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU,  
ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN ENZİMLERİNİN  
ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP SUŞLARIN  
BELİRLENMESİ**

**Şeyda ALBAYRAK**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Mikrobiyoloji Bilim Dalı  
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**2018**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYENİN FARKLI BÖLGELERİNDE BULUNAN  
KAPLICALARDAN ALINAN ÖRNEKLERDEN TERMOFİLİK  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KONVENSİYONEL VE  
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU,  
ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN ENZİMLERİ  
ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP SUŞLARIN  
BELİRLENMESİ**

Şeyda ALBAYRAK

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**  
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

**ERZURUM**  
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü  
TEZ ONAY FORMU



TÜRKİYE’NİN FARKLI BÖLGELERİNDE BULUNAN KAPLICALARDAN ALINAN  
ÖRNEKLERDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,  
KONVENSİYONEL ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU,  
ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN ENZİMLERİ ÜRETME POTANSİYELİNE  
SAHİP SUŞLARIN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Şeyda ALBAYRAK tarafından hazırlanan bu çalışma, 05/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Üye : Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu’nun **19.07/2018** tarih ve **..29.../..17.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Mehmet KARAKAN  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYENİN FARKLI BÖLGELERİNDE BULUNAN KAPLICALARDAN ALINAN ÖRNEKLERDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KONVENSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU, ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN ENZİMLERİ ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP SUŞLARIN BELİRLENMESİ

Şeyda ALBAYRAK

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı  
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan sıcak su kaplıcalarından alınan su ve çamur örneklerinden termofilik özellik gösteren toplam 130 izolat elde edildi. Konvensiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan analizler sonucunda; *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*, *Enterococcus*, *Exigobacterium* ve *Paenibacillus* cinslerine ait toplam 11 farklı tür tespit edildi. Elde edilen veriler incelendiğinde; test suşlarının, genellikle %2-4 tuz konsantrasyonunda, pH 7-9'da ve 45-55°C sıcaklık değerlerinde optimum üreme potansiyeline sahip olduğu belirlendi. Ayrıca termofilik bakterilerin tamamının Gram, Endospor (EA 9 ve EA 10 hariç), katalaz ve oksidaz pozitif (EA 9 hariç), hareketli, çubuk (EA 9 hariç) formda olduğu tespit edildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda tüm izolatların %99 benzerlik yüzdesine sahip olduğu gözlemlendi. Tanılanan 11 farklı türün endüstriyel enzim üretim potansiyelleri petri plak yöntemi kullanılarak incelendi. Elde edilen veriler analiz edildiğinde: EA 4 ve EA 8'in güçlü proteaz, EA 2 ve EA 4'ün güçlü amilaz; EA 2-5, EA 7 ve EA 8 kodlu izolatların güçlü lipaz, EA 2, EA3, EA 7 ve EA 8'in ksilanaz ve EA 6 kodlu izolat ise selülaz enzimi üretim potansiyeli bakımından pozitif olduğu belirlendi. Tüm bu veriler göz önüne alındığında, test suşlarının endüstriyel enzim üretim potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu, bu izolatlardan elde edilecek enzimlerin biyoteknolojik proseslerde yaygın kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

**2018, 93 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Termofilik bakteri, İzolasyon, 16S rRNA, rep PCR, lipaz, amilaz, proteaz, selülaz, ksilanaz

## ABSTRACT

Master Thesis

### ISOLATION, IDENTIFICATION BY CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS OF THERMOPHILIC BACTERIA TAKEN FROM HOT SPRING LOCATED IN DIFFERENT REGION OF TURKEY, DETERMINATION OF STRAIN WITH POTANCY TO PRODUCE ENZYMES WHICH ARE INDUSTRIALLY IMPORTANT

Şeyda ALBAYRAK

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics  
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

In this study, a total of 130 isolates showing thermophilic characteristic from water and sludge samples attained from thermal springs found in different regions in Turkey was obtained. As a result of analyses by using conventional and molecular methods, a total of 11 different species which would belong to *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*, *Enterococcus*, *Exigobacterium* and *Paenibacillus* was determined. When the obtained data were examined, it was determined that the test strains have usually optimum reproductive potency at 2-4% salt concentration, pH 7-9 and temperature of 45-55 °C. It was also detected that all of the thermophilic bacteria were in the form of grams, endospores (except EA 9 and EA 10), catalase and oxidase positive (except EA 9), mobile, rod (except EA 9). As a consequence of 16S rRNA sequence analysis, it was observed that all isolates had 99% similarity. Afterwards, industrial enzyme-producing potentials of 11 different species identified were examined by using petri plate method. When the obtained data were analyzed, the coded isolates of EA 4 and EA 8 for strong protease-producing potential, EA 2 and EA 4 for strong amylase-producing potential, EA 2-5, EA 7 and EA 8 for strong lipase-producing potential, EA 2, EA 3, EA 7 and EA 8 for xylanase-producing potential and EA 6 for cellulase-producing potential were designated to be positive. When all these data are taken into consideration, it is considered that the test strains have a high industrial enzyme-producing potential and the enzymes obtained from these isolates will be widely used in biotechnological processes.

**2018, 93 pages**

**Keywords:** Thermophilic bacteria, isolation, 16S rRNA, rep PCR, lipase, amylase, protease, cellulase, xylanase

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren desteğini her zaman hissettiğim, bana inanan, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan, her türlü laboratuvar imkânını sağlayan Bölüm Başkanımız ve hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Her zaman yardımına koşan, laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan, deneylerimin her aşamasında ve tez yazımında yaptığı yardımları unutmayacağım Sayın Arş. Gör. Sumeyya AKBULUT'a ve Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI'ya,

Yüksek lisansı eğlenceli hale getiren, tanıştığım için çok mutlu olduğum laboratuvar arkadaşlarım; Sayın Meryem DOYMUŞ, Sayın Yaprak KARADAYI, Sayın Melek ACAR, Sayın Şeyda YILDIZ, Sayın Aybüke EROL, Sayın Betül BAYDAR, Sayın Esra ALÇİÇEK'e,

Başımız her sıkıştığında kapısını çaldığımız Sayın Doktor Yeliz DEMİR'e, çevirilerde yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Sayın Mehmet Akif ÖMEROĞLU'na,

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, hayatım boyunca maddi manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen, cesareti ve kişiliği ile örnek aldığım babam Sayın Erdal ALBAYRAK'a, hayır duaları ve güler yüzü ile güzel yüreğine sığındığım annem Sayın Asiye ALBAYRAK'a, kardeşlerim ve aileme,

Ve son olarak da, en fazla teşekkürü hak eden Cennet Ülkem'in huzur ve barış içerisinde olmasını sağlayan GAZİLERİMİZ, bu uğurda şehadet şerbeti içen, al kanlarıyla destan yazan ŞEHİT ve ŞEHİT YAKINLARINA teşekkürü bir borç bilirim.

**Şeyda ALBAYRAK**

**Temmuz, 2018**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Termofilik Bakteriler ve Habitatları.....	3
1.2. Termofilik Mikroorganizmaların Özellikleri .....	6
1.3. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Organizmaların Önemi .....	10
1.4. Termofilik Bakterilerin Tanınması.....	11
1.5. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler .....	14
1.5.1. 16S rRNA analizi .....	14
1.5.2. RFLP-PCR.....	16
1.5.3. Genomik parmak izi analizi .....	16
1.5.4. Filogenetik analiz .....	17
1.6. Enzimler .....	19
1.7. Termostabil Enzimler .....	24
1.8. Endüstriyel Öneme Sahip Termofilik Enzimler.....	25
1.8.1. Proteazlar.....	26
1.8.2. Amilazlar .....	26
1.8.3. Lipazlar.....	27
1.8.4. Selülazlar .....	28
1.8.5. Ksilenzazlar.....	29
1.8.6. Pektinazlar .....	30
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>39</b>
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar .....	39

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler .....	40
3.1.3. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanışı .....	41
3.2. Yöntem .....	44
3.2.1. Örneklerin alınması .....	44
3.2.2. Termofilik bakterilerin izolasyonu .....	44
3.2.3. Seçilen izolatların konvensiyonel yöntemlerle tanısı .....	45
3.2.3.a. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi .....	45
3.2.3.b. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	47
3.2.3.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi .....	48
3.2.4. Test suşlarının moleküler yöntemlerle karakterizasyonu .....	49
3.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu .....	49
3.2.4.b. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi .....	51
3.2.4.c. 16S rRNA PCR .....	54
3.2.4.d. Klonlama .....	56
3.2.5. Endüstriyel açıdan önemli enzimleri üretme potansiyeline sahip izolatların belirlenmesi .....	61
3.2.5.a. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi .....	61
3.2.5.b. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi .....	62
3.2.5.c. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi .....	62
3.2.5.d. Selüloz aktivitesinin belirlenmesi .....	63
3.2.5.e. Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi .....	63
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>65</b>
4.1. Termofilik Bakterilerinin İzolasyonu .....	65
4.2. İzolatların Konvensiyonel Yöntemlerle Tanısı .....	65
4.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	65
4.2.2. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	68
4.2.3. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi .....	70
4.2.4. İzolatların moleküler yöntemlerle karakterizasyonu .....	71
4.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu .....	71
4.2.4.b. rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi .....	72
4.2.4.c. 16S rRNA PCR .....	74
4.2.4.d. Klonlama .....	74



4.2.4.e. Endüstriyel açıdan önemli enzimleri üretme potansiyeline sahip izolatların belirlenmesi.....	79
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>84</b>
KAYNAKLAR .....	89
ÖZGEÇMİŞ .....	94



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum Klorür
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
gr	: Gram
IPTG	: İzopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
M	: Molar
m	: metre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rep-PCR	: Genomik Parmak İzi Analiz Yöntemi
RG	: Revers Giraz
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Filogenetik yaşam ağacı, organizmaların üç domainini ve her domainin birkaç temsilcisi.....	2
<b>Şekil 1.2.</b> Mikroorganizmaların farklı sıcaklık sınıflarında üreme yanıtları .....	4
<b>Şekil 1.3.</b> Türkiye’de bulunan jeotermal kaynaklar dağılımı .....	6
<b>Şekil 1.4.</b> Çevresel örneklerden bakterilerin genotipik identifikasyonu ile ilgili moleküler yaklaşımlar .....	13
<b>Şekil 4.1.</b> EA 1, EA 10 suşlarına ait petri görüntüleri .....	65
<b>Şekil 4.2.</b> EA 4 izolatına ait örnek gram boyama görüntüsü .....	66
<b>Şekil 4.3.</b> EA 7 İzolatına ait endospor görüntüsü .....	67
<b>Şekil 4.4.</b> EA 6 bakterisine ait hareketlilik testi.....	67
<b>Şekil 4.5.</b> EA 1 izolatına ait katalaz test sonucu .....	70
<b>Şekil 4.6.</b> EA 6 izolatına ait oksidaz test sonucu .....	71
<b>Şekil 4.7.</b> İzolatlara ait genomik DNA’ların jel görüntüsü .....	71
<b>Şekil 4.8.</b> Test izolatlarına ait BOX- PCR bant profilleri .....	72
<b>Şekil 4.9.</b> İzolatlara ait (GTG) <sub>5</sub> PCR bant profilleri.....	73
<b>Şekil 4.10.</b> Test izolatlarına ait 16S rRNA görüntüsü .....	74
<b>Şekil 4.11.</b> Mavi beyaz koloni petri görüntüsü .....	75
<b>Şekil 4.12.</b> Test izolatların koloni PCR görüntüsü .....	75
<b>Şekil 4.13.</b> Türkiye’nin çeşitli yörelerinden toplanan termal su örneklerinden izole edilen bakterilerin 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining .....	77
<b>Şekil 4.14.</b> Test izolatlarının örnek proteaz aktivite görüntüsü .....	79
<b>Şekil 4.15.</b> Test izolatlarının örnek amilaz aktivite görüntüsü .....	80
<b>Şekil 4.16.</b> Test izolatlarının örnek lipaz aktivite görüntüsü .....	81
<b>Şekil 4.17.</b> EA 4 (-) ve EA 6(+) suşlarına ait selülaz aktivite görüntüsü.....	82
<b>Şekil 4.18.</b> Test izolatlarına ait ksilenaz aktivite görüntüsü .....	83

## ÇİZELGELER DİZİNİ

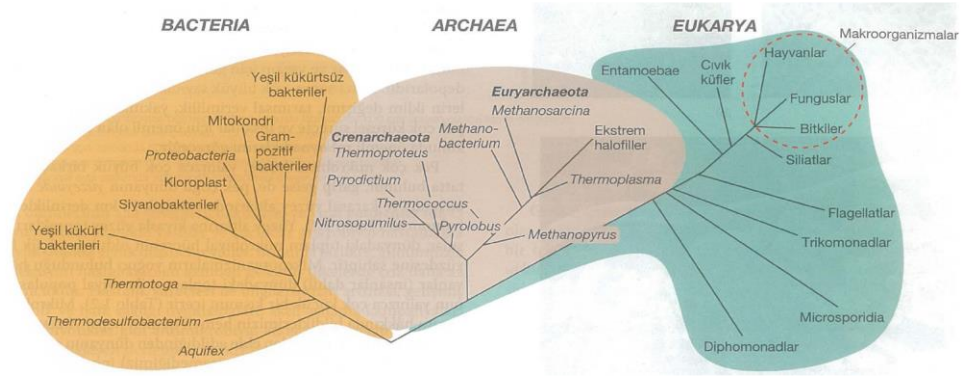
Çizelge 1.1. 16S rRNA dizi analizinde kullanılan primerler .....	15
Çizelge 1.2. Bazı enzimler ve onların kullanım alanları.....	21
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	40
Çizelge 3.2. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyon ve miktarları .....	55
Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR işlemi için uygun sıcaklık, süre ve döngü sayısı .....	55
Çizelge 3.4. PCR programı .....	59
Çizelge 4.1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı (%).....	68
Çizelge 4.2. İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklık değerleri.....	69
Çizelge 4.3. İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığı .....	69
Çizelge 4.4. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları .....	76
Çizelge 4.5. İzolatların Eztaxon verilerine göre benzerlik yüzdeleri.....	78
Çizelge 4.6. Test izolatların proteaz aktivite sonuçları.....	79
Çizelge 4.7. Test izolatlarının amilaz aktivite sonuçları.....	80
Çizelge 4.8. Test izolatlarının lipaz aktivite sonuçları.....	81
Çizelge 4.9. Test izolatlarının ksilanaz aktiviteleri.....	83

## 1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki yaşamın olağanüstü çeşitliliği insanların geçmişten beri ilgisini çekmektedir. Sadece canlıların çeşitliliği değil bu canlıların farklı zaman ve mekanlarda ki dağılımları ve işlevleri de oldukça cezbedicidir. Ancak çeşitlilikle ilgili bilgilerin önemli bir kısmı, hayvan ve bitkiler üzerinde yapılan biyoçeşitliliğin dağılması ve korunması üzerine yapılmıştır. Mikrobiyal çeşitliliğin büyük bir kısmı hala keşfedilmemiştir (> %95). Prokaryotların dünya üzerindeki tür çeşitliliğinin ise ancak %1'i tanımlanmıştır; dolayısıyla prokaryotik çeşitlilik hakkında çok az şey bilinmektedir. Sistematik çalışmalardaki gelişmelere rağmen günümüzdeki doğal habitatlarda bulunan prokaryotik tür sayısını tahmin etmek mümkün değildir. Prokaryotlar içinde bilinen en fazla çeşitliliğe sahip olan tür *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve düşük G+C oranına sahip gram + bakterilerdir. Bakteriler yeryüzündeki en fazla bulunan ve en çok çeşitliliğe sahip olan canlı gruplarından biridir (İnan 2011).

Canlılar sınıflandırılırken sistematik ya da taksonomi terimleri kullanılır. Taksonomi sınıflandırmanın teorik yapısını ve esaslarını ele alırken; sistematik, türlerin belli sistemlerdeki yerlerine yerleştirmesini gerçekleştirmektedir.

Modern moleküler yöntemlerin keşfedilmesiyle, mikroorganizmaların araştırılması hız kazanmıştır. 1990 yılında Wosse ve arkadaşları canlıları; vücut, biyokimyasal, filogenik, ve genomik yapılarına göre Bacteria, Archea ve Eukarya olarak 3 domaine ayırmışlardır. 1977 yılında yapılan çalışmada ise 16S rRNA dizilişleri başta olmak üzere, hücre duvarı, lipitler, RNA polimeraz ve protein sentezi özelliklerine göre canlılar alemi Bacteria, Archea, Eukarya olmak üzere 3 domaine ayrılmıştır (Ercan 2005).



**Şekil 1.1.** Filogenetik yaşam ağacı, organizmaların üç domainini ve her domainin birkaç temsilcisi (Brock 2017)

Bakterilerin tanılanması için; mikroskopik morfolojileri, koloni morfolojileri, hareketli olup-olmadıkları, gram reaksiyonları (hücre duvar yapıları), ısı, O<sub>2</sub>, ışık ve pH istekleri, karbon kaynağı olarak kullanabildiği moleküller, hücrenin biyokimyasal yapısı ve nükleik asitlerin belirlenmesi gerekmektedir. Tanılamada gerekli testlerin gerçekleşmesi için mikroorganizmaların kültüre edilmesi gerekir. Bazı mikroorganizmaları kültüre almak mümkün olmamaktadır. Bundan dolayı mikroorganizmaları kültüre almadan kendi doğal ortamlarında tanılamaya olanak sağlayan teknikler (in situ hibridizasyon problemleri) geliştirilmiştir. Bu yöntemler genotipik (nükleik asitlere dayalı yöntemler) ve fenotipik yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Bakterilerin tanı amaçlı karakterizasyonu için, hem fenotipik hem de genotipik karakterlere yer verilmelidir. İlk olarak fenotipik gözlemler daha sonra bu verilerden faydalanılarak moleküler incelemeler yapılmaktadır.

Fenotipik özellikler; mikroskopik özellikler (hücre şekli, büyüklüğü, hareketliliği, flagella bulunup bulunmadığı, spor oluşturup oluşturmadığı, hücresel inklüzyonlar, renk, koloni morfolojisi, gram boyanma özelliği), hücre bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu (DNA, membran bileşimi, yağ asitleri, eter yağları, alifatik hidrokarbonlar, izoprenoid kuinonlar, sitokromlar, hücre duvarı yapıları ve bileşimi, bakteri antijenleri, lipopolisakaritler, mikolik asitler, peptidoglikan, elektroforetik protein analizleri, poliaminler), metabolizma ile ilgili özellikler (temel enerji

metabolizması, besinsel ve metabolik karakterler, özel besinsel gereksinimler, enzimler, ekolojik parametreler) ve nükleik asit propları ile belirlenen karakterleri (spesifik nükleik asit proplarının sentezi veya izolasyonu, hedef nükleik asit ekstraksiyonu, spesifik nükleik asit proplarının çoğaltılması ve gözlemlenmesi, hedef nükleik asitin nükleik asit probu ile hibridizasyonu ve hibridlerin tespiti) kapsamaktadır (Acar 2009).

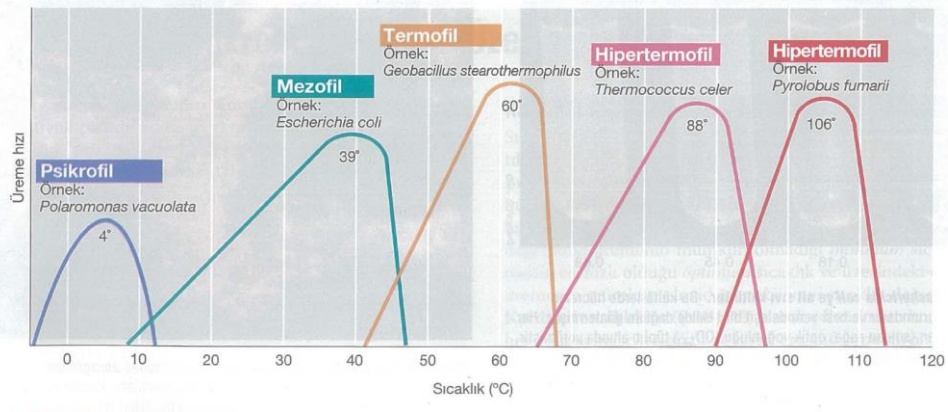
Yapılan filogenetik incelemeler sonucunda Archaea ve Bacteria'nın prokaryot grubu içerisinde yer almasına rağmen birbirinden farklı olduğu, Archaea'lar ve Eukaryotlar'ın atalarının yakın akraba oldukları tespit edilmiştir. Ökaryotların aksine bakteriler ve arkeaların çok yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği saptanmıştır (Tarakçıoğlu 2016).

### **1.1. Termofilik Bakteriler ve Habitatları**

Mikroorganizmalar biyosferin en önemli kısmını oluşturmalarına rağmen besin üretiminde kullanılanlar ve hastalık yapanlar haricinde büyük çoğunluğu tanılanamamıştır. Mikrobiyal çevre; hava, su, toprak, kutuplar, buzulların arası, volkanik yanardağ bacaları, tuz gölleri, sodalı sular ve yüksek asitli ortamlarda geniş bir yayılım göstermektedir. Su sıcaklığının kaynama noktasına ulaştığı değerlerde bile mikroorganizmalar yaşamını sürdürmektedir. 65°C'nin üzerinde yalnızca prokaryotik yaşam formları bulunurken daha yüksek sıcaklıklarda sadece Bacteria ve Archea toplulukları bulunmaktadır (Ercan 2005).

Sıcaklık canlı organizmaları iki şekilde etkiler. Sıcaklık arttıkça, enzimatik tepkimelerin hızı artar ve üreme daha hızlı olur. Bununla beraber, belirli bir sıcaklığın üstünde, proteinler ve diğer hücre bileşenleri denatüre olabilir ya da geri dönüşümü olmayan bir şekilde zarar görebilir. Her bir mikroorganizma için, üremenin mümkün olmadığı minimum sıcaklık, üremenin en hızlı olduğu optimum sıcaklık ve üzerindeki değerlerde üremenin mümkün olmadığı maksimum sıcaklık değerleri vardır. Kardinal sıcaklıklar olarak adlandırılan bu üç sıcaklık, her organizma için tipiktir ve türler arasında önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir (Brock 2017).

Organizmalar arasında çok düşük optimumlardan çok yüksek optimumlara uzanan bir devamlılık olsa da sıcaklık optimumlarındaki üremelerine göre mikroorganizmalar; düşük optimum sıcaklığa sahip psikrofiller; orta aralıklarda optimum sıcaklığa sahip mezofiller; yüksek optimum sıcaklığa sahip termofiller ve oldukça yüksek optimum sıcaklığa sahip hipertermofiller olmak üzere 4 grupta incelenir. Mezofiller doğada yaygın olarak bulunurlar ve üzerinde en fazla çalışılan mikroorganizmalardır. Mezofiller sıcak kanlı hayvanlar ile ılıman ve tropik enlemlerdeki kara ve su ortamlarında bulunurlar. Psikrofiller alışılmadık soğuk, termofiller ise alışılmadık sıcak ortamlarda bulunurlar. Hipertermofiller ise sıcak su kaynakları, geyzerler ve açık denizlerdeki hidrotermal yarıklar gibi ekstrem sıcak habitatlarda bulunmaktadır (Brock 2017).



**Şekil 1.2.** Mikroorganizmaların farklı sıcaklık sınıflarında üreme yanıtları (Brock 2017)

ılımlı termofiller 50-60°C sıcaklık aralığında optimum olarak gelişebilen protozoa, fungi, alg, *Streptomyces* ve *Cyanobacteria* gibi prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Ayrıca ılımlı termofillerin filogenetik olarak mezofilik organizmalara benzer olduğu ve sıcak çevrelere uyumun sonradan olduğu kabul edilmektedir. 60-80°C sıcaklık aralığında gelişen ekstrem termofiller genel olarak *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* ve *Aquifex* cinslerine ait çeşitli türleri içermektedir. 80-110°C sıcaklık aralığında gelişebilen hipertermofiller ise arkeleri kapsamakta: arkeler ise



*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* ve *Nanoarchaeota* olmak üzere 4 şubeden oluşmaktadır (Akdaş 2012).

Termofilik mikroorganizmaların doğal yaşam alanları; jeotermal alanlar, termal topraklar, çöller, derin kara ve okyanus dipleri şeklinde oldukça geniş bir yayılım göstermektedir (Adıgüzel 2006).

Jeotermal alanlar iki tiptir bunlardan ilki aktif volkanik bölgelerde bulunan yüksek sıcaklıktaki alanlardır ve bu alanlar ısı kaynağı olarak 2-5 km derinliğinde magma kazanına sahiptir. Bunlar genellikle 500-3000 m'de 150-300°C sıcaklığı ve yüzeyde buhar emisyonu ve volkanik gazlarla karakterize edilmektedir. Volkan ağzındaki alanlar, asidik topraklar, asidik kaplıcalar ve kaynar çamur havuzları bu gruba örnek verilebilir. Bu alanlar yüksek kükürt içerir ve asidik karakterdedir (Sarigül 2007).

İkinci tipteki jeotermal alanlar ise düşük sıcaklıklı alanlar olarak isimlendirilir; lav akıntıları, magma odaları ve aktif volkanik alanların dışında bulunmaktadır. Sıcaklığı genelde 150°C'nin altındadır ve nötralden alkaliye kadar olan pH değerleriyle karakterize edilir. Fresh-water ılıcalar, taze sıcak su kaynakları ve gayzerler de bu gruba örnek verilebilmektedir. En iyi bilinen ve en çok çalışılan jeotermal alanlar İzlanda, Kuzey Amerika (Yellowstone National Park), Yeni Zelanda, Japonya, İtalya ve Rusya'da bulunmaktadır (Sarigül 2007).

Termofilik bakterilerin çoğu kıtasal ve deniz diplerindeki petrol kaynaklarından, sıcaklığı 113°C'yi geçmeyen derinlerden izole edilmektedir. Volkanik alanlarda ise yer kabuğunun çeşitli derinliklerinde ısının oluşturduğu termal enerji mevcuttur, bu termal enerji bazen kaplıcalar olarak görülürken bazen volkanik patlamalar şeklinde görülebilmektedir. Termofillerin çalışıldığı en önemli kaynak kaplıcalardır. Nötral pH'lı kaplıcalar, asidik ve kükürtlü kaplıcalar, demirce zengin kaplıcalar gibi çeşitli özelliklerde kaplıcalar bulunmaktadır. Kaplıca sularının sıcaklıkları genellikle 50-130°C'ler arasındadır ve yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtikleri alanlardaki minarelli çözümleri çözerek minarel maddelerce zengin duruma gelmektedirler (İnan 2011).

Ülkemiz coğrafi yapısı gereği deprem kuşağında yer almaktadır ve sıcak su kaynakları bakımından oldukça zengindir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Türkiye’de bulunan jeotermal kaynaklar dağılımı (<http://13harf2hece.blogspot.com/2016/11/tfc-atlas.html>) (6/3/18 tarihindeki görüntü)

## 1.2. Termofilik Mikroorganizmaların Özellikleri

Dünya üzerinde yaşayan tüm mikroorganizmaların atasının termofilik bakteriler olduğu kabul edilmektedir. Bu bilgiler ışığında termofiller temelde atasal ve sonradan termofiller olarak ikiye ayrılmaktadır, atasal termofillere örnek olarak *Thermotoga* ve *Aquifex* verilirken, sonradan termofil olanlara *Bacillus* ve *Clostridium* örnek verilebilmektedir (Sarı 2016).

İlk izolasyonu yapılan termofilik organizma *Sulfolobus acidocaldarius* olup 75°C’de optimum gelişim göstermektedir. Bununla birlikte ilk izole edilen *Bacillus*’un 1888’de Miquel tarafından 70°C’de, Paris Seine nehrinden izole edildiği bilinmektedir, sonraki 30-40 yıl içinde toprak, lağım ve besinlerden yaklaşık 60°C’de yaşayabilen basiller izole edilerek, çok sayıda yeni termofilik basil türü tanımlanmıştır (Ercan 2005).

Termofilik organizmalar; enzim, antibiyotik, çeşitli biyokimyasal maddeler ve insektisitlerin üretiminde kullanılması sebebiyle bilimsel araştırmalarda çokça tercih edilmektedir. *Bacillus* cinsi üzerinde en fazla çalışma yapılan termofilik bakteri gruplarının başında gelmektedir. Bu organizmalar genellikle Gram pozitif, aerobik, çubuk şekilli bakteriler olup endospor oluştururlar. Endospor oluşturması bu cinsi elverişsiz şartlara dayanıklı hale getirmektedir. *Bacillus* cinsi endüstriyel enzim üretiminde tercih edilmesinin nedenleri arasında: hızlı ve kolay üremesi, çok çeşitli karbon, nitrojen kaynakları ve farklı substratları kullanabilme, yüksek verimde ürün oluşturması sayılabilmektedir. Ayrıca bu gruba dahil organizmalar, topraktan, tatlı su ve denizlerden, bitki rizosferlerinden, gıdalardan, bazı canlıların bağırsak sistemlerinden, bazı böcek larvalarından ve hatta ekstrem pH ve sıcaklığa sahip alanlardan da izole edilebilmektedir (Tarakçıoğlu 2016).

Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre yüksek üreme hızları ve kapasiteleri, son ürünün kolay kazanılması, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek işlem stabilitesi ve verimi, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri, yüksek biyosentetik aktiviteleri gibi birçok avantajları bulunmaktadır (Tarakçıoğlu 2016).

Termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda hücre ve moleküllerinin fonksiyonel halde kalmasına izin verecek çeşitli adaptasyonlara sahiptirler. Bu adaptasyonlar şu şekilde sıralanabilir :

1. DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65°C'de denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin 107°C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençliyken, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Yüksek tuz konsantrasyonunun çift zincirli DNA'yı 107°C'de termal degradasyona karşı koruduğu bilinmektedir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler. Reverse giraz (RG) enzimi, bütün hipertermofillerde,

bazı termofilik bakterilerde ve arkealarda bulunmaktadır. RG, pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve DNA'daki bağlantı sayısının artmasını sağlamaktadır. Bağlantı sayısındaki aşırılık, DNA'nın yüksek sıcaklıklarda fonksiyonel halde kalması için gereklidir. Mezofilik bakterilerin ve birçok canlının DNA'sı RG enzimini içermediği için, negatif süpersarmallık gösterirler. Bu yapı DNA'nın daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Yani pozitif süpersarmal DNA, termal denatürasyona karşı negatif süpersarmal DNA'dan daha dirençlidir. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynamaktadırlar (İnan 2011).

2. Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini koruyarak kararlı halde kalabilmektedirler. Proteinin termal kararlılığı hem bilim hem de endüstriyel alanlarda çok önemli olmasına rağmen, yıllardır yapılan deneysel ve teorik çalışmalar proteinin termal kararlılığını sadece kısmen açıklayabilmiştir. Termofillerin ve mezofillerin homolog proteinlerinin tersiyer yapıları ve dizi analizlerinin karşılaştırılması çalışmaların temellerini oluşturmaktadır. Birçok araştırmacının üzerinde durduğu, proteinlerin termal kararlılığını arttıran nedenler arasında; tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemeler sayılabilmektedir (İnan 2011).

Yapılan çalışmalar, termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısının mezofilik proteinlere oranla %70 daha fazla olduğunu, bunun da tuz köprü sayısı ile proteinin termal kararlılığı arasında ki güçlü bir korelasyon sonucu gerçekleştiğini göstermektedir. Çünkü tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda daha karardır ve bu sıcaklık değerlerindeki tuz köprülerini kırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Böylelikle tuz köprülerinin yüksek sıcaklıklarda protein çözülmesine karşı kinetik kararlılık sağladığı bilinmektedir (İnan 2011).

Proteinlerdeki termal kararlılığın oluşmasında aminoasit değişimleri de rol oynamaktadır. Termofilik proteinlerin yüklü aminoasit (Arg, Lys, His, Asp ve Glu) ile valin ve izolösin içeriğinde artış görülürken; yüklenmiş polar aminoasit (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) içeriğinde ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Proteinlerdeki hidrofobik etki proteinin katlanmasında etkin bir güce sahiptir ve bu nedenle termofilik proteinler mezofilik proteinlere göre daha büyük hidrofobik merkeze sahiptirler. Termofilik proteini mezofilik proteinden ayıran başka bir yön de daha fazla halka delesyonuna maruz kalması ve bu yüzden termofilik proteinin daha kısa olmasıdır. Proteindeki halka delesyonu proteinin kararlılığını artırır ve termofilik proteinler üç boyutlu yapısına katlanırken daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturarak daha etkili bir katlanma sağlamaktadır (İnan 2011).

3. Hücre membran yapısı: Normal sıcaklıklarda yaşayan canlılar çift tabakalı lipid yapısında hücre membranına sahipken, hipertermofiller ise tek tabakalı lipid yapısında değişik bir hücre membranına sahiptirler. Bu membran sayesinde yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç göstermektedirler. Termofilik organizmaların hücre membran proteinlerinin en önemli özelliği daha etkili ve sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlayan aminoasitlere sahip olmasıdır. Aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirken, glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteinin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlar (İnan 2011).

4. RNA Yapısı: Baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişimlerin RNA'ları kararlı hale getirdiği bilinmektedir. rRNA'ların GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. *Thermus thermophilus* adlı bakteride yapılan çalışmada tRNA'sında ki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuş ve bakterinin transfer RNA geninin bir bazında ki tek bir atomunun değişmesiyle ısıya daha dirençli hale geldiği bildirilmiştir (İnan 2011).

5. Küçük Moleküller: Termofillerin sahip olması gereken özelliklerden biri de küçük moleküllerin kararlı olmasıdır. ATP, UTP, GTP, NAD, FAD gibi küçük moleküller ısıya dirençli değildirler, örneğin GTP'nin 100°C'de yarılanma ömrü birkaç saniyedir. Termofilik bakteriler bu sorunu ihtiyaç duyulan molekülleri kullanacakları zaman sentezleyerek üstesinden gelmektedirler (İnan 2011).

### **1.3. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Organizmaların Önemi**

Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olmanın yanı sıra yüksek asidik ve alkali ortamların denaturasyonuna karşı da dirençlidir. Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknolojik açıdan önem taşımaktadır ve araştırmacılar tarafından oldukça cezbedici bir konu olmaktadır. Biyoteknolojik olarak termofiliklerin en önemli özellikleri, termofilik enzim üretme potansiyelleridir.

Termofilik enzimlerin, pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı kararlı olması bu enzimleri endüstride tercih edilir kılmaktadır. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofildir. Bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, mezofillerden elde edilen enzimlere göre daha stabil olduklarından ticari ürünlerin ve özellikle de besinlerin raf ömrünün uzatılmasında kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve viskozitesinin azalması, özellikle büyük fermentörlerde havalandırma için daha az enerjinin kullanılmasına neden olmaktadır ve daha fazla ürün oluşumunu sağlamaktadır (İnan 2011)

Termofilik enzimler bahsedilen avantajlardan dolayı endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadırlar. Bu enzimlerden bazıları klonlanarak mezofilik konaklarda eksprese edilmektedir. Bu enzimlere örnek olarak DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar,

kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar, gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilmektedir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimyasal endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

#### **1.4. Termofilik Bakterilerin Tanılanması**

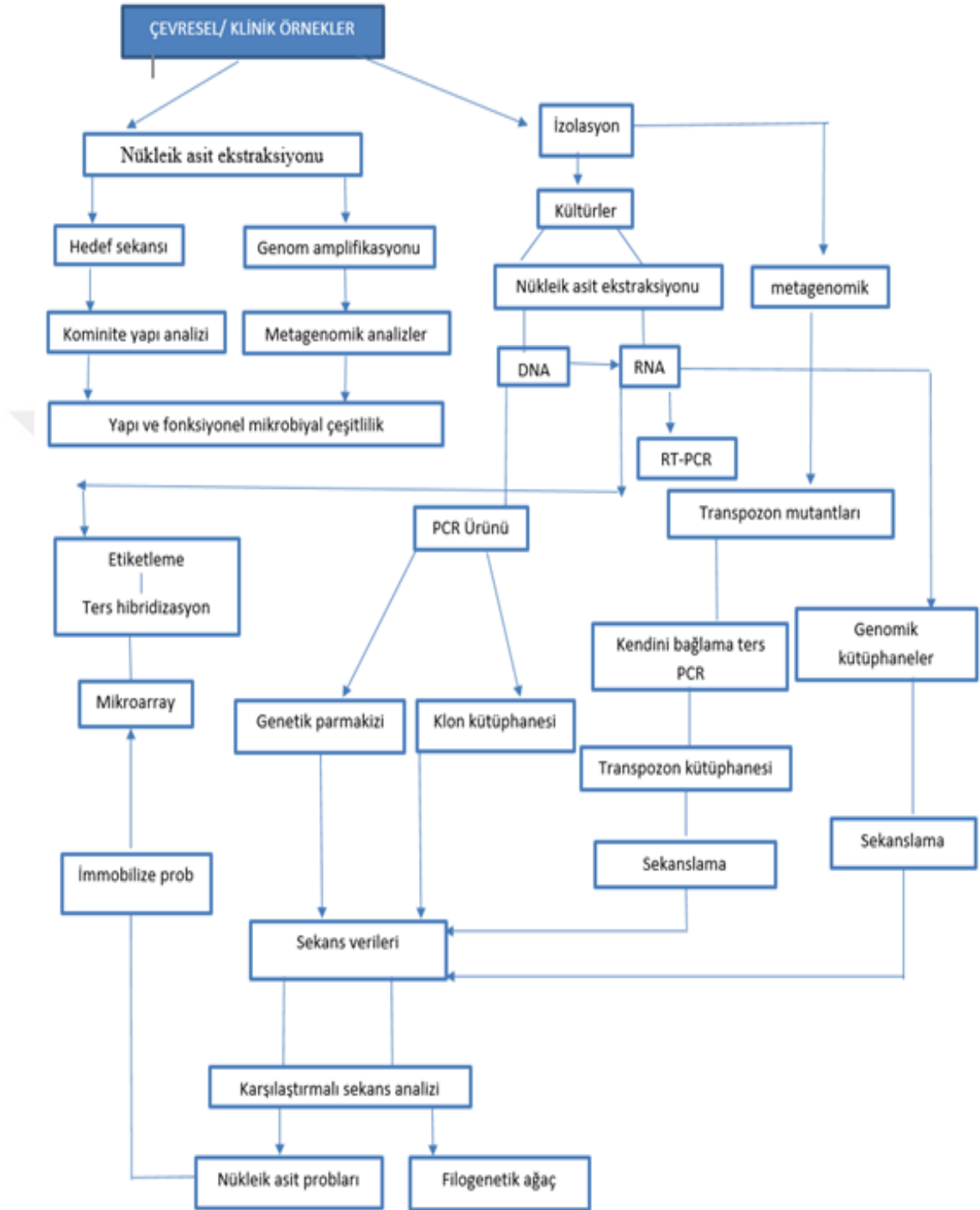
Taksonomi, sistematik kelimesiyle eş anlamlı kullanılmasına rağmen birbirinden farklı iki biyolojik terimdir. Sistematik; organizmaları düzenli biçimde karakterize edip sıraya koyan bilimsel bir çalışmayken, taksonomi; sınıflandırma, isimlendirme ve tanılamayı kapsayan üç alt birimden oluşmaktadır. Sistematik ilk olarak organizmaları benzerlik veya farklılıklarına göre taksonomik gruplara ayırıp sistematik bir düzen oluşturmaktadır. İki takson arasındaki akrabalık ilişkilerini göstermek için en kısa ve mantıklı yol olan sınıflandırma, sabit bir isimlendirme ve güvenilir bir tanımlama için ön koşul olup, genellikle tanımlama ile karıştırılmaktadır. Bu yüzden taksonominin iki bileşenin de dikkatlice ele alınması gerektiği bilinmektedir. Bunlardan ilki, türlerin veya temel taksonomik birimlerin kimliklendirilmesi, ikinci olarak da bu birimleri sıralayıp kataloglamak için uygun bir ilerleyişin planlamasıdır. İkinci adım olan isimlendirme, taksonomik bir hiyerarşinin oluşturulmasında kullanılan terimlerden ve kurallardan oluşmaktadır ve isimlendirilmenin doğru şekilde yapılması için International Nomenclature of Bacteria'da değinilen uluslararası kurallar ve tanımlanan isimler kullanılmaktadır (Baltacı 2015).

Bakterilerin geleneksel olarak morfolojik, metabolik ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılması farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede yetersiz kalmaktadır. Nükleik asitlerin dizi analiz verilerini temel alan mikrobiyal sistematığın filogeniye girişiyle mikroorganizmalar evrimsel özelliklerine göre sınıflandırılabilmiştir. Klasik testlerin uzun süreli deneyleri, fazla iş gücü gerektirmesi, tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyması, ekonomik olmaması ve alınan sonuçların yoruma açık olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Klasik yöntemlerin bu tür dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla mikroorganizmaların tanısında moleküler

yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde karbonhidratlar, lipitler, proteinler, DNA ve RNA çalışma materyali (Şekil 1.4) olarak kabul edilir ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımıyla mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir (Adıgüzel 2006).







**Şekil 1.4.** Çevresel örneklerden bakterilerin genotipik identifikasyonu ile ilgili moleküler yaklaşımlar (Das *et al.* 2014)

## 1.5. Tanılamada Kullanılan Başlıca Genotipik Yöntemler

### 1.5.1. 16S rRNA analizi

Bakteri sistematğinde kullanılan genotipik yöntemlerden gen dizileme analizi geçmiş yıllardan beri kullanılmaktadır. Gen dizilemede odak nokta, seçilecek olan hedef genidir. Dizi analizi için kullanılacak hedef genlerin belirli özelliklere sahip olması gerekir. Örneğin; Hedef genin fonksiyonu evrim boyunca değişmemiş olmalıdır, tüm bakteriler için korunmuş olan bölgeyi içermeli ve içerdiği korunmuş bölgeyi çevreleyen değişken bölgeler bulundurmaldır. Yapılan çalışmalarda bu amaçla araştırılmış korunmuş bölgelerin; 5S, 16S ve 23S rRNA'yı şifreleyen genlerden oluştuğu belirlenmektedir. Bu gen bölgeleri içerisinde bakteri sistematği için en önemli olan gen bölgesi 16S rRNA gen bölgesidir. Sistemik içerisinde bu gen bölgesi yalnızca bakteriler arasında değil aynı zamanda arkelerin 16S ve ökaryotların 18S rRNA gen bölgeleri ile de karşılaştırılabilmektedir (Arslan 2017).

Bakteri genomundaki 16S rRNA bölgeleri heterojen yapıdadır yani değişen ve değişmeyen bölgeler bulundurmaktadır. Bakterilerin tür bazındaki teşhisinde her bakteri genomunda kendine özgü olan değişken bölgeler kullanılmaktadır. 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen korunmuş bölge ve 9 adet değişken bölgenin bulunduğu tespit edilmiştir. Korunmuş bölgeler primer çoğaltma teknikleri için büyük ölçüde uygulanabilir başlangıç bölgeleri sağlarken, benzersiz değişken bölgeler de bakteriler arası filogenetik ilişkiyi belirlemede kullanılmaktadır.

16S rRNA gen bölgesi korunmuş bölge olma özelliğinden dolayı hücresel fonksiyonlar için oldukça önemlidir ve bu bölgede meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon kolaylıkla tolere edilebilmektedir. 16S rRNA geni bölgesindeki değişim tam olarak açıklanmasa da organizmalar arasındaki bağlantıyı (benzerlik ve farklılığı) net bir şekilde ortaya konulmuştur (Arslan 2017). 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık 1550 bp nükleotidden oluşmakta olup, bakteri sistematği açısından oldukça önemli bir yere sahiptir (Adıgüzel 2006).

16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyal izolatların tanımlanmasında ve yeni suşların literatüre kazandırılmasında kilit noktadır ve 16S rRNA gen dizileri ile yapılan sınıflandırma, fenotipik tiplendirmeye dayalı sınıflandırmadan çok daha objektif ve güvenilir bir sınıflandırmadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan geleneksel yöntemlerde (Gram boyama ve biyokimyasal testler) test sonuçları kültür koşullarından ve büyüme karakteristiklerinden etkilenmektedir. izolatlarının tanımlanması; Mikrobiyoloji laboratuvarlarında anormal fenotipik profil gösteren, nadir görülen, geç büyüyen ya da kültürü yapılamayan bakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesi oldukça önemlidir. Bu bölge evrensel primerlerle (Çizelge 1.1) çoğaltıldıktan sonra, sekans analizine tabi tutulur ve uygun programlarla analiz edilir (Baltacı 2015).

**Çizelge 1.1.** 16S rRNA dizi analizinde kullanılan primerler

İSİM	DİZİ (5'-3')	LOKALİZASYON
27f	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	8-27
355f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338-355
338r	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355
533f	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	515-533
515r	TTACCGCGGCKGCTGGCAC	515-533
556r	CTTTACGCCCARTRA WTCCG	556-575
806f	ATTAGATACCTGGTAGTCC	787-806
787r	GGAGTACCAGGGTATCTAAT	787-806
926f	AAACTYAAAKGAATTGACCG	907-926
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	907-926
930f	AAACTYAAAKGAATTGACGG	911-930
911r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	911-930
1194f	GAGGAAGGTTGGGGATGACGT	1175-1194
1175r	ACGTCATCCCAACCTTCCTC	1175-1194
1371r	AGGCCCGGGAACGTATTCAC	1390-1371
1391r	TGACGGGCGGTGWGTRCA	1391-1408
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	1492-1510
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	1525-1541

### 1.5.2. RFLP-PCR

Sistematikte kullanılan RFLP-PCR yöntemi oldukça hızlı ve avantajlı bir yöntemdir, bu yöntemdeki esas unsur restriksiyon enzimleridir. Yöntemin uygulamasında seçilen hedef bölgeler öncelikle spesifik primerlerle çoğaltılır ve ardından yine spesifik restriksiyon enzimleriyle kesilmektedir. Restriksiyon enzimleri (RE), kısa DNA dizilerini spesifik olarak tanıyan ve bu dizileri yakın kısımlarından veya içlerindeki özgül bölgelerden kesen enzimlerdir. Bu enzimler, bakteri ve arkelerde bulunmaktadır. Sıklıkla kullanılan restriksiyon enzimleri arasında; *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* gösterilmektedir.

Restriksiyon enzimlerinin isimleri, enzimlerin orijinleri hakkında bilgi verirken, kestikleri dizilimler hakkında herhangi bir veri sağlamamaktadır. DNA'nın bu enzimlerden biri ya da birkaçıyla kesilmesinden sonra, jelde ayırım yapılarak bilinen izolatlarla örnek suşların profilleri karşılaştırılır (Baltacı 2015).

RFLP-PCR yöntemiyle; genom haritalama, türlerin varyasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğin farkları kapsamlı bir şekilde ortaya konulmaktadır (Arslan 2017).

### 1.5.3. Genomik parmak izi analizi

Tüm organizmaların genomlarında tekrarlayan diziler yer almaktadır. Ökaryotik genomlarda DNA sekans organizasyonu, çok sayıda tekrarın (tek-kopya sekanslardan oluşan) aralıklı olarak dağılmasıyla oluşmaktadır. İnsan genomunun ( $3 \times 10^9$  baz çifti=bç) %3-6'sını Alu (300 bç) tekrar dizileri oluşturmaktadır ve bu diziler haploid genom başına 300.000 kopya içerir. Prokaryotik genomlarda da insersiyon sekansları, rRNA operonları, tRNA genleri gibi düşük kopya sayılı tekrar sekansları bulunmaktadır. Bu sekanslar, kromozomal delesyon, duplikasyon ve inversiyon gibi DNA'nın yeniden yapılanma sürecinde genomik yapıya önemli katkı sağlamaktadır (Baltacı 2015).

Genom üzerinde, sayısı ve yeri türden türe farklılık gösteren çok sayıda tekrar dizileri bulunmaktadır. Tekrarlı diziler bakteri DNA sında da yer almaktadır ve bu bölgeler bakteri sistematiginde kullanılmaktadır. Çünkü tekrarlı diziler korunmuş yapıya sahiplerdir. Bakteri sistematigi içerisinde bu elementler şu şekilde kullanılmaktadır; genom içerisinde bulunan tekrar dizileri PCR ile amplifiye edilmekte ve daha sonra elde edilen spesifik bantlar birbirleri ile kıyaslanarak sistematik bilimi içerisinde tiplendirme amacıyla kullanılmaktadır.

Bakteri genomu içerisinde korunmuş ve tekrarlayan DNA dizileri; REP ( $\square$ 35-40 bç), ERIC ( $\square$  124-127 bç), BOX ( $\square$  154 bç) ve (GTG)<sub>5</sub>'den oluşmaktadır. Özellikle bu bölgeler amplifiye edilerek organizmalar tür ve tür altı düzeyde tanılanmaktadır. Yapılan çalışmalar; REP ve ERIC PCR yönteminin uygulanabilirliğinin daha kolay olduğunu, çok sayıda izolatin ayırımında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Arslan 2017).

#### **1.5.4. Filogenetik analiz**

Türlerin evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılmakta ve filogenetik ağaç, bu tarihin grafiksel bir özeti olarak kabul edilmektedir. Bu ağaç hangi organizma veya organizmaların birbirine daha yakın, hangilerinin ise uzak olduğunu kanıtlamaktadır. Filogenetik analizlerde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Baltacı 2015):

**NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) Yöntemi:** Genetik mesafe matrisinden faydalanarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntemdir ve filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul etmektedir. Bu sebeple OTU (Operational Taxonomic Units; Üzerinde çalışılan taksonomik birimler)'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanmasına olanak sağlamaktadır (Baltacı 2015).

**UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages; Aritmetik ortalamaları kullanan ağırlıksız eş-grup yöntemi) Yöntemi:** OTU'lar arasındaki

benzerlik algoritmasına dayalı bir gruplama yöntemidir. Bu yöntemde genetik benzerliği en yakın olan iki OTU'dan başlayıp adım adım en uzak genetik benzerlik gösterene kadar tüm üniteler birleştirilerek topolojiye dahil edilir. Yöntem, filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının sabit olduğunu kabul eder ve dalların köklerini esas alarak kümeleme yapmaktadır (Baltacı 2015).

**Maksimum-parsinomi (tutumluluk) Metodu:** Muhtemel ağaç topolojileri içinde en parsinomik ağacı bulmak için kullanılmaktadır. En parsinomik olan ise tüm değişim sayısının en az olduğu ağaçtır ve evrimsel olarak en yakın çıkarsamayı vermektedir (Baltacı 2015).

**Seç-bağla (Bootstrapping) Testi:** Ağaçların güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılan yaklaşımlardan biridir ve bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturmaktadır. Çalışmada kullanılan dizinin baz çifti kadar yeni bir dizi oluşturmak için bu pozisyonlardan birini rastgele seçmeyle başlar. Genellikle bunu yeni dizinin ilk ögesi yapar ve seç bağla testine başlar. Sonra rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur ve bu ekleme orijinal verinin boyutu elde edilene kadar devam eder. Daha sonra yeni veri seti filogeni hesaplamak için kullanılır. Yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belirli bir dalın ortaya çıkma yüzdesi hesaplanır. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, o dalın gerçekte var olduğuna dair güven artmaktadır. Seç-bağla testi, belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir (Baltacı 2015).

Bu ağaçlar oldukça karmaşık yöntemlerle elde edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ve tez çalışmasında tercih edilen filogenetik ağaç yöntemi: NJ yöntemidir. Bu yöntem; organizmalar arasındaki genetik mesafe matrisini temel alarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntemdir ve NJ'de filogenetik ağaç boyunca mutasyon hızı farklıdır. Bundan dolayı OTU'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanması bu yöntemde mümkün olmaktadır. Filogeni genel olarak 3 başlıkta toplanmaktadır;

**1.Bilgisayar destekli filogeni:** Bilgisayar algoritmaları, metotları ve programları filogenetik analizlere uygulanmaktadır.

**2.Geleneksel filogeni:** Organizmaların fenotipik özellikleri ölçülmekte ve miktarları belirlenerek morfolojik bilgilere dayandırılmaktadır.

**3.Moleküler filogeni:** Organizmanın genlerini kodlayan nükleotid dizilerini ya da proteinlerini kodlayan aminoasit dizileri sınıflandırılmaktadır (Arslan 2017).

## 1.6. Enzimler

Enzimler, metabolizmanın gerçekleştirilmesi gerektiği her türlü reaksiyonu hızlandıran ve protein yapısında bulunan katalizörlerdir. Genetik materyalin sentezinde veya tamirinde, elektron taşıma sisteminde, apoptozis gibi çeşitli metabolik olaylarda görev alırlar ve görev aldıkları tepkimelere spesifiktirler (Sarı 2016).

Enzimler hakkındaki önemli bilgileri kronolojik olarak şu şekilde sıralayabiliriz:

1570'li yıllarda Pasteur ve Liebig gibi birçok ünlü araştırmacı tarafından enzimler hakkında ilk bilgiler sağlanmıştır.

1838 yılında Alman kimyacı Berzelius tarafından reaksiyon hızı üzerine etki yapan maddelere “katalizör” adı verilmiştir. Yine aynı yılda Gagnard ve Schav adlı iki kaşif birbirinden habersiz olarak fermantasyon olayını incelemiş ve bu olaya maya adı verilen bazı mikroorganizmaların sebep olduğunu açıklamışlardır.

1879 yılında Kühne, biyolojik reaksiyon hızlarına etki eden maddeleri ayırt etmek için Yunanca mayada bulunan anlamına gelen “enzim” kelimesini önermiştir.

1883 yılında Poyen ve Perşon nişastanın çözümlenmesinde malt özütünde bulunan diastaz enziminin etkili olduğunu belirlemişlerdir.

1885 yılında Blumenthal, peynir yapımında kullanılmak için ilk kez rennin enziminin özütünü teknolojik boyutlarda üretmeyi başarmıştır.

1897 yılında Büchner, maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başararak, yeni bir araştırma alanı açmıştır.

1915 yılında Rahm, lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılarak, çok etken bir temizleyici olarak kullanılabilmesini göstermiştir.

1926 yılında James B. Summer, ilk kez üreaz enziminin kristallerini elde ederek, molekülün büyük bir kısmının protein olduğunu göstermiştir.

1930 yılında Northrop, Kuintz, Herriott ve Amson gibi bilim adamları grubu sırası ile pepsin, tripsin, kimotripsin ve karboksipeptinaz enzimlerini kristalize etmeyi başarmışlardır.

1930 yıllarında 80 adet enzim tanınırken, 1968'lerde bu rakam 1300'e 1982'de 2000'e yükselmiştir. Günümüzde ise 2500'den fazla enzimin var olduğu bilinmektedir ve yine enzimlerle ilgili çalışmalar sürekli artarak devam etmektedir. Enzimler görev aldıkları reaksiyonlara göre 6 gruba ayrılmaktadır (Alçiçek 2018);

1. *Oksidoredüktazlar*: Oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerinde görev alan enzimler olup, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler.
2. *Transferazlar*: Alıcı ve verici iki molekül arasında hidrojen hariç açıl gibi grupların taşınmasından sorumlu enzim ailesidir. Fonksiyonel bir grubun bir molekülden diğer bir moleküle transferini katalizlerler.



3. *Hidrolazlar*: Moleküllerin sulu ortamda ayrı bileşiklere ayrılmasından sorumludurlar. Eter, peptid, ester gibi bağların yıkımlarında hidrolazlar görev alır. Moleküle su molekülünü dahil ederek bağ kırarlar.
4. *Liyazlar*: C-C, C-O, C-S, C-N gibi bağların oluşumunu hidrolitik olmayan yoldan gerçekleştirir. Çift bağ yapar veya kırarlar.
5. *İzomerazlar*: Moleküllerin birbiri içlerinde izomerlerine dönüşmelerini katalizleyen enzim grubudur. Molekülleri izomerlerine çevirmektedirler.
6. *Ligazlar*: ATP gibi bünyesinden fosfat koparılması ile enerji sağlayan yapılarla beraber moleküller arası bağ oluşumunu sağlarlar. İki molekül arasında bağ oluşumunu katalizlemektedirler.

Enzimlerin çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır (Çizelge 1.2). Teknik kullanım, besin üretimi, hayvansal yem üretimi, kozmetik medikal gibi pek çok alanda uygulama alanına sahiptir. Günümüzde 200'ü mikrobiyal kaynaklı olmak üzere, toplam 4000 enzim ticari olarak kullanılmaktadır (Alçıçek 2018).

**Çizelge 1.2.** Bazı enzimler ve onların kullanım alanları

Endüstrilerin Tipleri	Enzimler	Kullanım Alanları
<b>Alkol/İçecekler</b>	Amilaz,glukanazlar, proteazlar, beta-glukanazlar, arabinoksilanlar, amiloglükosidaz, pullulanazlar ve asetolaktat dekarboksilaz	Polikarbonatların ve nişastanın basit şekerlere yıkımında, kompleks proteinleri şekere indirgeyerek fermantasyon verimliliğini arttırmada düşük kalorili bira üretiminde kullanılmaktadırlar.

Çizelge 1.2. (devam)

<b>Meyve Suları</b>	Sellulazlar, pektinazlar	Meyve sularını temizlemede kullanılmaktadırlar.
<b>Bebek Yiyecekleri</b>	Tripsin	Bebek yiyeceklerinin ön sindiriminde kullanılmaktadırlar.
<b>Yiyecek İşleme</b>	Amilaz, proteaz ve papain	Etin yumuşatılmasında, nişasta ve kompleks proteinlerin yıkımında kullanılmaktadır.
<b>Süt Ürünleri</b>	Rennin, lipazlar ve laktazlar	Proteinlerin hidrolize edilmesinde, peynir üretiminde, Laktozdan glukoz üretiminde kullanılmaktadır.
<b>Deterjan</b>	Proteaz, amilaz, lipaz, selülazlar, ve mannanaz	Boyama sonrası proteini çıkarmada, bulaşık yıkarken çözünmez nişastayı çıkarmada, yağların çıkarılmasında ve deterjanların etkinliğini artırılmasında kullanılmaktadır.
<b>Tekstil</b>	Amilaz, pektinaz, selülazlar, katalaz ve proteaz	Nişasta kalıntılarını gidermede, fiber çekirdek ve mumları yapıştırmada, kotlardaki dokumayı tamamlamada, pamuğun beyazlatılmasından sonra kalıntı hidrojen peroksiti yıkımda, yün bakımında, aynı zamanda biyolojik parlatma olarak da bilinen ham ipeğin zamklamasında kullanılmaktadır.

Çizelge 1.2. (devam)

<b>Kağıt ve Kağıt Hamuru</b>	Amilaz, ksilenaz, selülaz, hemiselülaz, ligninaz, ve esteraz	Daha az viskoziteli nişastayı yıkmada, boyutunu ayarlama, kağıt kaplama ve mürekkebini gidermede kullanılırlar. Ksilenazlar dekolorize etmek için gerekli ağartıcı selülaz ve hemiselülazlar fiberleri düzleştirmede, su drenajını sağlamada, mürekkep çıkarmada kullanılırlar. Lipazlar zifti azaltmada kullanılırlar. Lignin-yıkan enzimler kağıdı yumuşatmak için lignini çıkarmada kullanılırlar.
<b>Lastik</b>	Katalaz	Lateksi köpüklü lastiğe çevirmede ve peroksiten oksijen üretiminde kullanılmaktadır.
<b>Yağ ve Petrol</b>	Sellulazlar, ligninazlar ve mannazlar	Yağ sondajında jel kırıcı oluşturmada kullanılmaktadır.
<b>Biyopolimer / Plastik</b>	Lakkazlar, peroksidazlar, lipazlar ve transglütaminazların	Polimerizasyon işlemi açısından in-situ materyaller üretmek için biyopolimerlerin arasında çapraz bağlar oluşturmada kullanılmaktadır.
<b>Farmasötik</b>	Nitril hidrataz, D-amino asit oksidaz, glutarik asit asilaz, penisilin asilaz, penisilin G asilaz, amonyak liyaz ve humulin	Biyosentetik insan insulini, aspartamat için ara maddeler, semisentetik antibiyotikler, suda çözünen ara maddeler üretmede kullanılmaktadır.

**Çizelge 1.2.** (devam)

<b>Moleküler Biyoloji</b>	Restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimeraz	Genetik mühendisliğinde DNA'yı manipule etmede kullanılırlar. Adli bilimler, polimeraz zincir reaksiyonları ve DNA'nın hidrolizi için gereklidir.
---------------------------	--	---

### 1.7. Termostabil Enzimler

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü hayvansal ve bitkisel kökenli enzimlere göre mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktiviteleri daha yüksektir, istenmeyen yan ürün oluşturmazlar, daha stabil ve ucuzdurlar, fazla miktarda izole edilebilmektedirler ve yüksek sıcaklıklarda kullanılabilirliklerinden bakteriyel ve viral kontaminasyonlara da kapalıdır (Gül 2011).

Termostabil enzimlerden bahsetmeden önce degradasyon ve enzim stabilitesinden bahsetmede fayda vardır. Sıcaklık ile enzim inaktivasyonu; uygun şeklin (enzimin kuarternal yapısının) çözülmesi (denatürasyon) ve kovalent bağların geri dönüşümsüz olarak koparılması (degradasyon) ile olmaktadır ve denatürasyonda proteinin yapısını stabilize eden non-kovalent güçlerin koparılması, proteinin şeklinin geri dönüşümlü olarak bozulmasına neden olmaktadır. Bu, genellikle geri dönüşümsüz olan bir agregasyon basamağı ile takip edilir. Yüksek sıcaklıklarda (>100°C) peptid bağlarının hidrolizi ve deaminasyon gibi geri dönüşümsüz prosesler önem kazanmaktadır. Degradasyonda sorumlu olan bazı reaksiyonlar polipeptid zincirden oluşan iskeletin esnekliğine ve amino asitlerin sırasına (düzenine) bağlıdır. Yapılan çalışmalar, uygun koşullar altında bazı enzimlerin yarılanma ömrünün 125°C'de 10 dakikadan daha fazla olduğunu göstermektedir (Sarigül 2007).

Endüstriyel alanda, enzimatik ve biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılan termofilik enzimlerin avantajları:

1. Termofilik organizmalardan elde edilen enzimler, termostabil özelliğe sahip olduklarından raf ömürleri uzundur.
2. Termofilik enzimler organik çözücülere, yüksek ve düşük pH'ya karşı gösterdikleri direnç mekanizmasıyla, denatüre edici ajanlara karşı dirençlidirler.
3. Uygun olmayan şartlarda saflaştırılabildiklerinden, genel bir direnç mekanizmasına sahiptirler.
4. Viskoziteyi ve çözünürlüğü arttırırlar.
5. Patojenik mikroorganizmaların çoğu mezofilik olup, mezofiller de yüksek sıcaklıklarda gelişemediklerinden dolayı, enzimatik çalışmalarda mikrobiyal kontaminasyonun önü kesilmiş olur.
6. Termofilik enzimler, kararsız bileşiklerin biyokimyasal reaksiyonu engellemesini önlemektedir (Adıgüzel 2006).

Bununla beraber bazı dezavantajları da vardır, bunlar; büyük çapta fermentasyon proseslerinde ekstrem termofilik mikroorganizmaların kültüvasyonu oldukça zordur. Yüksek sıcaklık buharlaşmayı arttırır bu da su aktivitesindeki düşmeye bağlı olarak ciddi kayıplara neden olmaktadır. Barotermofiller gibi mikroorganizmalar, gelişimleri için ekstra ekipmanlara ihtiyaç duymaktadırlar (Sarigül 2007).

### **1.8. Endüstriyel Öneme Sahip Termofilik Enzimler**

Endüstriyel açıdan önemli olan ve bu tez kapsamında incelenen termofilik enzimler aşağıda verilmiştir.

### 1.8.1. Proteazlar

Proteazlar tüm canlılarda bulunan büyüme ve çoğalma için gerekli olan bir enzimdir. Vücuttaki bütün proteinlerin yaklaşık %2 sini oluşturmaktadırlar. Proteazlar, proteinleri parçalayarak hücre çoğalması, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, doku yenilenmesi, hücre ölümü, hemostasis (koagülasyon), immün yanıt ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerin kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar (Alçıçek 2017).

Proteazlar etki ettikleri peptit bağına göre endoproteaz ve ekzoproteaz olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar, substratın amino (N) ya da karboksi (C) uçlarındaki peptit bağlarını hidrolize etmektedir. Etki ettikleri N ya da C ucuna göre aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak adlandırılmaktadırlar. Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin serbest amino ucunda etkilidir ve bir aminoasit, bir dipeptit ya da bir tripeptit serbest bırakırken; karboksipeptidazlar, polipeptit zincirinin karboksi uçlarında etkilidir ve bir aminoasit ya da bir dipeptit serbest bırakılmaktadırlar. Endopeptidazlar ise substratın iç kısımlarındaki peptit bağlarını hidrolize etmektedir (Aktaş 2012).

Proteazlar dünyadaki enzim piyasasının %60 ını oluşturmaktadırlar ve kullanım alanları çok geniştir; sıcaklığa dayanıklı proteazlar peptit üretiminde, deterjan endüstrisinde, deri işleme endüstrisinde ve polimeraz zincir reaksiyonundan önce DNA'nın temizlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca ultrafiltrasyon membranlarının temizlenmesinde, etin yumuşatılmasında ve röntgen filmlerindeki gümüşün geri kazanılmasında da kullanılmaktadır (Aktaş 2012).

### 1.8.2. Amilazlar

Nişasta çok sayıda glikoz molekülünün farklı açılarla bağlanması sonucu oluşmuş heterojen yapıdaki polisakkarittir ve amilazlar tarafından parçalanmaktadır. Amilazlar yüksek moleküler ağırlığa sahip amiloz (%15-25) ve amilopektin (%75-85) olmak üzere iki polimerden meydana gelmektedir. Amiloz, glikoz birimlerinin  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağla

oluşturduğu dallanmamış düz yapıdaki bir polimerken, amilopektin ise  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlara ek olarak  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları da içeren dallanmış yapıdaki bir polimerdir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen alfa-amilaz, beta-amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Akdaş 2012).

Amilazlar, enzim piyasasının %25'ini oluşturmaktadır. Nişastayı hidrolize eden amilazlar 4 gruba ayrılmaktadır bunlar; endoamilazlar, ekzoamilazlar, zincir koparan enzimler ve glikoziltransferazlar'dır (Akdaş 2012).

Nişasta endüstrisi termofilik enzimlerin en fazla ihtiyaç duyulduğu alanlardan biridir. Endüstriyel nişasta işlemi, nişastanın glukoz, maltoz yada oligosakkarit şuruplarına hidrolizini içermektedir. Nişastanın tam hidrolizi için birçok enzime ihtiyaç duyulmaktadır, bu enzimler; amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glikoamilazlar ve glukoz izomerazlardır. Bu enzimler ve bu enzimleri içeren şuruplar nişastanın işlenmesinin yanında içecek endüstrisinde, ekmek yapımında ve peynir yapımı gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca tatlandırıcı üretiminde ve birçok gıda ürününün koku, yapı ve görünüşünün değişime uğratılmasında da bu enzimler yaygın olarak kullanılmaktadırlar (İnan 2011).

Amilazlar, fungal ve bakteriyal kaynaklı olabilmektedir. Bakteriyal amilazlar, fungal amilazlardan daha çok termostabil olduklarından, en fazla bakteriyal kökenli amilazlar tercih edilmekte olup, bunlar içerisinde de en fazla *Bacillus* cinsinin üyeleri çalışılmaktadır (Gül 2011).

### **1.8.3. Lipazlar**

Lipazlar, suda çözünmeyen trigliseritleri, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole parçalayan enzimlerdir. Lipazlar, enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1), triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar. Lipazlar yağ

asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik göstermektedirler (Gül 2011).

Termofilik lipazlar, organik çözücülere, endüstriyel ve kimyasal proseslerdeki yüksek reaksiyon sıcaklıklarına ve kimyasal denatüranlara karşı yüksek aktivite ve termostabilite göstermektedir. Lipazların bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları katalizlemeleri organik sentez tasarımlarında zor olan özel bileşikler üretmeleri, ester bağına spesifik olmaları, yan ürün oluşumunu önlemeleri, hidrolitik reaksiyonları katalizlerken kofaktöre ihtiyaç duymamaları, organik çözücülerde aktifliklerini korumaları gibi avantajlarından dolayı endüstride birçok kullanım alanı bulmuştur (Tarakçıoğlu 2016).

Termofilik lipaz üreten bakteriler arasında; *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenletus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Geobacillus sp*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Thermus thermophilus* ve *Thermus sp.* türleri bulunmaktadır (Akdaş 2012).

#### 1.8.4. Selülazlar

Dünya üzerinde en fazla bulunan yenilenebilir fosilsiz karbon kaynağı, selülozdur. Selülozun hidrolizini endoglukanazlar, ekzoglukanazlar ve  $\beta$ -glukosidazlar sağlamaktadır. Endüstriyel işlemlerde termal kararlı olan selülitik enzimler, tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca deterjanların yapısına katılarak, yıkama sonucunda çamaşırların yumuşak ve daha parlak renkte olmasını sağlamaktadır. Selüloz organik bir polimerdir ve glikoz birimlerinin  $\beta$ -1-4 glikozidik bağlar ile birleşmesiyle meydana gelmektedir (İnan 2011).

Yüksek sıcaklığa dayanıklı selülazlar, jeotermal kaynakların yanında birçok alandan izole edilen termofilik bakteriler tarafından üretilmektedir. Selülaz üreten bakteriler arasında *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*



*Thermotoga* sp. türleri yer almaktadır. Termostabil selülozlar; tekstil de kotların biyolojik olarak taşlanması, deterjan endüstrisinde katkı maddesi olarak, kağıt endüstrisinde kağıt hamurunun beyazlatılmasında, yemlerin besin değerinin ve sindirilebilirliğinin artırılması, gıda endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılmasında ve alkol üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Akdaş 2012).

### 1.8.5. Ksilanazlar

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi en hızlı gelişen endüstrilerden biridir. Bu alanda, klorlu bileşiklerin yerini termal kararlı ksilanazların kullanımı almaktadır. Kraft kâğıt hamurunun ağartılmasında çok fazla miktarda tüketilen klorlu bileşikler, toksik ve mutajenik olan yan ürünleri oluşturmaktadırlar. Bu yan ürünler de çevresel kirliliğe ve biyolojik sistemlerde sorunlara sebep olmaktadır. Günümüzde bu kimyasalların yerine kağıt endüstrisinde ksilanazlar kullanılmaktadır. Ksilanazlar, kâğıt endüstrisindeki kullanımlarının yanında, hayvan yemlerinin besin değerinin artırılmasında, hasır ve keten gibi bitki elyaf zambının giderilmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında ve un kalitesinden kaynaklanan problemlerin giderilmesinde kullanılmaktadır (İnan 2011).

Ksilan, hemiselülozun başlıca bileşenidir ve hemiselülozlar doğada toplam biyokütlenin %30-35'ini oluşturmaktadır. Ksilan yenilenebilen bir kaynaktır ve bu kaynaktan gıda, yem sanayi, kağıt sanayi ve atık arıtım sanayisi yararlanmaktadır. Ksilanın tüm bu sanayilerdeki işleme ve değerlendirme basamaklarında enzimatik hidrolizi ön plana çıkmaktadır ve enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzim ise  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşan iskeleti hidrolizleyen endo-1,4-  $\beta$  ksilanazlar (1,4- $\beta$ -D-ksilan ksilanohidrolaz) (EC 3.2.1.8) dir. Ksilanaz enzimi bakteri, maya ve fungus grubunda bulunan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedir. Ksilanaz üretiminde kullanılan başlıca türler; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* ve *Thermoascus aurantiacus*'dir (Gül 2011).

### 1.8.6. Pektinazlar

Hayvan yemlerinde enzimlerin kullanılması günümüzdeki çiftlik sistemlerinde önemli bir role sahiptir. Enzimler, hayvanların sindirim sisteminde bulunan nişasta, protein ve yağları parçalayarak sindirimi kolaylaştırır. Yem de katkı maddesi olarak kullanılan proteaz, lipaz, amilaz, glukanaaz, selüloz, pektinaz gibi çeşitli enzimler mikrobiyal kökenlidir ve tek başına veya kombine olarak yemlere katılmak suretiyle kullanılmaktadır. Kullanılan enzimler, yemlerin sindirilme derecelerini ve yemlerin metabolik enerji değerlerini arttırarak, hayvanların yemden yararlanma oranlarında artışa sebep olurlar. Evlerde kullanılan ilk enzim olan pektinazlar, meyve ve tekstil sektöründe ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan son derece önemli bir endüstriyel enzimdir (Alçicek 2017).

Termostabil pektinazlar özellikle gıda endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Son yıllarda kağıt ya da pamuktan selüloz dışındaki bileşenlerin ayrılmasında kullanılabildiği de belirtilmektedir. Birçok mikroorganizmanın pektinaz enzim üretme potansiyelleri araştırmasına rağmen, termofilik mikroorganizmaların pektinaz enzimleri hakkında çok az çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklığa dayanıklı pektinazlar *Thermoanaerobacter italicus* ve *Thermotoga maritima* türlerinde tespit edilmiştir (Akdaş 2012).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Termofilik mikroorganizmalar ekstrem koşullara adapte olmuş, sıcaklık stabiliteleri yüksek canlılar olup, bu organizmalardan elde edilen enzim ve enzim sistemleri endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Bu özelliklerinden dolayı bilim insanlarının sürekli ilgisini üzerinde toplamaktadır. Termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve termostabil enzim üretme potansiyellerini konu alan son yıllarda yapılan önemli çalışmalardan bazıları şunlardır:

Beffa *et al.* (1996), *Thermus* cinsine ait termofilik bakteriyel türleri 65 - 82°C arasındaki termal ortamlardan izole etmiş, optimum üreme sıcaklıklarının 65-75°C olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra ileri tanı teknikleri olan DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA gen dizi analiz verilerini incelemiş, test suşlarının *Thermus thermophilus* HB8 türüne büyük oranda benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Pikuta *et al.* (2000), anaerobik, alkalifilik, fermentatif, spor oluşturan yeni bir termofilik bakteriyi, gübre örneklerinden izole etmişler ve izolatın; Gram pozitif, katalaz negatif, düz koloni, çubuk hücre morfolojisine sahip, hareketsiz, üreme sıcaklığı 37-66 °C (optimum 62°C) ve pH'sı 8.0-10,5 (optimum 9,5-9,7) olduğunu gözlemlemişlerdir. Bakterinin D-glukoz, sükröz, D-fruktoz, D-trehaloz ve nişasta karbon kaynaklarında ürediğini, vitaminlere gereksinim duyduğunu, maya ekstraktında ise fazla üreme gösterdiğini ve ana metabolik ürün olarak H<sub>2</sub> ve asetatı sentezlediklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca G+C oranının % 42.2 mol olduğunu, fenotipik özellikler, 16S rDNA gen dizi analizi verileri ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçları incelendiğinde, bu izolatın *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğunu belirlemişler ve *Anoxybacillus flavithermus* olarak isimlendirmişlerdir.

Hawumba and Brozel (2002), Kuzey Uganda'daki sıcak su kaynaklarından *Geobacillus* cinsi termofilik mikroorganizmalar izole etmiş ve bu mikroorganizmaların Gram pozitif,

aerobik, çubuk şeklinde hücre morfolojisine sahip, spor oluşturan, optimum üreme sıcaklık değerleri 60- 62°C, pH'larının ise 7,5-8,5 olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra 16S rRNA sekans analiz verilerini incelemişler ve bu organizmaların, *Geobacillus* cinsi bakterilere ait olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu bakterilerin endüstriyel açıdan önemli olan proteaz enzim aktivitesini araştırmışlar ve karakterizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir.

Beldüz *et al.* (2003), Balıkesir (Gönen Kaplıcası) ve Ağrı (Diyadin Kaplıcası) illerinde bulunan sıcak su kaplıcalarından çamur ve su örnekleri alarak izolasyon ve tanılama işlemini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta 7 tane termofilik *Anoxybacillus* cinsi bakteri elde etmişler ve bu izolatların 55-60°C arasında ürediğini, Gram ve endospor pozitif, fakültatif anaerob olduklarını, çubuk hücre morfolojisi gösterdiklerini, glukoz, nişasta, ksiloz ve mannitol gibi geniş karbon kaynaklarında iyi ürediklerini gözlemlemişlerdir.

Dulger *et al.* (2004), Rize (Ayder Kaplıcası) ve Çanakkale (Kestanbol Kaplıcası)'de bulunan sıcak su kaynaklarından iki adet termofilik basil izole etmişlerdir. Fenotipik ve genotipik analizler sonucunda ilgili izolatların çubuk hücre morfolojisine sahip, Gram ve endospor pozitif, fakültatif anaerob, optimum gelişme sıcaklıklarının 50-55 °C olduğunu tespit etmişlerdir. Bu türlerin, çeşitli karbon kaynaklarında (D-glukoz, D-raffinoz, D-sükroz, D-ksiloz, D-fruktoz, L-arabinoz, maltoz, D-mannoz, D-mannitol) üreyebildiklerini, 16S rRNA gen dizi analiz verilerini ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarını incelediklerinde ise bu türlerin *Anoxybacillus* cinsine ait yeni türler (*Anoxybacillus ayderensis* ve *Anoxybacillus kestanbolensis*) olduklarını belirlemişlerdir.

Adigüzel *et al.* (2009), Türkiye'deki farklı sıcak su kaynaklarından aldıkları su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu gerçekleştirmişler. Bu amaçla yapmış oldukları MIS (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi), rep-PCR ve 16S rRNA sonucunda elde ettikleri türlerin *Geobacillus*, *Anoxybacillus* ve *Bacillus* spp. türlerine ait olduklarını tespit etmişlerdir.

Poli *et al.* (2009), İtalya’da bulunan jeotermal alanlardan su ve çamur örneklerini alarak, termofilik bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu test suşlarının; aerobik, endospor ve Gram-pozitif, hareketli, çubuk hücre morfolojisine sahip, optimum 65°C ve pH 7.2 ’de üreme gösterdiğini tespit etmişlerdir. İleri tanı tekniği olarak gerçekleştirmiş oldukları 16S rRNA sekans dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda, *Anoxybacillus thermarum* sp.nov suşunu yeni tür olarak literatüre kazandırmışlardır.

Savas *et al.* (2009) Van Erciş’de bulunan Hasanabdal sıcak su kaplıcasından izole ettikleri termofilik bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu gerçekleştirmişler, 16S rRNA sekans analizi sonucunda, test izolatlarının 6’sının *Geobacillus pallidus* (yeni taksonomik ismi: *Aerobacillus pallidus*) türüne ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Lino *et al.* (2010) yapmış oldukları çalışmada, termofilik bir kemoheterotrof bakteri olan Mat9-16T izolatını Nagano-Japonya’da bulunan bir sıcak su kaynağından izole etmiş, fenotipik ve genotipik olarak karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta bu izolatın, Gram negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, çubuk hücre morfolojisine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. 16S rRNA sekans analiz verileri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda bu suşun %77-83 dizi benzerliği ile *Chlorobea* sınıfına ait bir yeşil sülfür bakterisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Asad *et al.* (2011), jeotermal su kaynaklarından elde ettikleri toplam 50 bakteri izolatını amilaz, lipaz, esteraz, selülaz ve  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretim potansiyelleri açısından değerlendirmişler ve *Bacillus* WA21 suşunun  $\alpha$ -amilaz enzimini üretme potansiyelinin yüksek olduğunu, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar için geniş bir kullanım alanı bulacağını ifade etmişlerdir.

Kumar *et al.* (2014), Manikaran kaplıcıklarından 235 izolat elde ederek, hem identifikasyonunu hem de endüstriyel enzim üretme potansiyellerini araştırmışlardır. Sonuçta bu izolatlar için en uygun gelişme sıcaklığının 40-70°C olduğunu, 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu suşların büyük bölümünün *Firmicutes*’e ait olduğunu, bu

suşların %26'sında amilaz, %45'inin ise proteaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca tüm bu verileri dikkate alarak, bu izolatların zirai ve endüstriyel açıdan geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Muller *et al.* 2014 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, dünyanın farklı lokasyonlarından toplam 81 farklı deniz sedimenti örneği alarak, bakteriyal çeşitliliğini araştırmışlardır. Sonuçta elde ettikleri 146 örneğin *Firmicutes* familyasına ait olduğunu, farklı bölgelerden alınan deniz örneklerinde bakteri çeşitliliğinin değişkenlik gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Norashirene *et al.* (2014) yapmış oldukları çalışmada, Malezya'nın Sg. Klah bölgesinden altı termofilik izolat elde ederek tanılamış ve hidrolitik bir enzim olan selüloz üretme potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda; bu izolatların optimum gelişme sıcaklıklarının 55°C ve pH'larının ise 7,5 olduğunu, ayrıca Gram negatif, endospor oluşturmeyen, aerobik, katalaz ve oksidaz pozitif özellik taşıdıklarını gözlemlemişlerdir. 16S rRNA sekans analiz verilerini incelediklerinde; izolatların iki tanesinin *Tepidimonas ignava* ve üç tanesinin ise, *Tepidimonas thermarum*' a  $\geq$  %97 oranında benzerlik gösterdiğini, her iki suşun da termostabil selüloz üretme potansiyeline sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Aanniz *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, Fas'taki farklı kaynaklardan toplam 240 adet termofilik bakterileri izole ederek, identifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bütün izolatların Gram ve endospor pozitif, çubuk hücre morfolojisine sahip, halotolerant olduğunu tespit etmişlerdir. BOX-PCR ve 16S rRNA sekans analiz verilerini incelediklerinde, baskın cinsin %97.5 ile *Bacillus* olduğunu ve bunların 119 tanesinin *B. licheniformis*, 6 tanesinin ise *Aerobacillus* (%2,5) cinsine ait türlerin [*A. pallidus* ve *Aeribacillus* sp.(2)] oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, *Bacillus aerius* ve *Bacillus tequilensis* ilk kez termofilik bakteri olarak gruplandırılmış ve suşların %71,25, %50,41 ve %5,41'inin sırasıyla yüksek amilolitik, proteolitik veya selüloolitik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Tarakçıoğlu (2016) yapmış olduğu tez çalışmasında, Erzurum-Ilıca kaplıcasından su örneklerini alarak, termofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonunu gerçekleştirmiştir. 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu termal tesiste; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus borstelensis*, *Aeribacillus pallidus*' un baskın tür olarak bulunduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca tez çalışmasının devamı olarak, bu bakterilerin lipaz enzim üretme potansiyellerini araştırmış ve sonuç olarak, *Bacillus thermoamylovorans* suşunun en yüksek lipaz aktivitesine sahip bulunduğunu tespit etmiştir.

El-Gayar *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada, Suudi Arabistanın Jazan Bölgesindeki sıcak su kaynaklarından aldıkları örneklerden 2 termofilik bakteri izole ederek, proteaz ve amilaz enzim üretme potansiyellerini araştırmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışma sonucunda, termofilik bakterilerin *Brevibacterium linens* ve *Bacillus subtilis* türlerine ait bulunduğunu, her iki bakterinin de amilolitik ve proteolitik enzim üretme potansiyeli taşıdığını göstermişlerdir.

Habib *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada Çin'in güneybatısında bulunan kaplıcalardan toplanan dört örneklerinden, 37-50°C sıcaklık aralıklarında yaşayabilen *Asetobacteraceae* familyasına ait yeni bir termofilik bakteri cinsini literatüre kazandırmışlardır.

Khan *et al.* (2017) Çin, Tibet'de bulunan kaplıca tortusundan yeni bir termofilik bakteri suşu izole etmişlerdir. Bu suşun Gram-negatif, aerobik, çubuk hücre morfolojisine sahip bulunduğunu, düz-sarı renkli kolonilerden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu izolatın optimum gelişme sıcaklığının 60°C, pH'sının 7 ve tuz konsantrasyonunun ise %1,0 bulunduğunu, DNA-DNA hibridizasyon çalışması sonucunda bu suşu yeni bir tür olarak değerlendirerek, *Thermus caldifontis* sp.nov. olarak isimlendirmişlerdir.

Habib *et al.*(2017), Çin'in güney batısında bulunan Tengchong'daki bir kaplıcadan termofilik aerobik bakteri izole etmişlerdir. İzolatın Gram negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, çubuk hücre morfolojisine sahip bulunduğunu tespit etmişlerdir. Fenotipik ve

genotipik karakterizasyon verilerine dayanarak, literatüre *Meiothermus luteus* sp. nov yeni bir termofilik tür kazandırmışlardır.

Arshia Amin *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada Himalayalarda ki jeotermal alanlarda yer alan çeşitli havzalardan numuneler alarak mikrobiyal çeşitliliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda jeotermal alanlardan toplam 9 örnek izole etmiş ve bunların 90-95°C arasında büyüyen *Thermotogae*, 60°C de gelişen *Proteobacteria*'a ve *Chloroflexi* grubuna ait türlerin baskın mikroorganizmalar olduğunu gözlemlemişlerdir.

Khan *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, Çin'in Batı Tıpet bölgesinde yer alan kaplıcadan iki termofilik bakteriyel suş izole etmişlerdir. Bu izolatların; Gram-negatif, aerobik, kısa çubuk hücre morfolojisine sahip, hareketli, oksidaz ve katalaz-pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca izolatların gelişme sıcaklığının 30-55°C'de (optimum, 37-45°C), pH'ın 6,0-8,0'da (optimum, pH 7,0) ve %1 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiğini belirlemişlerdir. 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik analizler, izole ettikleri suşların, *Comamonadaceae* familyasındaki yakın cinslere göre ayrı bir soy hattı oluşturduğunu ve *Acidovorax caeni* R-24608<sup>T</sup> ile %96,3 ve %96,4 arasında en yüksek 16S rRNA sekans dizi benzerliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan morfolojik, filogenetik ve kemotaksonomik test sonuçlarına göre izolatları *Tibeticola sediminis* olarak tanılamışlardır.

Muhammed Balsam *et al.* (2017) tarafından yapılan bir çalışmada 10 tane termofilik bakterinin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, 16S rRNA sekans analiz verilerine göre izolatların 9 tanesinin *B. licheniformis*'e, 1 tanesinin ise *Thermomonas hydrothermalis*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu 10 test izolatının amilaz, proteaz, selülaz gibi endüstriyel açıdan önemli termostabil enzimleri üretebildiği gözlemlenmiştir.

Baltacı *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada Türkiye'deki farklı sıcak su kaynaklarından toplanan su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu



ve moleküler identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada karakterizasyon işleminin ardından izolatların biyoteknolojik enzim üretme potansiyelleri araştırılmıştır. Test suşlarının lipaz, proteaz, amilaz ve selüloz gibi endüstriyel açıdan önemli olan enzimleri üretebildikleri, moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda da izole edilen O20 suşunun yeni bir tür olabileceği sonucuna varılmıştır.

Öztaş (2017), Erzurum ilinde bulunan Ilıca, Hasankale ve Nenehatun termal su kaynaklarından farklı zaman dilimlerinde almış olduğu su örneklerinden 85 adet termofilik bakteriyi izole etmiş ve 29 izolatı tür seviyesinde tanılamıştır. İzolasyon sonucunda 29 suşun tamamının proteaz enzim aktivitesine bakmış, *Bacillus pumilus* NK14 ve *Thermomonas haemolytica* IY13 türlerinde en yüksek enzim aktivitesini tespit ederek, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir.

Grigor Shahinyan *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada, Ermenistan jeotermal alanlarından lipaz üreticisi farklı cinslere ait 3 termofilik izolat elde etmiş ve 16S rRNA sekans analizi sonucunda; bu suşların *Geobacillus* sp., *Bacillus licheniformis* ve *Anoxybacillus flavithermus*'a benzerlik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca yeni izole edilen bacil suşlarının iyi bir termostabil lipaz kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir.

Han *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, jeotermal enerjinin kullanımı ile ilgili önemli sorunlardan biri olan kalsiyum karbonatın neden olduğu jeotermal kuyuların ölçeklenmesi üzerinde durmuşlar ve çevre dostu biyolojik temelli yaklaşımlar önermişlerdir. Bu amaçla Tayvan'daki jeotermal alanlardan termofilik bakterileri izole etmiş ve kalsiyum adsorpsiyon verimleri açısından değerlendirmişlerdir. Antun Hot Spring'ten izole edilen *Tepidimonas fonticaldi* AT-A2 'nin en yüksek kalsiyum adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu ifade ederek kireç giderme uygulamalarında bu izolatın iyi bir tercih olacağı sonucuna varmışlardır.

Yadav *et al.* (2018), Nepal'de bulunan sıcaklığı 42–62°C ve pH 6.5–6.8 olan kaplıcalardan toplam 150 termofilik bakterinin, izolasyonu ve identifikasyonunu gerçekleştirmişler ve elde ettikleri mikroorganizmaların *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*,

*Brevibacillus*, *Bacillus*, ve *Geobacillus* cinsine ait olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada endüstriyel açıdan önemli olan enzimleri üretme potansiyeline sahip suşların tespiti amacıyla yapmış oldukları denemelerde, 150 izolattan 135'inin en az 1 tane ekstraselüler hidrolitik enzim üretme potansiyeline sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Jeotermal kaynaklar bakımından oldukça zengin olan ülkemizde, bu bölgelerden alınan su ve çamur örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu ve biyoteknolojik önemi olan enzimleri üretme potansiyeline sahip bakterilerin tespitine yönelik kapsamlı bir çalışmaya raslanılmamıştır. Burada ki temel amacımız, çalışma lokasyonlarındaki muhtemel çıkabilecek yeni tür veya türlerin tespiti, literatüre kazandırılması ve test izolatlarının multi enzim üretme potansiyeline sahip olup olmadıklarını tespit etmektir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez kapsamında kullanılan su örnekleri Yalova Armutlu, Aydın Germencik, İzmir Yıldızburnu, Samsun Havza, Bitlis Güroymak ve Kırşehir Karakurt kaplıcalarından temin edilmiştir.

##### 3.1.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

- ✓ Buzdolabı (Siemens)
- ✓ Çalkalayıcı (Midri Dual 14)
- ✓ Çoklu blok ısıtıcısı (Lab-Line)
- ✓ Deep-Freeze (Glacier)
- ✓ Elektroforez tankı (Biorad -dikey)
- ✓ Etüv (Termo Scientific Heraus Incubator)
- ✓ Fusion görüntüleme cihazı
- ✓ Güç kaynağı (1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135)
- ✓ Hassas Terazı (Geg, Avery)
- ✓ İnkübatör (Sanyo)
- ✓ Kar makinesi (Scotsman AF-20)
- ✓ Magnetik karıştırıcı (Stirrer HS31)
- ✓ Mikropipet takımı
- ✓ Mikroskop (Leica)
- ✓ Nanodrop
- ✓ Otoklav (Hiclave Hv-50L)
- ✓ PCR cihazı (Senso Quest)
- ✓ Peristaltik pompa (Ismatec)
- ✓ pH metre (Metler Toledo)
- ✓ Saf su cihazı (Bamstead Pure Easy)

- ✓ Santrifüj (Hettich)
- ✓ Spektrofotometre (Beckman Coulter DU<sup>®</sup>730 Life science UV/Vis spectrophotometer)
- ✓ Steril kabin (Telstar AV -100)
- ✓ Su banyosu (Grant 6G)
- ✓ Vorteks (WiseMix)
- ✓ 3 ml'lik Kuvarz küvet
- ✓ 1,5 ve 2 ml'lik tüpler ve raklar
- ✓ 15 ve 50 ml'lik tüpler ve raklar

### 3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

KİMYASALLAR	ŞİRKET
Agaroz	Sigma
Amfisilin	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile su	Thermo
dNTP	Thermo
DNA Marker	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidrojen klorür (HCl)	Sigma
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma
İmmersiyonyağı	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

Kristal violet	Sigma
Lügol	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> )	İnvitrogen
Malaşit yeşili	Sigma
N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum hidroksit(KOH)	Sigma
Promega Wizard <sup>R</sup> Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
Promega wizard <sup>R</sup> genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti)	Promega
RNaz A	İnvitrogen
Safranin	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Oksidaz kiti)	Biomerieux
Triklorik asit (TCA)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Tris Asetat EDTA (TAE)	Sigma
5-Bromo-4-Choloro-3-Indoly β-D-Galactopyranoside (Xgal)	Sigma
6X Yükleme tamponu	Thermo

### 3.1.3. Tez kapsamında kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

### 1. Tryptone Soy Agar (TSA)

Kimyasal İçeriği	gr/L
Tripton	15
Soya pepton	5
NaCl	5
Agar	15

Tryptone Soy Agar besiyerinden 40 gr tartılıp, 1L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

### 2. Tryptone Soy Broth (TSB)

Kimyasal İçeriği	gr/L
Kazein	17
Enzymatic Digest of soybean meal	3
Dipotasyum fosfat	2,5
Glukoz	2,5

Tryptone Soy Broth besiyerinden 30 gr alınıp, 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

### 3. Luria Bertani (LB) Agar

Kimyasal	gr/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15

Luria Bertani Agar besiyerinden 35 gr alınıp, 1L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

#### 4. Luria Bertani (LB) Broth

Kimyasal	gr/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10

Luria Bertani Broth besiyerinden 20 gr tartılıp, 1L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlandı.

5. **%0,9'luk NaCl Çözeltisi:** 0,9 gr NaCl tartılıp, 100 ml saf suda çözülüp 121°C de 15 dk otoklavlandı.
6. **Lügol Solüsyonu:** 1 gr iyot ve 2 gr KCl tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlandı.
7. **Safranin Solüsyonu:** 1 gr safranin %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.
8. **Kristal Violet Solüsyonu:** 2 gr kristal violet %96'lık EtOH'da çözülüp, üzerine 80 ml saf su eklenerek hazırlandı.
9. **Malaşit Yeşili:** 5 g malaşit yeşili (oksalat tuzu), 100ml steril saf su içinde çözülerek hazırlandı.
10. **KOH Solüsyonu:** 3 gr KOH tartılıp, 100 ml saf suda çözülüp otoklavlandı.
11. **%70'lik EtOH:** 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
12. **50 mM EDTA Solüsyonu:** 1,46 g EDTA tartılarak, 100 mL saf suda çözdürülüp pH'sı 8'e tamamlandı.
13. **1X TAE Tamponu:** 100 ml 10X TAE'den alınıp, hacmi 1000 ml ye tamamlandı.
14. **CaCl<sub>2</sub> Solüsyonu:** 1,11 gr CaCl<sub>2</sub>, 100ml(100 mM olacak şekilde) saf su içinde çözdürülüp ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

**15. Amfisilin Solüsyonu:** 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlanarak, ardından 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi ve steril edildi. Steril edilen çözelti -20°C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

**16. X-Gal Solüsyonu (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside):** 40 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

**17. IPTG Solüsyonu (Isopropyl-β-D-1 thiogalactopyranoside):** 23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlanarak, 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Örneklerin alınması**

Çalışmada kullanılan termal su ve çamur örnekleri; Yalova Armutlu, Aydın Germencik, İzmir Yıldızburnu, Samsun Havza, Bitlis Güroymak ve Kırşehir Karakurt kaplıcalarından steril, aseptik koşullar altında laboratuvara getirildi ve kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

### **3.2.2. Termofilik bakterilerin izolasyonu**

Termofilik bakteri izolasyonu için toplanan su ve çamur örneklerinden belirli bir miktar alınarak erlenlere konuldu, üzerine uygun miktarda TSB (Trypton Soy Broth) besiyeri eklenerek, 55°C ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gelişen bakteriler için %0,9'luk fizyolojik su (NaCl) kullanılarak bir seri dilüsyon tüpü ( $10^{-1}$ 'den  $10^{-7}$ 'ye kadar) hazırlandı ve steril hale getirildi. Dilüe edilen her bir bakteriyal solüsyonlardan 100'er µl alınarak TSA (Tryptone Soy Agar) katı besiyerine yayma ekim yapıldı ve 55°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra petrielerde gelişen farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler seçildi ve 3 faz çizgi ekim yöntemiyle saf kültürleri hazırlandı. Daha sonra her bir saf kültürden steril öze ile koloniler alınarak TSB sıvı



besiyerine inokülasyon gerçekleştirildi ve 55°C'de 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda test suşlarının bulunduğu tüpler çalkalamalı inkübatörden çıkarılarak, stok kültürleri hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.3. Seçilen izolatların konvensiyonel yöntemlerle tanısı**

#### **3.2.3.a. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi**

Test izolatlarının morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan TSA besiyerine bakterilerin 3 faz çizgi ekim yöntemiyle aktarımı gerçekleştirildi ve 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriyerler inkübatörden çıkarılarak önce koloni morfolojileri belirlendi, daha sonra bakteriyel suşların hücre morfolojilerini (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.) belirlemek için kültürlerden belirli bir miktar alınarak, preparatlar hazırlandı ve özel boyalarla boyanarak mikroskop altında incelendi.

#### **1. Gram boyama**

Bakteriyel hücrelerin hücre duvar yapılarını tespit etmek amacıyla mikrobiyologlar tarafından iki farklı Gram reaksiyon testi uygulanır.

Bu yöntemlerin ilkinde; genç bakteriyel kültürlerden steril öze ile örnekler alınarak lam üzerinde smear preparatlar hazırlanır ve kristal violet ile 1 dk süre ile boyanır. Bu aşamada hem Gram (+), hem de Gram (-) bakteriler mor renge boyanmaktadır. Süre sonunda fazla boya preparatlar üzerinden saf su ile uzaklaştırıldı ve mordan olarak lügol eklenerek, 1 dakika süre ile inkübe edilir. Daha sonra bu preparat, %96'lık etil alkol ile yıkanır. Yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparatlar, safranin ile

20 saniye süreyle boyanır. Süre sonunda saf su ile yıkanan preparatların kuruması beklenilerek, mikroskop altında Gram özellikleri incelenir. Bu aşamada, mor renkli olarak görünen hücreler Gram (+), pembe-kırmızı renkli olarak görünen hücreler ise; Gram (-) olarak değerlendirilir (Arslan 2016).

Gram boyamada kullanılan ikinci bir yöntem ise, KOH testidir. Bu testte, bakteriler %3'lük KOH ile muamele edilir. Gram (-) bakteriler de hücre duvarı ince olduğundan, bu işlem sonucunda nükleer materyal ve sitoplazma dışarı çıkar, sakızimsı bir yapı oluşumu gözlemlenir. Gram (+) bakterilerde ise %3'lük KOH hücre yapısını bozmadığından dolayı böyle bir oluşum gerçekleşmez. Bu amaçla TSA'da geliştirilen taze kültürlerden (24-48 saatlik) alınan bir öze dolusu bakteri, KOH solüsyonu ile 5-10 saniye süre ile muamele edildi, süre sonunda öze yukarıya - aşağıya doğru hareket ettirildiğinde, Gram (+) bakterilerde herhangi bir uzama gözlemlenmezken, Gram (-) bakterilerde ise sümüksü bir yapının oluştuğu gözlemlendi (Baltacı 2016).

## **2. Endospor boyama**

İdentifikasyonda kullanılan konvensiyonel yöntemlerden biride endospor boyama testidir. Endospor varlığını test etmek amacıyla termofilik bakteriler stok besiyerinden TSA besiyerine aktarıldı ve 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriyerler inkübatörden çıkarılarak çeşitli stres şartlarında bekletildi. Daha sonra bu saf kültürlerden lam üzerinde smearlar hazırlandı ve kaynayan su banyosu üzerine yerleştirildi. Preparatların üzerine tamamen malaşit yeşili ile kaplandı ve üzerine kurutma kağıtları konularak, 5-7 dakika boyunca malaşit yeşili ile sürekli ıslak kalması sağlandı. Süre sonunda, preparatların üzerindeki kurutma kağıtları kaldırılıp, su ile yıkandı ve fazla boya uzaklaştırıldı. Ardından preparatların üzerine safranin döküldü ve 20-30 saniye süre ile muamele edildi. Bu karşıt boya uygulamasından sonra, preparatlar tekrar su ile yıkandı, kurutuldu ve immersiyon objektifinde endospor oluşturup oluşturmadıkları tespit edildi (Arslan 2017).

### **3. Hareketlilik Testi**

İzolatlar, TSB ve %0,6 agar içeren deney tüplerine iğne öze yardımıyla inoküle edildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplerde oluşan ekim çizgisindeki gelişim durumu incelenerek, bakteriler hareketlilik açısından pozitif yada negatif olarak değerlendirildi (Baltacı 2015).

Ayrıca lam (ortası çukur)-lamel uygulaması ile bakterilerin hareketlilik özellikleri yeniden incelendi. Bu amaçla, dört köşesi vazelin sürülmüş olan lamelin tam ortasına bir öze dolusu taze sıvı kültürden bırakılarak, lamın çukur kısmı kültürün üzerine gelecek şekilde kapatıldı ve preparat seri bir şekilde ters çevrilerek, mikroskop altında incelendi (Öztaş 2017).

#### **3.2.3.b. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi**

##### **1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi**

İzolatların gelişebildikleri tuz aralıklarının belirlenmesi amacıyla; farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12 ) sahip TSB besiyerlerine, test suşları inoküle edildi ve tüpler çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda termofilik bakterilerin üreyebildikleri minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometrik ( $OD_{600}$ ) olarak belirlendi.

##### **2. İzolatların gelişebildikleri sıcaklık aralıklarının belirlenmesi**

Test izolatlarının gelişebildikleri maksimum, minimum ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla, termofilik bakteriler TSB sıvı besiyerine inoküle edildi ve farklı sıcaklık değerlerine (15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C) ayarlı inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda izolatların

gelişebildikleri sıcaklık aralıkları spektrofotometrede ( $OD_{600}$ ) yapılan ölçümler sonucunda tespit edildi (Baltacı 2015).

### **3. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi**

Test suşlarının gelişebildikleri maksimum, minimum ve optimum pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, farklı pH değerlerine (pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9 ve pH:11) ayarlanmış TSB sıvı besiyerlerine bakteriler inoküle edildi ve petripler 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından test tüpleri inkübatörden çıkarılarak spektrofotometrede ( $OD_{600}$ ) ölçüm yapıldı ve gelişebildikleri pH aralıkları belirlendi (Arslan 2017).

#### **3.2.3.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi**

##### **1. Katalaz testi**

Katalaz enzimi, ETS (Elektron Taşıma Zinciri)'nin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i parçalayarak,  $H_2O$  ve  $O_2$  gazına dönüştürür. Açığa çıkan  $O_2$  gazı da kabarcık oluşumuna sebep olur. Bu analiz için canlandırılan test suşlarından bir öze dolusu alınarak, üzerinde %5'lik hidrojen peroksit damlası bulunan lam üzerine bırakılır ve homojenize edilir. Bu işlem sonunda hava kabarcığı oluşturan bakteriler katalaz enzimi açısından pozitif, oluşturmayanlar ise negatif olarak kabul edilir (Arslan 2017).

##### **2. Oksidaz testi**

Bu test ile bakterilerin, elektron transferinde önemli rol oynayan sitokrom c proteini içerip içermedikleri tespit edilir. Sitokrom c proteini mitokondride bulunan bir transmembran proteini olup, solunum olayında görev alır.

Analiz için %1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorid içeren hazır kit kullanıldı. Bu amaçla kit bünyesinde bulunan disklerle bir damla su damlatıldı ve üzerine bir miktar bakteri bırakıldı. Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluştururken, negatiflerde ise renk oluşumu görülmedi (Sarı 2016).

### **3.2.4. Test suşlarının moleküler yöntemlerle karakterizasyonu**

#### **3.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu**

Test izolatları TSA besiyerine aktarılarak, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Her bir petriden tek koloni alınıp, TSB besiyerine inoküle edildi ve 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakterilere ait genomik DNA, Promega Wizard<sup>R</sup> genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne göre izole edildi (Arslan 2017).

#### **İzolasyon Prosedürü**

- ✓ TSB sıvı besiyerinde üreyen hücrelerden 2 ml alınarak ependorflara konuldu ve santrifüjde çöktürme işlemine tabi tutuldu, çökelek üzerine 480 µl, 50 Mm EDTA (pH=8) ilave edildi ve çözüldü daha sonra bu homojenat üzerine 120 µl, 10 mg/ml lizozim eklenerek, iyice karışımı sağlandı ve 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edildi.
- ✓ Homojenat 2 dk süreyle 13000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı, tüplerin üzerine 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonu eklenerek, pipetajlandı.
- ✓ Homojenat 80°C'de 5 dk süre ile inkübasyona bırakıldı, daha sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Üzerine 3 µl RNase A eklenerek birkaç kez alt üst edildi ve 30 dk süreyle ve 37°C'de inkübe edildi.
- ✓ Oda sıcaklığına gelmesi beklenen karışımın üzerine, Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklenerek 20 saniye süre ile vortexlendi ve daha sonra 5 dk buzda bekletildi.
- ✓ Buzdan alınan test tüpleri 30 saniye süre ile 13000 rpm'de çöktürme işlemine tabi tutuldu, süpernatant 600 µl izoproponal bulunan yeni ependorf tüplerine aktarıldı ve pelet oluşuncaya kadar ependorflar birkaç kez alt üst edildi.

- ✓ 2 dk süreyle 13000 rpm'de tüpler santrifüjlendi, süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
- ✓ Ependorflara %70'lik EtOH'dan 600 µl eklenerek, hafifçe alt üst edildi ve 2 dk süre ile 13000 rpm'de santrifüjlendi. EtOH döküldü ve etanol tamamen uzaklaşmaya kadar 37°C'de 15-20 dk süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Ependorf tüplerinin üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklendi ve 1 saat süre ile 65°C'de inkübasyona bırakıldı daha sonra içlerinde genomik DNA bulunan ependorf tüpler kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

### **DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması:**

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'de absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği (protein kirliliği taşıyıp taşımadığı) ise 280 nm'de elde edilen absorbans değeriyle belirlenir. Bu amaçla Kuvarz küvetin içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı ve çıkan değer kör olarak kaydedildi. Daha sonra üzerine 2 µl DNA ilave edilerek, karışımın homojen hale gelmesi sağlandı ve 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen bu absorbans değerinden köre ait olan çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu ve aynı işlemler 280 nm için de tekrarlandı.  $A_{260}/A_{280}=1-1,7$  arasında olan DNA örneklerinin çalışma solüsyonları hazırlanarak, kullanıldı (Adıgüzel 2006).

### **DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/ml)**

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)= $A_{260} \times$  Seyreltme Faktörü (500) $\times$ 50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok DNA solüsyonunun konsantrasyonu tespit edildi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl)  $\times$  İstenen Hacim (200 µl) / Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülüne göre DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Elde edilen miktar, TE çözeltisi ile 200 µl'ye

tamamlanarak 100 ng/ $\mu$ l konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C’de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

### **3.2.4.b. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi**

#### **a. BOX-PCR**

BOX- PCR, test izolatlarının genomik parmak izi analizlerini yapmak amacıyla kullanılan bir rep- PCR yöntemidir. Evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilen bu PCR çeşidinde her bir örnek için hazırlanan reaksiyon koşulları:

- ❖ 12,7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- ❖ 5  $\mu$ l 10X Buffer
- ❖ 2,5  $\mu$ l DMSO
- ❖ 1.25  $\mu$ l BSA
- ❖ 1,25  $\mu$ l dNTP(deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10Mm)
- ❖ 4  $\mu$ l primer BOX A1R (5’-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’)
- ❖ 0,3  $\mu$ l 5 unit/ $\mu$ l Taq DNA polimeraz
- ❖ 3  $\mu$ l kalıp DNA (70 ng/ $\mu$ l) kullanılarak toplam hacim 30  $\mu$ l olacak şekilde hazırlandı ve PCR işlemi tamamlandı (Adıgüzel 2006).

## PCR Programı

Örnekler PCR cihazına (3x32-well ProFlex™ PCR system) konuldu ve aşağıdaki PCR programı ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

- 95°C'de 7 dk (Denatürasyon)
- 94°C'de 1 dk (Denatürasyon)
- 53°C'de 1 dk (Bağlanma)
- 65°C'de 8 dk (Uzama)
- 65°C'de 16 dk (Uzama)

36 DÖNGÜ

## BOX-PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C'ye kadar soğutuldu ve 4 µg/ml miktarında etidyum bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb'lık DNA markırından [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (New England Bio Labs, N0550S) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu + 5 µl PCR ürün karışımı yüklendi. Elektforez jel düzeneği 80 volta ayarlanarak örnekler 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

### b. (GTG)<sub>5</sub>-PCR

Test izolatlarının genomik parmak izi analizleri için kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise evrensel primerler ile gerçekleştirilen (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemidir.



## Reaksiyonun Hazırlanması

PCR yapılacak her bir örnek için;

- ❖ 12,7 µl ddH<sub>2</sub>O
- ❖ 5 µl 10X Buffer
- ❖ 2,5 µl DMSO
- ❖ 1,25 µl BSA
- ❖ 1,25 µl dNTP(deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- ❖ 4 µl primer GTG<sub>5</sub> (GTG GTG GTG GTG GTG)
- ❖ 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz
- ❖ 3 µl kalıp DNA (70 ng/µl) kullanılarak 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı ve PCR işlemi tamamlandı (Adıgüzel 2006).

## PCR Programı

Örnekler PCR cihazına (3x32-well ProFlex™ PCR system) yerleştirildi ve aşağıda belirtilen PCR programına göre reaksiyon gerçekleştirildi.

- 95°C'de 7 dk (Denatürasyon)
- 94°C'de 1 dk (Denatürasyon)
- 53°C'de 1 dk (Bağlanma)
- 65°C'de 8 dk (Uzama)
- 65°C'de 16 dk (Uzama)

36 DÖNGÜ

## (GTG)<sub>5</sub>-PCR Ürünlerinin Elektrofrez

Jel elektrofrez için öncelikle 0,8 gr agaroz üzerine 80 ml 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C'ye kadar soğutuldu ve 4 µg/ml miktarında etidyum bromür

eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb'lık DNA markırından [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (New England Bio Labs, N0550S) 10 l ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 l 6X yükleme tamponu + 5 l PCR rn karışımı yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 120 volta ayarlanarak örnekler 90 dakika yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

#### **3.2.4.c. 16S rRNA PCR**

Evrimsel olarak korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematiki açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla bu gen bölgesi universal 16S rRNA primerleri kullanılarak *in vitro* koşullar altında çoğaltıldı.

#### **PCR Reaksiyon ortamı**

Her bir DNA rneėi için, 30 l'lik reaksiyon tüpleri hazırlandı. Bu tüplere eklenen kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları izelge 3.2'de verildi.

**Çizelge 3.2.** 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyon ve miktarları

REAKTİF	KONSANTRASYON	MİKTAR( $\mu$ l)
PCR Buffer (sigma)	10X	3
dNTP	25 mM	0,6
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,8
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
DMSO	%99	1,2
ddH <sub>2</sub> O	-	19,5
Kalıp DNA	100 ng	3

**PCR programı:** PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek, Çizelge 3.5’de verilen program koşullarına göre ayarlama yapıldı ve istenilen DNA bölgesi çoğaltıldı (Adıgüzel 2006).

**Çizelge 3.3.** 16S rRNA PCR işlemi için uygun sıcaklık, süre ve döngü sayısı

İŞLEM	SICAKLIK(°C)	SÜRE(dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	$\infty$	

### 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz tartılarak üzerine 80 ml 1X TAE (%1’lik agaroz jel) tamponu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında 3-4 dk süre ile kaynatıldı. Ardından jel 50°C’ye kadar soğutuldu ve üzerine 4  $\mu$ g/ml etidyum bromür eklenerek,

içinde tarak bulunan elektroforez jel küvetine döküldü. Jelin donması beklendi ve ardından tarak dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra jel küveti içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb'lık DNA markırdan [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (New England Bio Labs, N0550S) 4 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 1 µl 6X yükleme tamponu + 5 µl PCR ürünü yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak, örnekler 100 dk süreyle yürütüldü. Süre sonunda jel, elektroforez tankından çıkarılarak jel dökümantasyon sistemi (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) ile görüntülendi ve DNA bantları analiz edildi.

### 3.2.4.d. Klonlama

#### 1. Kompetent hücrenin hazırlanması

- ✓ Stok kültürden *Escherichia coli* JM101 suşu faz ekim yöntemiyle canlandırıldı, gelişen bu kültürden tek bir koloni alınarak içerisinde LB besiyeri bulunan erlene aktarıldı ve 37°C'de 1 gece çalkalamayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Bu kültürden 300 µl alınarak, 2700 µl steril saf su ile seyreltildi ve 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı. 30 (hazırlanacak ml cinsinden miktar) X 0.1 (sabit değer) / Çıkan değer X 10 (seyreltme oranı) formülünden elde edilen değer bize kültürden alınması gereken miktarı verir.
- ✓ 30 ml LB broth üzerine bu kültürden eklenilerek, 37°C'de 0,044-0,055 değerlerine ulaşıncaya kadar inkübe edildi.
- ✓ İstenilen değere ulaşıncaya kültür çalkalamalı inkübatörden alınarak, 4400 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı, çökeleğin üzerine buzdolabında bekletilen soğuk 100 mM CaCl<sub>2</sub>'den 10 ml ilave edildi ve 30-45 dakika buzdolabında bekletildi.
- ✓ Süre sonunda 4400 rpm'e ayarlı santrifüjde (4°C) 10 dk süreyle çöktürme işlemine tabi tutuldu ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra çökelek üzerine soğuk 100 mM CaCl<sub>2</sub>'den 2 ml eklendi ve bir gece süreyle buzdolabında bekletildi (Arslan 2017).

## 2. Ligasyon işlemi

Ligasyon işlemi için kullanılan kimyasallar:

- ✓ 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- ✓ 3 µl, PCR ürünü
- ✓ 1 µl vektör
- ✓ 1 µl T<sub>4</sub> DNA ligaz

0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirildi ve karışım 16°C'de 13-15 saat süre ile inkübe edildi. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

## 3. Transformasyon işlemi

- ✓ Her bir ependorf tüpüne buzdolabında beklettiğimiz kompetentten hücreden 200 µl konuldu. Daha sonra üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk süre ile buzda bekletildi.
- ✓ Süre sonunda buzda bekletilen tüpler, 42°C'ye ayarlı su banyosunda 2 dk süreyle ısı şokuna maruz bırakıldı.
- ✓ Her bir tüpdeki solüsyonun üzerine 200 µl LB eklenerek, 37°C'de 100 dk bekletildi.
- ✓ Daha sonra buzdolabında saklanan 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı, ardından her ikisi de amfisilinli katı besiyerine yayıldı.
- ✓ Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra, Ligasyon ürünü + Kompetent hücre solüsyonundan 150 µl alınarak, petrilerin tam ortasına konuldu ve drigalski özesi ile karışım iyice yayıldı. Daha sonra petriler, 37°C'de yaklaşık 14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

#### 4. Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım

Süre sonunda petriyeler inkübatörden çıkarıldı ve +4°C’de bir gece bekletildi Petriyelerde oluşan mavi ve beyaz kolonilerden beyazlar seçilerek, içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth bulunan tüplere aktarıldı ve 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.

#### 5. Koloni PCR

✓ Amfisilinli LB broth’da üremesi sağlanan bakteriyal kültürden 4 µl alınarak, içerisinde 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı ve 10 dk süreyle kaynayan su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda tüpler 2 dk süre ile buzda ısı şokuna uğratıldı.

✓ Daha sonra tüpler 5 dk süre ile 12000 rpm’de santrifüjlendi, süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve PCR işlemine geçildi. Bu işlem için kullanılan kimyasallar:

- ❖ 16,1 µl dH<sub>2</sub>O
- ❖ 3 µl tampon (MgCl<sub>2</sub>’li)
- ❖ 0,6 µl dNTP mix
- ❖ 1,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- ❖ 2’şer µl 5 µM primer [T7 (5’-AATACGACTCACTATAG-3’) ve SP6 (5’-ATTTAGGTGACACTATAG-3’)]
- ❖ 0,3 µl *Taq* DNA polimeraz
- ❖ 1,2 µl DMSO
- ❖ 3 µl süpernatant

**PCR programı:** Örnekler PCR cihazına konuldu ve PCR programı için cihaz şu şekilde programlandı;

**Çizelge 3.4.** PCR programı

İŞLEM	SICAKLIK(°C)	SÜRE(dk,sn)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

%1'lik agaroz jel hazırlanır ve ona uygun EtBr ilave edilip, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif) -içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü.

İstlenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre seçilip, plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a ekildi.

## 6. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanıldı.

- ✓ 4 ml amfisilinli LB broth besiyerinde üretilen bakteriyal hücreler, 10.000–12.000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- ✓ Pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonundan 250 µl eklendi ve pipetlenerek homojenize olması sağlandı.
- ✓ Üzerine 250 µl Cell Lysis Solution ilave edilip, alt üst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- ✓ 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu karışıma eklendikten sonra, 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- ✓ 350 µl Neutralization Solution ilave edildi ve 12.000-14.000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüjlendi.
- ✓ Süpernatanttan yaklaşık 650–750 µl alınarak, içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ve 12.000-14.000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- ✓ Daha sonra kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklenip, tekrar 1 dk 12.000-14.000 rpm'de santrifüjlendi
- ✓ Kolonun üzerine 250 µl Wash Solution ilave edilip tekrar 2 dk süre ile 12.000-14.000 rpm'de santrifüjlendi ve alta geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- ✓ Tekrar 1 dk süre ile 12.000-14.000 rpm'de oda ısısında santrifüjlendi.
- ✓ Kolon yeni bir tüpün içerisine alındı. Üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi ve 1 dk süre ile 12.000-14.000 rpm'de santrifüjlendi.
- ✓ Kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler ölçüm yapıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Arslan 2017).

## 7. Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsa da, istenilen belgenin klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla örnekler *EcoRI* ile kesime tabi tutuldu (Baltacı 2015).

## 8. Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

- ✓ 998 µl saf su+2 µl plazmit konularak,  $\text{OD}_{260}$  da ölçüm yapıldı.
- ✓  $A_{260} \times 50$  (sabit)  $\times 500$  (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu, 100 – 200 ng olacak şekilde ayarlandı.
- ✓ Uygun konsantrasyondaki tüplerden, 30–50 µl alınarak sekans analizi için plazmitler MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.



## 9. DNA dizi analizi

Firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları BioEdit programı ile analiz edildi ve FASTA formatına çevirildi. Öncelikle primerler bulundu ve primerlerin önünde ve arkasında kalan vektöre ait kısımlar çıkarıldı. Daha sonra diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi.

## 10. Sonuçların değerlendirilmesi

Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin blast çalışması, [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak gerçekleştirildi ve % benzerlik oranları belirlendi. Daha sonra bu veriler Genbank'a girilerek her bir örnek için Genbank numarası alındı.

### 3.2.5. Endüstriyel açıdan önemli enzimleri üretme potansiyeline sahip izolatların belirlenmesi

#### 3.2.5.a. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir:

- ❖ Nutrient sıvı besiyeri (8g)
- ❖ Skim milk (10g)
- ❖ Agar (15g)
- ❖ Distile su (1000 ml)

Skim milk dışındaki besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Daha sonra skim milk (10 g/100 ml), 45°C'ye kadar soğutulmuş temel besiyerlerine aseptik koşullarda ilave edilerek, iyice karışımı sağlandı ve besiyeri

eşit hacimlerde olacak şekilde steril petrilere döküldü. Besiyerine bakteriler inoküle edilerek, her bir bakterinin gelişebildiği optimum sıcaklık değerinde 2 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda petrilere inkübatörden çıkarılarak, kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşturan suşlar pozitif olarak kabul edildi (Aktaş 2012).

### **3.2.5.b. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi**

Amilaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir:

- ❖ Maya ekstraktı (1g)
- ❖ Çözünbilir nişasta (5g)
- ❖ Agar (15g)
- ❖ Distile su (1000 ml)

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121°C’de 15 dakika sterilize edildi ve süre sonunda besiyeri steril petrilere eşit hacimde olacak şekilde dökülerek, katılaşması beklendi. Hazırlanan besiyerine bakteriler inoküle edilerek test bakterilerinin optimum gelişme sıcaklıklarında 2 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda inkübatörden çıkarılan her bir petrinin üzerine lügol çözeltisi dökülerek boyama işlemi gerçekleştirildi. Amilaz aktivitesine sahip suşların kolonileri etrafında, koyu mavi zemin üzerinde şeffaf bir zon oluşumu gözlemlendi (Aktaş 2012).

### **3.2.5.c. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi**

Lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir:

- ❖ Distile su (1000 ml)
- ❖ Tributyrat agar (23g)
- ❖ Gliseril tribütürat (10 ml)

Besiyeri içerikleri 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra, besiyerine gliseril tribütürat ilave edildi ve homojenize hale getirildi. Daha sonra hazırlanan bu besiyerleri, petrilere eşit miktarlarda döküldü ve katılaşması sağlandı. Test bakterileri bu besiyerine inoküle edildikten sonra, izolatların optimum gelişme sıcaklık değerlerinde 2 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Besiyerinde gelişim gösteren bakteriyal suşlar pozitif olarak kabul edildi (Aktaş 2012).

#### **3.2.5.d. Selülaz aktivitesinin belirlenmesi**

Selülaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir:

- ❖ BHB (Bushnell haas broth) (3.27g)
- ❖ Agar (3g)
- ❖ Karboksimetilselülaz sodyum tuzu (10g)
- ❖ Distile su (1000ml)

Besiyeri içerikleri 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edildi, ve eşit hacimde petrilere dökülerek katılaşması beklendi. Hazırlanan petrilere bakteriler inoküle edilerek optimum gelişme sıcaklıklarında 2 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petrilere önce % 0,2'lik kongo kırmızısı çözeltisi döküldü ve 20 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı, daha sonra üzerlerine 1 M NaCl çözeltisi ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Koloni çevresinde açık renk zon veren suşlar pozitif olarak kabul edildi (Aktaş 2012).

#### **3.2.5.e. Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi**

Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir:

- ❖ Maya ekstraktı (1g)
- ❖ Ksilan (5g)

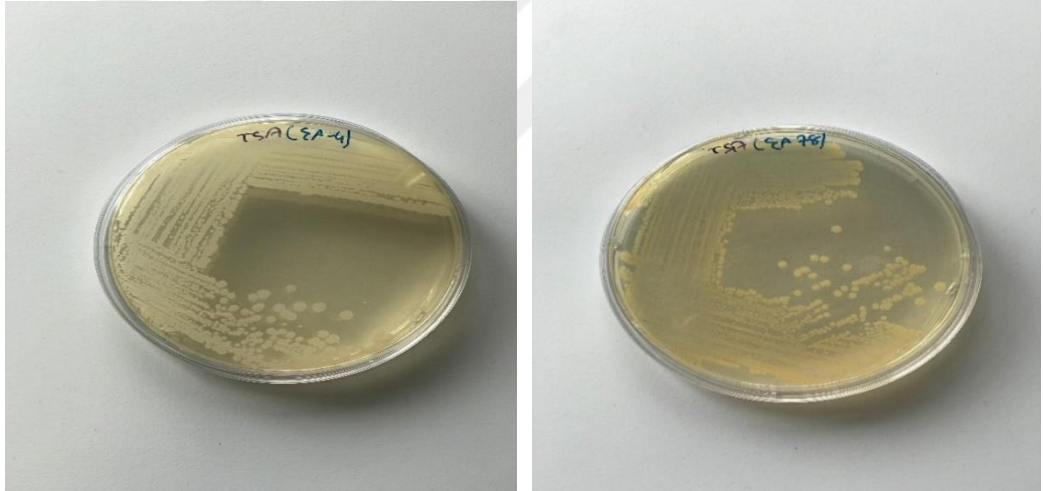
- ❖ Agar (15g)
- ❖ Distile su (1000ml)

Ksılan besiyerinin bileşenleri distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Süre sonunda otoklavdan çıkarılan ve soğuması beklenen besiyeri eşit hacimlerde petrilere döküldü, katılaşması beklendi. Daha sonra test suşları bu petrilere inoküle edilerek, optimum gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her bir petrinin üzerine %1'lik kongo kırmızısı çözeltisi döküldü ve 20 dakika boyama işlemine maruz bırakıldı. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için petriye 1 M NaCl çözeltisi eklendi ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Koloni çevresinde açık renk zon veren suşlar pozitif olarak kabul edildi (Aktaş 2012).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Termofilik Bakterilerinin İzolasyonu

Bu çalışmanın ilk aşamasında; Yalova Armutlu, Aydın Germencik, İzmir Yıldızburnu, Samsun Havza, Bitlis Güroymak ve Kırşehir Karakurt kaplıcalarından toplanan ve aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirilen termal su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışma sonunda toplam 130 bakteriyal izolat elde edilerek, konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle karakterizasyon işlemine tabi tutuldu. Tanılama işlemi sonucunda 11 farklı tür tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. EA 1, EA 10 suşlarına ait petri görüntüleri

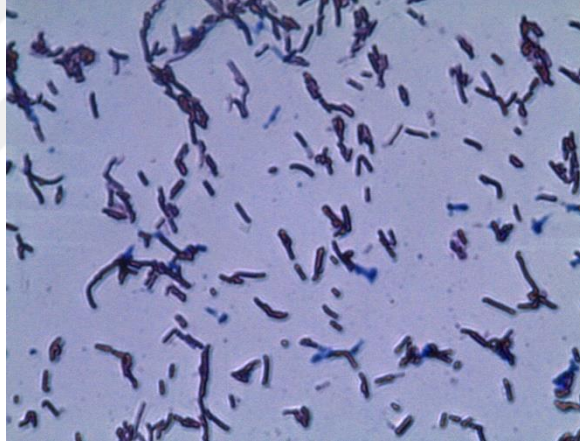
### 4.2. İzolatların Konvensiyonel Yöntemlerle Tanısı

#### 4.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla basit boyama yapıldı ve immersiyon objektifinde preparatlar incelendi. Sonuçta 129 izolatın çubuk, EA 9 suşunun ise kok hücre morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi.

## 1. Gram boyama

Bu çalışmada, test izolatları iki farklı Gram testi yöntemiyle analiz edildi. Birinci yöntemde; suşların smear preparatları hazırlanıp, özel boyalar ile boyama yapılırken; ikinci yöntemde ise: termofilik bakteriler, %3'lük KOH solüsyonu ile muamele edildi. Birinci uygulama sonucunda preparatlar mikroskopik olarak incelemeye tabi tutuldu ve mor renkli olarak görünen hücreler, Gram (+); pembe-kırmızı renkli olan hücreler ise, Gram (-) olarak değerlendirildi. Gram özellikleri tespit edilen izolatlar doğrulama amacıyla, KOH yöntemine tabi tutulduğunda; sakız gibi uzayan suşlar Gram (-), uzamayanlar ise Gram (+) olarak kabul edildi. Bu test sonuçları bize tüm izolatların Gram (+) olduğunu gösterdi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** EA 4 izolatına ait örnek gram boyama görüntüsü

## 2. Endospor boyama

Termofilik test suşlarının endospor içerip içermediklerini belirlemek amacıyla her bir örnek için smear hazırlandı ve özel boyalar ile boyandı. Bu işlem sonucunda EA 9 ve EA 10 izolatları haricinde tüm bakterilerin endospor pozitif (Şekil 4.3) olduğu belirlendi.



**Şekil 4.3.** EA 7 İzolatına ait endospor görüntüsü

### **3. Hareketlilik testi**

Test izolatları, TSB + %0,6'lık agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla inoküle edildi ve inkübatörde 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı, süre sonunda çıkarılan tüplerdeki ekim çizgisine göre gelişim durumları incelenerek hareketlilikleri hakkında yorum yapıldı. Bunun sonucunda izolatların tamamının hareketli olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** EA 6 bakterisine ait hareketlilik testi

## 4.2.2. Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

### 1. İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenebilmesi için %2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik NaCl kullanıldı. OD<sub>600</sub>'de yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda bakterilerin gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı belirlendi. Test suşlarının çoğunun %2-4 tuz konsantrasyon değerlerinde en iyi gelişim gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı (%)

İzolat kodu	Gelişebildiği tuz konsantrasyon aralığı (%)
EA 1	1-2
EA 2	2-8
EA 3	2-4
EA 4	1-2
EA 5	2-10
EA 6	2-8
EA 7	2-4
EA 8	2-4
EA 9	2-6
EA 10	2-10
EA 11	2-4

### 2. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

İzolatların en iyi gelişim gösterdiği sıcaklıkların belirlenebilmesi için 15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C'de inkübe edildi ve test suşlarının üreyebildiği sıcaklık değerleri belirlendi (Çizelge 4.2). Termofilik bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarının genellikle 55°C olduğu, EA 5, EA 6, EA 9, EA 10 ve EA 11 izolatlarının ise en iyi gelişimi 25-55°C'de gerçekleştirdiği tespit edildi. Bu veriler ışığında, test organizmalarının optimum gelişme sıcaklıklarını belirlemek amacıyla 1°C aralıklarla sıcaklık denemesi yapıldı, EA 5 ve EA 6'nın 30 °C'de, EA 9 ve EA 10'un 48°C'de, EA 11'in ise 37°C'de optimum gelişme sıcaklığına sahip olduğu gözlemlendi.



**Çizelge 4.2.** İzolatların gelişme gösterdikleri sıcaklık değerleri

İzolat kodu	15°C	25°C	35°C	45°C	55 °C	65 °C
EA 1	-	-	+	+	+	-
EA 2	-	-	+	+	+	-
EA 3	-	-	+	+	+	+
EA 4	-	-	+	+	+	-
EA 5	-	+	+	+	+	-
EA 6	-	+	+	+	+	-
EA 7	-	-	+	+	+	+
EA 8	-	-	+	+	+	-
EA 9	+	+	+	+	+	-
EA 10	+	+	+	+	+	-
EA 11	-	-	+	+	+	-

### 3. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

Test suşlarının gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenebilmesi için; pH: 3, pH: 5, pH: 7, pH:9 ve pH:11'deki gelişimleri izlendi (Çizelge 4.3) ve izolatların genellikle pH 7-9 aralığında gelişim gösterdiği tespit edildi.

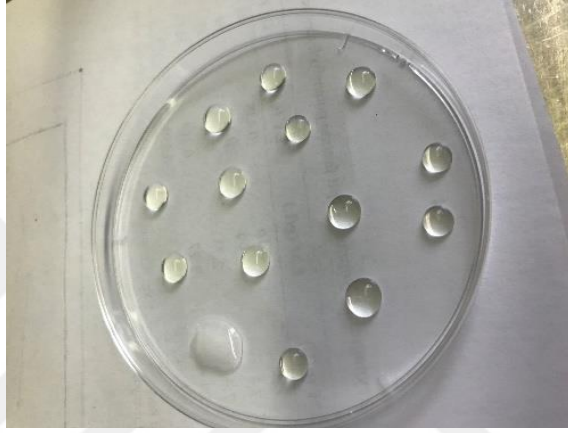
**Çizelge 4.3.**İzolatların gelişme gösterdikleri pH aralığı

İzolat kodu	Gelişebildiği pH aralığı (%)
EA 1	7-9
EA 2	5-9
EA 3	7-9
EA 4	6-7
EA 5	7-9
EA 6	7-9
EA 7	7-9
EA 8	7-9
EA 9	5-9
EA 10	5-9
EA 11	6-7

### 4.2.3. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

#### 1. Katalaz Testi

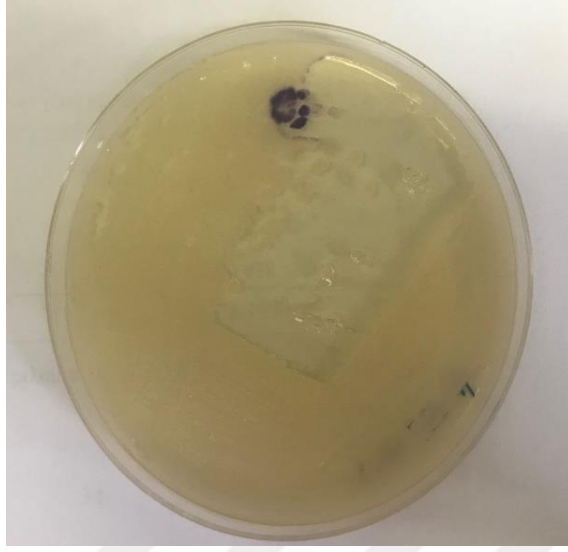
Yapılan analizler sonucunda, EA 9 suşu hariç diğer tüm izolatların katalaz pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. EA 1 izolatına ait katalaz test sonucu

#### 2. Oksidaz testi

Oksidaz testi sonucunda EA 9 izolatı hariç diğer tüm test suşlarının pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).

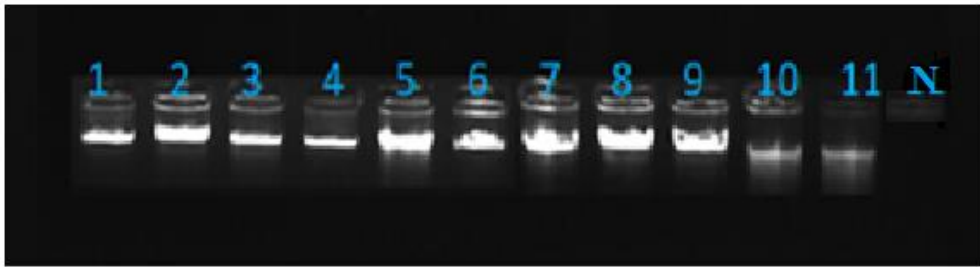


**Şekil 4.6.** EA 6 izolatına ait oksidaz test sonucu

#### **4.2.4. İzolatların moleküler yöntemlerle karakterizasyonu**

##### **4.2.4.a. Genomik DNA izolasyonu**

Kaplıcalardan alınan su örneklerinden izole edilen her bir test bakterisinin genomik DNA'sı izole edildi ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi (Şekil 4.7).



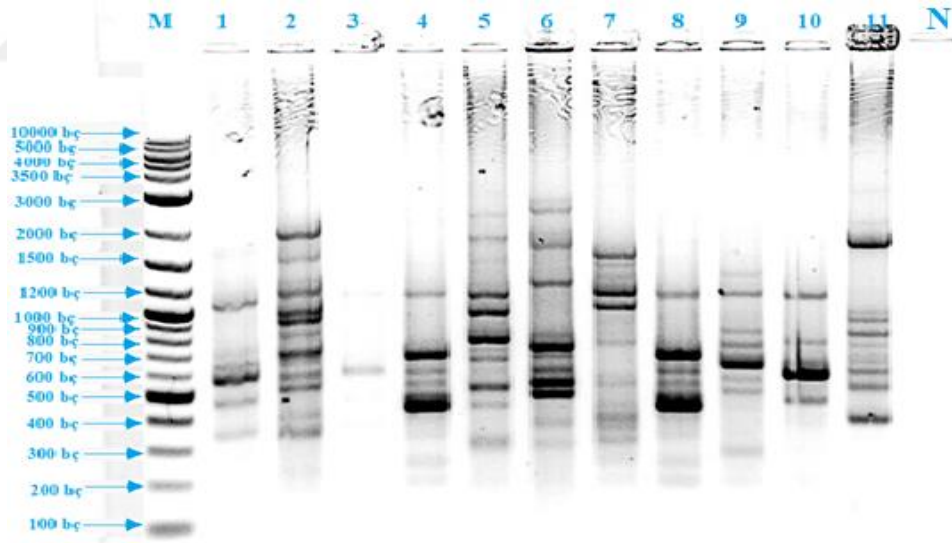
**Şekil 4.7.** İzolatlara ait genomik DNA'ların jel görüntüsü

#### 4.2.4.b. rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Bu çalışmada termal su kaynaklarından izole edilen 130 izolatın içerisinde farklı suşların tespiti amacıyla, tür ve alt tür seviyesinde mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları net bir şekilde ortaya koyan rep-PCR [(GTG)<sub>5</sub>-PCR ve BOX-PCR] yöntemi kullanıldı. Yapılan bu analiz sonucunda 11 farklı türün varlığı tespit edildi ve bundan sonraki tüm çalışmalar bu izolatlar üzerinden gerçekleştirildi.

##### a. BOX-PCR

Genomik parmak izi analiz yöntemlerinden biri olan BOX-PCR, 11 farklı tür üzerinde yeniden uygulandığında; test bakterilerinin genellikle 300-1200 bç arasında en az 5 ve 1200- 4000 bç arasında ise 2 polimorfik bant verdiği tespit edildi (Şekil 4.8).

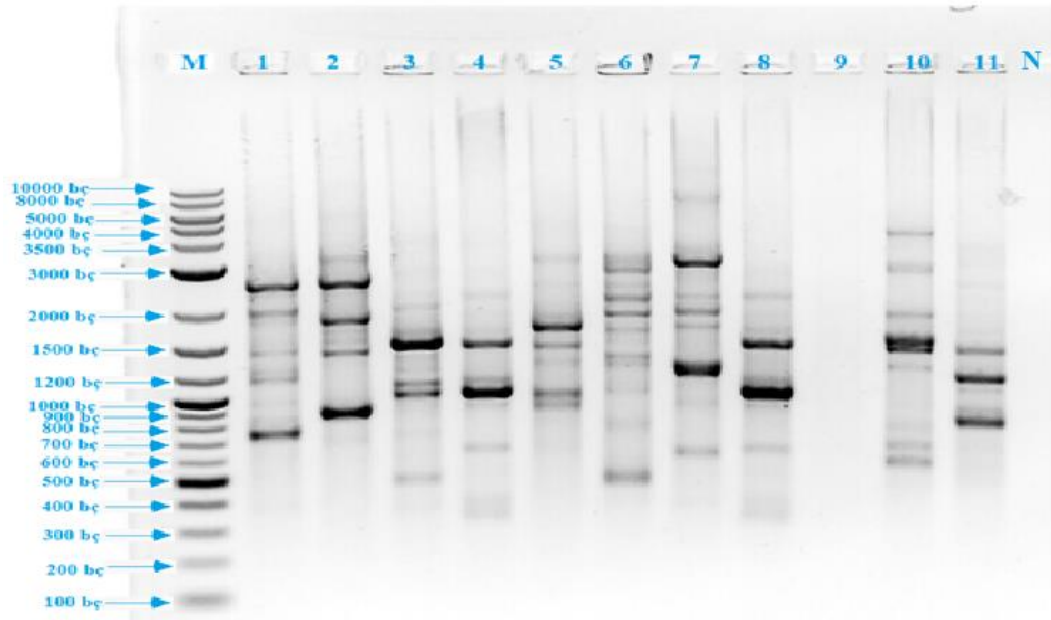


**Şekil 4.8.** Test izolatlarına ait BOX- PCR bant profilleri

(M: DNA Markır, 1:EA 2, 2: EA 8, 3:EA 4, 4: EA 7, 5: EA 1, 6: EA 11, 7: EA 9, 8: EA 3, 9: EA 5, 10: EA 6, 11: EA 10, 12: Negatif kontrol)

### b. (GTG)<sub>5</sub>-PCR

Mikroorganizmaların genomlarında bulunan kısa DNA dizilerini kullanarak, bakterilerin tür ve alt tür seviyesindeki ayrımlarını net bir şekilde ortaya koyan rep-PCR yöntemlerinden biri de (GTG)<sub>5</sub>-PCR'dır. 11 termofilik bakterinin (GTG)<sub>5</sub>-PCR analizi sonucunda, izolatların genellikle 350-3500 bç arasında en fazla 16, 700-2500 bç arasında en az 8 polimorfik bant verdiği, EA 9 izolatının ise hiçbir bant vermediği gözlemlendi (Şekil 4.9). Ayrıca rep-PCR yöntemlerinden BOX-PCR'ın, (GTG)<sub>5</sub>-PCR'a göre termofilik bakterilerin ayrımında daha etkili olduğu tespit edildi.

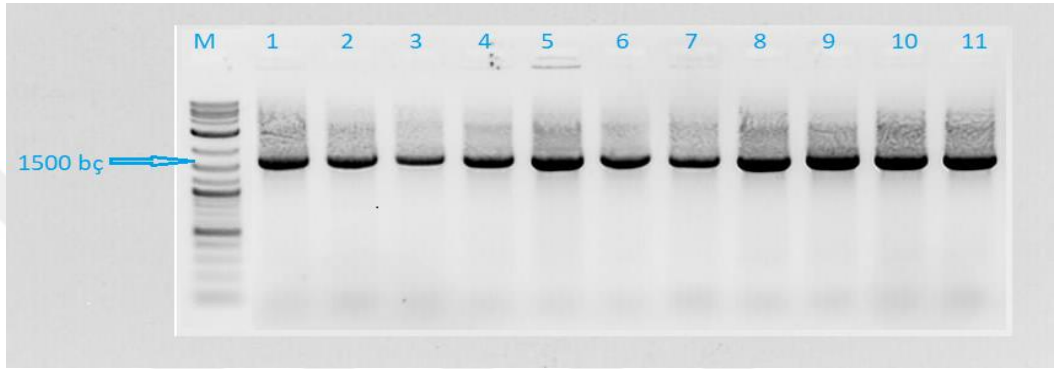


**Şekil 4.9.** İzolatlara ait (GTG)<sub>5</sub> PCR bant profilleri

( M: DNA Markır, 1: EA 10, 2: EA 6, 3: EA 5, 4: EA 3, 5: EA 9, 6: EA 11, 7: EA 1, 8: EA 7, 9: EA 4, 10: EA 8, 11: EA 2, 12: Negatif kontrol)

#### 4.2.4.c. 16S rRNA PCR

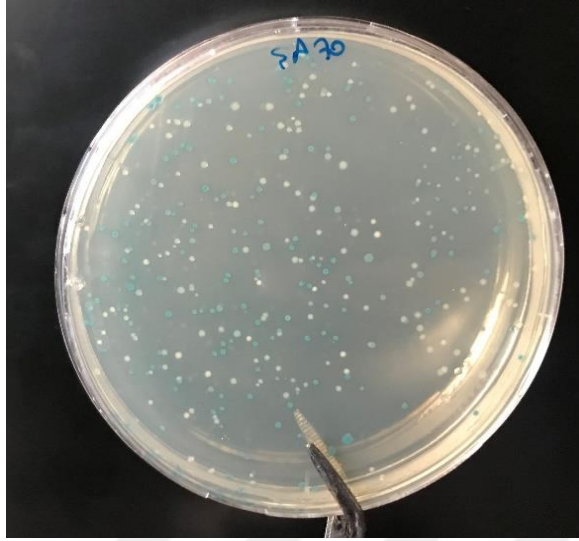
Bakterilerde bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak amplifiye edildi ve %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Sonuçta tüm izolatların 1500 bp büyüklüğünde tek bant verdiği gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Test izolatlarına ait 16S rRNA görüntüsü

#### 4.2.4.d. Klonlama

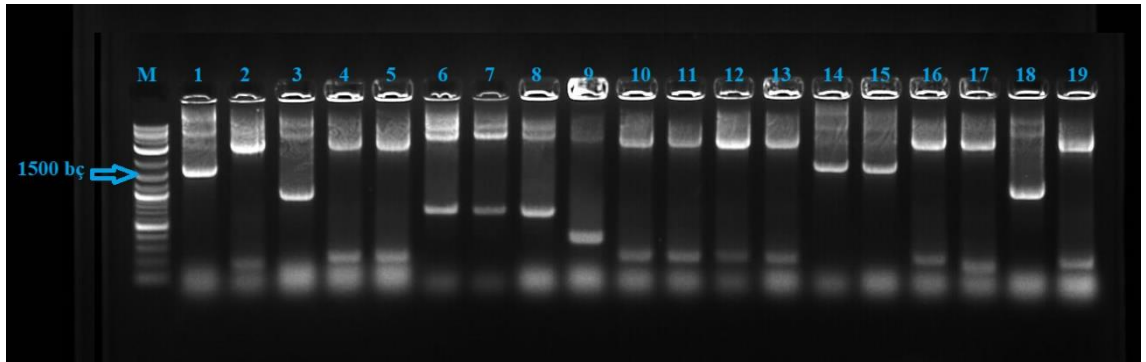
16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra, uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu amaçla ilk önce ligasyon, daha sonra transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Rekombinant ürünleri ihtiva *E. coli* izolatları; amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilere inkübatörden çıkarılarak, mavi-beyaz tarama işlemine tabi tutuldu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Mavi beyaz koloni petri görüntüsü

### 1. Koloni PCR

Transformasyon işlemi sonucunda beyaz renkli koloniler petriden alınarak, koloni PCR işlemine tabi tutuldu ve elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Sonuçta 1500 bç'de bant veren koloniler seçilerek, işleme devam edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Test izolatların koloni PCR görüntüsü (1,14 ve 15 nolu örnekler pozitif olarak kabul edildi)

## 2. Plazmit izolasyonu

Agaroz jelde, 1500 bç'de tek bant veren koloniler seçilerek, plazmit izolasyon aşamasına geçildi. Bunun için ilgili koloniler petriden alınarak amfisilinli LB Broth'a aktarıldı ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonunun ardından Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak, plazmitler izole edildi. Daha sonra plazmitlerin istenen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı *EcoRI* kesim enzimi kullanılarak incelendi. Pozitif sonuç veren ve en uygun konsantrasyona sahip olan örnekler Macrogen (Hollanda) firmasına sekans analizi için gönderildi.

## 3. DNA dizi analizi

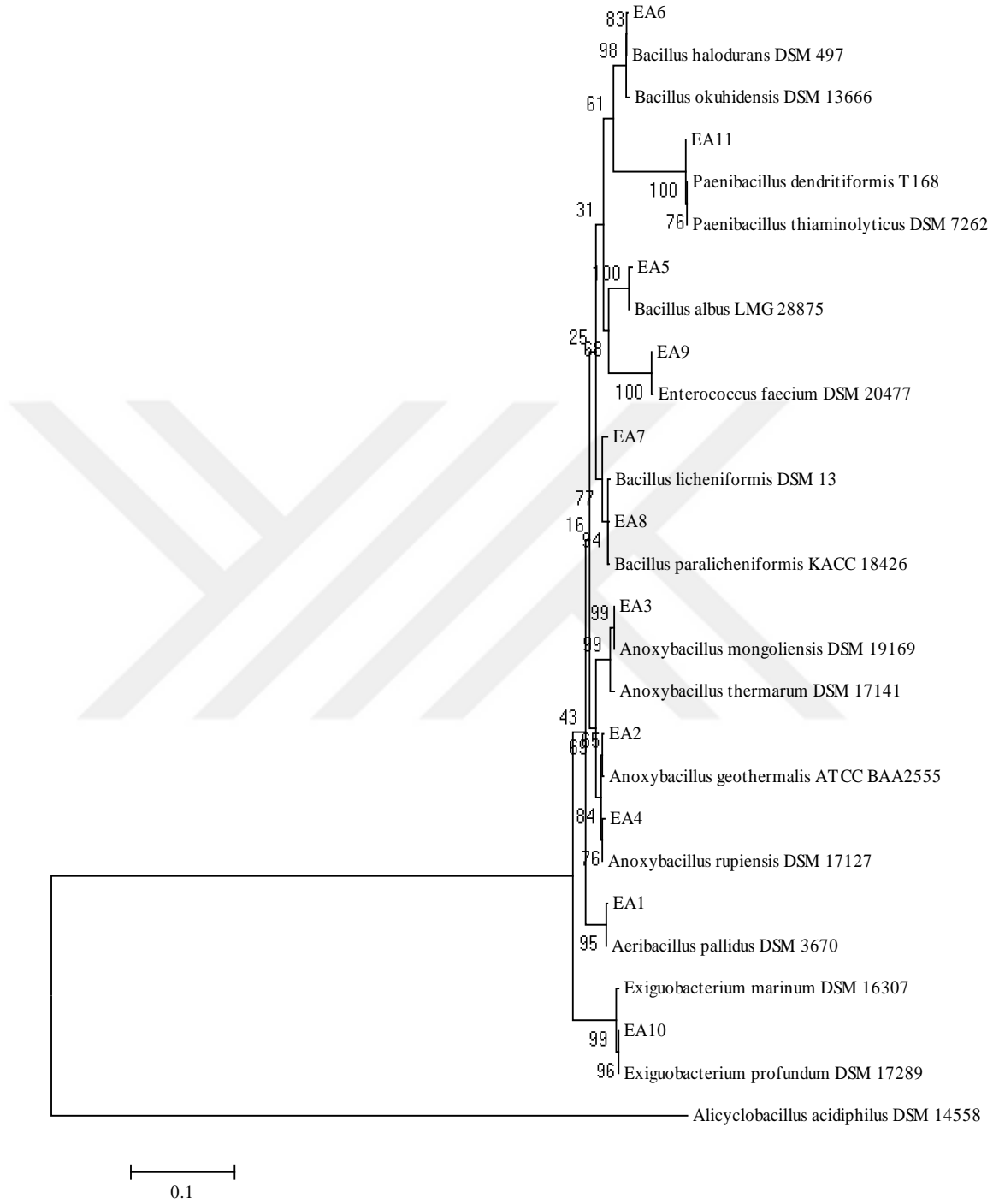
Macrogen firmasından gelen 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildikten sonra, Eztaxon'daki diziler mukayese edildi (Çizelge 4.5). Daha sonra elde edilen veriler Genbank'a sunularak, genbank numaraları alındı (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları

İzolat Kodu	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı (%)	Genbank Numaraları
EA 1	<i>Aerobacillus pallidus</i>	%99,86	MH411153
EA 2	<i>Anoxybacillus geothermalis</i>	%99,66	MH411161
EA 3	<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	%99,31	MH411164
EA 4	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	%99,53	MH411201
EA 5	<i>Bacillus albus</i>	%99,80	MH411233
EA 6	<i>Bacillus halodurans</i>	%99,73	MH411241
EA 7	<i>Bacillus licheniformis</i>	%98,85	MH411598
EA 8	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	%99,76	MH411597
EA 9	<i>Enterococcus faecium</i>	%99,93	MH411686
EA 10	<i>Exiguabacterium profundom</i>	%99,86	MH411710
EA 11	<i>Paenibacillus dentritiformis</i>	%99,73	MH411711

Çalışma kapsamında elde edilen veriler kullanılarak, termofilik bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.13).





**Şekil 4.13.** Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan termal su örneklerinden izole edilen bakterilerin 16S rRNA gen analiz sonuçları temel alınarak oluşturulmuş olan Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) filogenetik ağacı. *Alicyclobacillus acidophilus* dış grup olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. İzolatların Eztaxon verilerine göre benzerlik yüzdeleri

İzolat kodu / Benzerlik Olan Organizmalar	Benzerlik oranları
<b>EA 1</b> → <i>Aerobacillus pallidus</i>	%99,86
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	%96,75
<i>Anoxybacillus calidus</i>	%95,78
<i>Anoxybacillus geothermalis</i>	%95,18
<b>EA 2</b> → <i>Anoxybacillus geothermalis</i>	%99,66
<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	%99,59
<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	%97,91
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	%97,80
<b>EA 3</b> → <i>Anoxybacillus mongolensis</i>	%99,31
<i>Anoxybacillus flavithermus subsp. Flavithermus</i>	%99,26
<i>Anoxybacillus flavithermus subsp. Yunnanensis</i>	%99,19
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	%99,12
<b>EA 4</b> → <i>Anoxybacillus rupiensis</i>	%99,53
<i>Anoxybacillus geothermalis</i>	%99,32
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	%97,74
<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	%97,57
<b>EA 5</b> → <i>Bacillus albus</i>	%99,80
<i>Bacillus tropicus</i>	%99,80
<i>Bacillus nitratreducens</i>	%99,80
<i>Bacillus luti</i>	%99,80
<b>EA 6</b> → <i>Bacillus halodurans</i>	%99,73
<i>Bacillus okuhidensis</i>	%99,16
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	%96,60
<i>Fermentibacillus polygona</i>	%96,26
<b>EA 7</b> → <i>Bacillus licheniformis</i>	%98,85
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	%98,82
<i>Bacillus sonorensis</i>	%98,78
<i>Bacillus glycinifermentans</i>	%98,30
<b>EA 8</b> → <i>Bacillus paralicheniformis</i>	%99,76
<i>Bacillus licheniformis</i>	%99,73
<i>Bacillus sonorensis</i>	%99,52
<i>Bacillus aerius</i>	%99,32
<b>EA 9</b> → <i>Enterococcus faecium</i>	%99,93
<i>Enterococcus durans</i>	%99,73
<i>Enterococcus lactis</i>	%99,58
<i>Enterococcus hirae</i>	%99,46
<b>EA 10</b> → <i>Exiguobacterium profundum</i>	%99,86
<i>Exiguobacterium marinum</i>	%99,53
<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	%99,53
<i>Exiguobacterium himgiriensis</i>	%98,23
<b>EA 11</b> → <i>Paenibacillus dendritiformis</i>	%99,73
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	%98,91
<i>Paenibacillus popilliae</i>	%98,42
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	%98,21

#### 4.2.4.e. Endüstriyel açıdan önemli enzimleri üretme potansiyeline sahip izolatların belirlenmesi

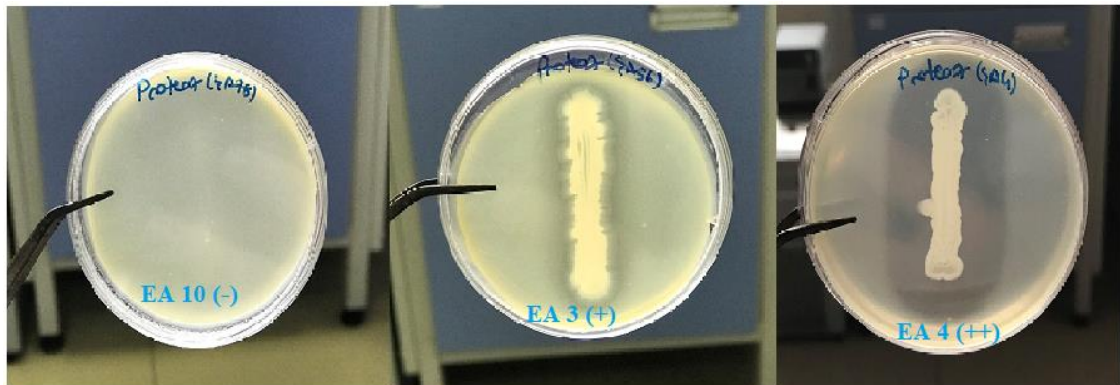
##### 1. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Skim milk içeren katı besiyeri hazırlandı, hazırlanan besiyerine 11 farklı izolat çizgi ekim yöntemiyle inoküle edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Koloni çevresinde şeffaf zon oluşturan suşlar (Çizelge 4.6) pozitif olarak kabul edildi (Şekil 4.14).

**Çizelge 4.6.** Test izolatların proteaz aktivite sonuçları

Test izolatları	Proteaz aktivite sonuçları
EA 1 ( <i>Aerobacillus pallidus</i> )	+
EA 2 ( <i>Anoxybacillus geothermalis</i> )	+
EA 3 ( <i>Anoxybacillus mongoliensis</i> )	+
EA 4 ( <i>Anoxybacillus rupiensis</i> )	++
EA 5 ( <i>Bacillus albus</i> )	+
EA 6 ( <i>Bacillus halodurans</i> )	-
EA 7 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	+
EA 8 ( <i>Bacillus paralicheniformis</i> )	++
EA 9 ( <i>Enterococcus faecium</i> )	+
EA 10 ( <i>Exiguobacterium profundom</i> )	-
EA 11 ( <i>Paenibacillus dentritiformis</i> )	+

(+: pozitif, ++: kuvvetli pozitif, -: negatif)



**Şekil 4.14.** Test izolatlarının örnek proteaz aktivite görüntüsü (EA 10, EA 3 ve EA 4)

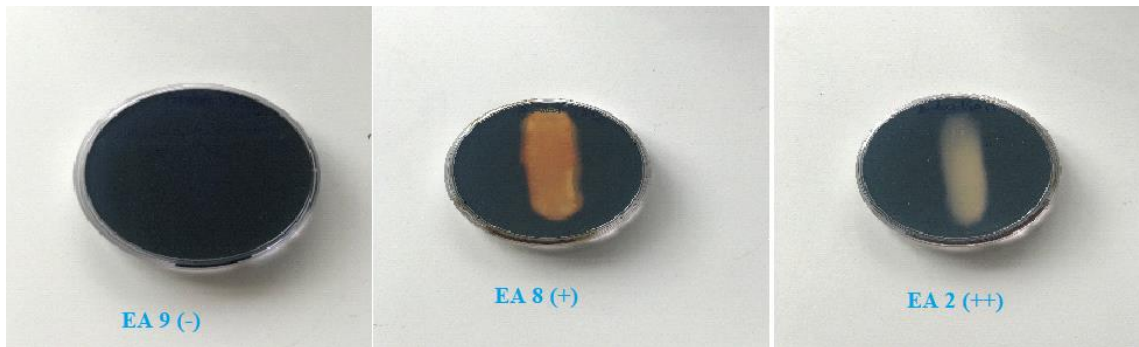
## 2. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi

Maya ekstraktı içeren amilaz katı besiyeri hazırlandıktan sonra 11 farklı test izolatu çizgi ekim yöntemiyle petrilere inoküle edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilere lügol solüsyonu dökülerek, boyama işlemi gerçekleştirildi. Amilaz aktivitesine sahip suşlarda (Çizelge 4.7) koyu mavi zemin üzerindeki koloni çevresinde, şeffaf bir zon oluşumu gözlemlenirken, negatif olanlarda ise bu zon tespit edilmedi (Şekil 4.15).

**Çizelge 4.7.** Test izolatlarının amilaz aktivite sonuçları

Test izolatları	Amilaz aktivite
EA 1 ( <i>Aerobacillus pallidus</i> )	-
EA 2 ( <i>Anoxybacillus geothermalis</i> )	++
EA 3 ( <i>Anoxybacillus mongoliensis</i> )	+
EA 4 ( <i>Anoxybacillus rupiensis</i> )	++
EA 5 ( <i>Bacillus albus</i> )	+
EA 6 ( <i>Bacillus halodurans</i> )	-
EA 7 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	+
EA 8 ( <i>Bacillus paralicheniformis</i> )	+
EA 9 ( <i>Enterococcus faecium</i> )	-
EA 10 ( <i>Exiguobacterium profundum</i> )	-
EA 11 ( <i>Paenibacillus dentritiformis</i> )	-

(+: pozitif, ++: kuvvetli pozitif, -: negatif)



**Şekil 4.15.** Test izolatlarının örnek amilaz aktivite görüntüsü (EA 9, EA 8 ve EA 2)

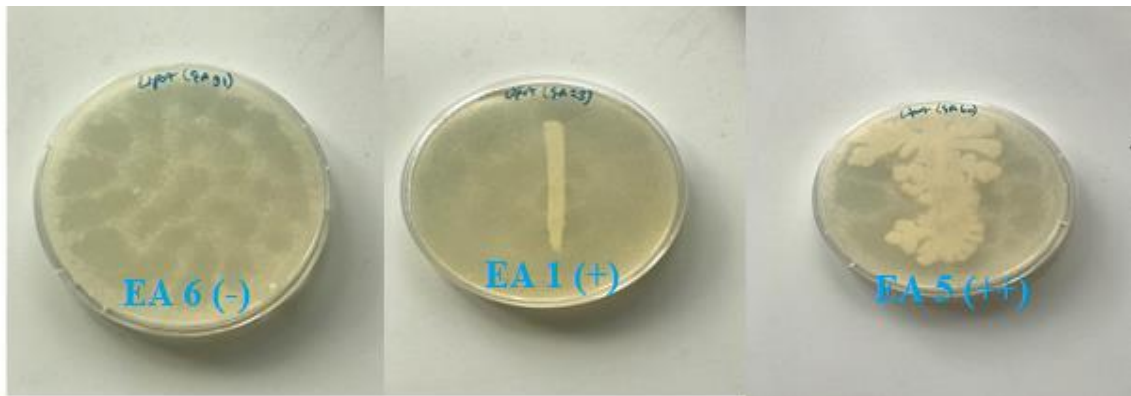
### 3. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Katı lipaz besiyerine, 11 farklı izolat çizgi ekim yöntemiyle inoküle edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petri inkübatörden çıkarılarak görüntülendi. Besiyerinde gelişen bakteriler lipaz aktivitesi bakımından pozitif, gelişmeyenler ise negatif olarak kabul edildi. İzolatların lipaz aktiviteleri (Çizelge 4.8) ve örnek görüntüleri (Şekil 4.16) aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Test izolatlarının lipaz aktivite sonuçları

Test izolatları	Lipaz aktiviteleri
EA 1 ( <i>Aerobacillus pallidus</i> )	+
EA 2 ( <i>Anoxybacillus geothermalis</i> )	++
EA 3 ( <i>Anoxybacillus mongoliensis</i> )	++
EA 4 ( <i>Anoxybacillus rupiensis</i> )	++
EA 5 ( <i>Bacillus albus</i> )	++
EA 6 ( <i>Bacillus halodurans</i> )	-
EA 7 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	++
EA 8 ( <i>Bacillus paralicheniformis</i> )	++
EA 9 ( <i>Enterococcus faecium</i> )	+
EA 10 ( <i>Exiguobacterium profundum</i> )	+
EA 11 ( <i>Paenibacillus dentritiformis</i> )	-

(+: pozitif, ++: kuvvetli pozitif, -: negatif)



**Şekil 4.16.** Test izolatlarının örnek lipaz aktivite görüntüsü (EA 6, EA 1 ve EA 5)

#### 4. Selülaz aktivitesinin belirlenmesi

Katı olarak hazırlanan selülaz besiyerine, 11 farklı çizgi ekim yöntemiyle inoküle edildi ve 48 saat süre ile 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petrilere önce %0,2'lik kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika, daha sonra ise 1 M NaCl çözeltisi ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kırmızı zemin üzerinde koloni çevresinde açık renkte zon oluşan suşlar pozitif, oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirildi. Selülaz aktivitesini sadece EA 6 suşu gösterdi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. EA 4 (-) ve EA 6(+) suşlarına ait selülaz aktivite görüntüsü

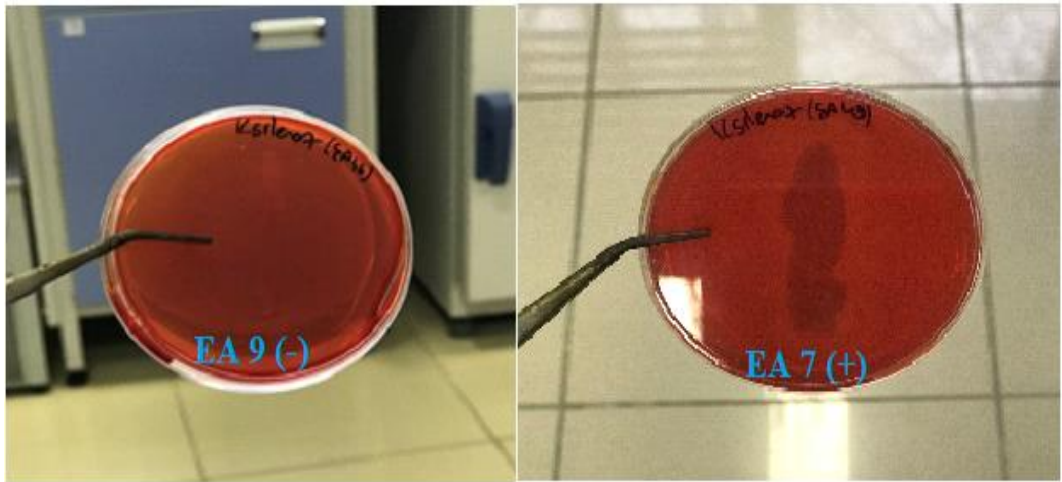
#### 5. Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

Ksilan içeren katı besiyerine, 11 farklı izolat çizgi ekim yöntemiyle inoküle edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilere önce %0,2'lik kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika, daha sonra ise 1 M NaCl çözeltisi ilave edilerek, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kırmızı zemin üzerinde koloni çevresinde açık renkte zon oluşan suşlar (Çizelge 4.9) pozitif, oluşturmayanlar ise negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.18).

**Çizelge 4.9.** Test izolatlarının ksilanaz aktiviteyi

Test izolatları	Ksilanaz aktiviteyi
EA 1 ( <i>Aerobacillus pallidus</i> )	-
EA 2 ( <i>Anoxybacillus geothermalis</i> )	+
EA 3 ( <i>Anoxybacillus mongoliensis</i> )	+
EA 4 ( <i>Anoxybacillus rupiensis</i> )	-
EA 5 ( <i>Bacillus albus</i> )	-
EA 6 ( <i>Bacillus halodurans</i> )	-
EA 7 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	+
EA 8 ( <i>Bacillus paralicheniformis</i> )	+
EA 9 ( <i>Enterococcus faecium</i> )	-
EA 10 ( <i>Exiguobacterium profundum</i> )	-
EA 11 ( <i>Paenibacillus dentritiformis</i> )	-

(+: pozitif, -: negatif)



**Şekil 4.18.** Test izolatlarına ait ksilanaz aktivite görüntüsü (EA 9 ve EA 7)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Termofilik mikroorganizmalar; optimum büyüme sıcaklıkları 55°C'den, 105°C'ye kadar değişen, büyük bir kısmı Bakteria grubu içerisinde yer alan ekstremofillerdir. Bu organizmalar doğal olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, dışkılarda ve çöplerde bulunmaktadır. Ekstrem koşullarda yaşayan bakterilerin keşfi ile biyoteknoloji alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş ve biyomateryaller üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle çeşitli endüstriyel uygulamalarda etkin olarak kullanılan ve ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen termofillerin, önemli enzim ve enzim gruplarını içerdikleri bilinmektedir. Sıcak su kaplıcalarından izole edilen bu bakteriler ekstrem şartlara dayanıklı enzimlere sahip olması nedeniyle, biyoteknolojik açıdan büyük önem arz etmektedirler. Ekstrem koşullara dayanıklı mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, katalitik aktivitelerinin yüksek oluşuna bağlı olarak daha uzun süre kullanılmaları, daha az yan ürün oluşturmaları, daha stabil ve ucuz olmaları, üretim prosesinde çok fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilebilmeleri nedeniyle diğer enzimlere nazaran tercih edilmektedir (Gül 2011).

Bu bilgiler ışığında, yapılan bu tez çalışmasında; Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan termal tesislerden alınan su örneklerinden toplam 130 bakteri izole edildi, konvensiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan tanı testleri sonucunda 11 farklı türün varlığı tespit edildi.

Elde edilen izolatların morfolojik analizleri sonucunda literatür verilerine paralel bir şekilde (Tcherpakov *et al.* 1999; Crapart *et al.* 2007; Derekoa *et al.* 2007; Namsaraev *et al.* 2010; Taslimi *et al.* 2013; Dunlap *et al.* 2015; Filippidou *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017; Shahinyan *et al.* 2017; Harris *et al.* 2018) EA 9 (kok) hariç Rahman *et al.* (2017) tüm test suşlarının çubuk hücre morfolojisine sahip, Gram ve endospor (EA 9 ve EA 10 hariç) pozitif, hareketli oldukları tespit edildi.



İzolatların fizyolojik özelliklerinden tuz, sıcaklık ve pH istekleri belirlendi. Test suşlarının gelişebildikleri tuz konsantrasyonları %2-12 arasında test edildi. Elde edilen sonuçlara göre izolatların genellikle literatür verilerine paralel bir şekilde (Tcherpakov *et al.* 1999; Crapart *et al.* 2007; Derekova *et al.* 2007; Namsaraev *et al.* 2010; Taslimi *et al.* 2013; Dunlap *et al.* 2015; Filippidou *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017; Shahinyan *et al.* 2017) %2-4, EA 9 kodlu izolatın ise % 2-6 tuz konsantrasyonlarında (Arslan 2017) gelişebildiği tespit edildi. EA 6 kodlu *Bacillus halodurans*'ın literatür (Takami and Horikoshi, 1999) verilerinden farklı olarak %8 tuz konsantrasyonuna kadar dayanabildiği gözlemlenirken, yapılan başka bir çalışmada (Tambeker *et al.* 2017) bizim verilerimize paralel bir şekilde %8 tuz konsantrasyonunda üreyebilen suşların varlığı ortaya konuldu.

İzolatların 15-65°C sıcaklık aralığındaki gelişim durumları incelendiğinde literatür (Derekova *et al.* 2007; Namsaraev *et al.* 2010; Taslimi *et al.* 2013; Dunlap *et al.* 2015; Filippidou *et al.* 2016; Shahinyan *et al.* 2017) verilerine paralel bir şekilde; EA 1-4, EA 7 ve EA 8'in optimum 55°C'de, EA 5 ve EA 6'nın 30°C'de Liu *et al.* (2017), Tambeker *et al.* 2017] EA 10'un Crapart *et al.* (2007) 48°C'de, EA 11'in ise (Tcherpakov *et al.* (1999) 37°C'de optimum gelişme sıcaklığına sahip olduğu gözlemlendi. Yapılan moleküler analizler sonucunda EA 9 kodlu izolatın %99 oranında *Enterococcus faecium*'a benzediği tespit edildi. Mezofilik bakterilerin genellikle 45°C'nin üzerinde gelişim göstermediği bilgisi göz önüne alındığında, bir laktik asit bakterisi olan *E. faecium*'un 48°C'de, üremesi şaşırtıcı olmuştur. Fakat literatüre bakıldığında, Ke *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmada Enterococci grubu içerisinde yer alan mikroorganizmaların bazı üyelerinin termotolerant olduğu ve Rahman *et al.* (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, *Enterococcus faecium*'un 45°C üzerinde büyüebildiği bildirildi. Bu yönüyle bulduğumuz sonuçlar literatür verileriyle paralellik göstermektedir.

İzolatların pH gereksinimleri 3-11 aralığında incelendi. Genel olarak suşların literatür verilerine paralel bir şekilde 7-9 pH değerlerinde gelişim gösterdiği, EA 2, EA 9 ve EA 10 kodlu izolatların ise, pH 5'de üreyebildikleri gözlemlendi (Tcherpakov *et al.* 1999;

Crapart *et al.* 2007; Derekova *et al.* 2007; Namsaraev *et al.* 2010; Taslimi *et al.* 2013; Dunlap *et al.* 2015; Filippidou *et al.* 2016; Shahinyan *et al.* 2017; Rahman *et al.* 2017; Liu *et al.* 2017; Harris *et al.* 2018).

Tez çalışmamız kapsamında, bakterilerin tanılanmasında konvensiyonel analizlerin tek başına yeterli olmamasından dolayı, bu testlerin yanı sıra moleküler yöntemlerde kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan moleküler yöntemlerden rep-PCR [(GTG)<sub>5</sub>-PCR ve BOX-PCR], ekosistemdeki çeşitliliği, suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymada ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmaların tür ve tür altı seviyede ayırmada kullanılan oldukça etkin ve basit bir yöntem (Adıgüzel *et al.* 2012) olup, bu metot kullanılarak 130 test suşu içerisinde 11 farklı türün varlığı ortaya konuldu. Daha sonra 11 izolat, tekrar rep-PCR analizine tabi tutuldu ve literatür verilerine paralel bir şekilde BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemlerinin, suşlar arasında ki genomik farklılığı ortaya koymada oldukça başarılı olduğu tespit edildi (Adıgüzel 2006; Adıgüzel *et al.* 2012a; Adıgüzel 2012b, Yanmis *et al.* 2015; Adıgüzel and Yürekli 2015). Svec *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmada, (GTG)<sub>5</sub>-PCR yönteminin *Enterococcus* cinsine ait bakterilerin tür ve tür altı seviyedeki teşhislerinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini tespit ettiler. Biz de, 16S rRNA sekans sonuçlarına göre *E. faecium*'a benzerlik gösterdiği tespit edilen EA 9 izolatının ayırımında literatür verilerine paralel bir şekilde (GTG)<sub>5</sub>-PCR'ın etkili olduğunu gözlemledik.

Daha sonra izolatların tür düzeyinde teşhis edilebilmeleri için, 16S rRNA sekans analizi gerçekleştirildi ve sonucunda, EA 1'in *Aerobacillus pallidus*'a, EA 2'nin *Anoxybacillus geothermalis*'a, EA 3'ün *Anoxybacillus mongoliensis*'a, EA 4'ün *Anoxybacillus rupiensis*'a, EA 5'in *Bacillus albus*'a, EA 6'nın *Bacillus halodurans*'a, EA 7'nin *Bacillus licheniformis*'a, EA 8'in *Bacillus paralicheniformis*'a, EA 9'un *Enterococcus faecium*'a, EA 10'un *Exiguabacterium profundum*'a ve EA 11'in *Paenibacillus dentritiformis* türlerine %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Aynı türe ait suşlar arasında ki 16S rRNA sekans analiz sonuçlarının %97'den fazla olması gerektiği bilgisinden yola çıkarak (Madigan and Martinko 2010), gerek konvensiyonel ve gerekse

de moleküler analiz verileri dikkate alındığında, ilgili test suşlarının benzerlik gösterdiği bakterilere ait izolatlar olduğu sonucuna varıldı.

Termostabil enzimler, endüstriyel ve biyoteknolojik proseslerde önemli rol oynadıklarından, bu çalışmada teşhis edilen izolatların enzim/multi enzim üretme potansiyelleri araştırıldı. Yapılan bu analizler sonucunda, EA 4 (*Anoxybacillus rupiensis*) ve EA 8 (*Bacillus paralicheniformis*) kodlu izolatların yüksek proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Hadj-Ali *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis*'in yüksek proteaz üretme yeteneğine sahip olduğunu gözlemler. Ancak *Anoxybacillus rupiensis* türü ile alakalı henüz proteaz enzim çalışması bulunmadığından, çalışmamızın daha sonraki basamaklarında EA 4 kodlu izolattan proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve literatüre kazandırılması hedeflenmektedir.

Ayrıca, EA 2 (*Anoxybacillus geothermalis*) ve EA 4 (*Anoxybacillus rupiensis*) kodlu izolatların yüksek amilaz enzim aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Yapılan literatür taraması sonucunda (Derekova *et al.* (2007; Yanmis *et al.* 2015) *A. rupiensis*'in amilaz üretim potansiyelinin belirlendiği çalışmaların varlığı tespit edilirken, *A. geothermalis* için ise herhangi bir kayda rastlanılmadı. Bu bilgilerden yola çıkarak, EA 2'den ilgili enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel alanda kullanılma potansiyelinin tespitine yönelik çalışmaların yapılması hedeflenmektedir.

Yine yapılan bu çalışmada; EA 2, EA 3, EA 4, EA 5, EA 7 kodlu izolatların yüksek lipaz aktivitesine, EA 6 kodlu izolat selülaz aktivitesine ve EA 2, EA 3, EA 7 ve EA 8 kodlu izolatların ise ksilanaz enzim aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür (Heck *et al.* 2006; Namsaraev *et al.* 2010; Rabbani *et al.* 2013; Bajaj *et al.* 2012; Rashid *et al.* 2013; Vijayaraghavan *et al.* 2016) verileri ile paralellik göstermektedir. EA 2 (*A. geothermalis*) ve EA 3 (*A. mongoliensis*) kodlu izolatlar ksilanaz enzimini üretme potansiyeline sahipken, literatürde bu konu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yönü dikkate alınarak, ileri ki çalışmalarda

biyoteknolojik uygulanabilirliğinin tespitine yönelik araştırmaların yapılması amaçlanmaktadır.

Elde edilen tüm bu veriler dikkate alındığında;

- Çalışmamızda termal kaynaklardan ilk defa *Enterococcus faecium* ve *Exiguobacterium profundum* izolatları elde edildi.
- Çalışmamızda rep-PCR yöntemlerinden BOX-PCR'ın, (GTG)<sub>5</sub>-PCR'a göre termofilik bakterilerin ayırımında daha etkili olduğu belirlendi.
- Çalışılan izolatlardan EA 2 (*Anoxybacillus geothermalis*), EA 4 (*Anoxybacillus rupiensis*) ve EA 8 (*Bacillus paralicheniformis*)'in multi-enzim üretme potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Bu da, test suşlarının (EA 2, EA 4 ve EA 8) endüstriyel alanda geniş bir kullanım potansiyeline sahip olabileceğini bize göstermektedir.
- Elde izolatlardan EA 2 (*A. geothermalis*)'nin amilaz ve ksilanaz aktivitesi, EA 3 (*A. mongoliensis*)'ün ksilanaz ve EA 4 (*A. rupiensis*)'ün proteaz üretme potansiyelleri ilk defa bu çalışma ile ortaya konuldu.

## KAYNAKLAR

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibjibjen, J., Ismaili, M., Amar, M., 2015. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (2), 443-453.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2015). *Enterococcus faecium* QU 50: a novel thermophilic lactic acid bacterium for high-yield l-lactic acid production from xylose. *FEMS microbiology letters*, 362(2), 1-7.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Acer, Ö., Pırınçcioğlu, H., Bekler, F. M., & Gül-Güven, R. (2015). *Anoxybacillus sp.* AH1, an  $\alpha$ -amylase-producing thermophilic bacterium isolated from Dargeçit hot spring. *Biologia*, 70(7), 853-862.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akdaş, H., 2012. Bazı Jeotermal Kaynaklardan Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Endüstriyel Öneme Sahip Enzimlerin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Alçıçek, E., 2018. Van İlinden Alınan Sıcak Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* EA10'dan Proteaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Amin, A., Ahmed, I., Salam, N., Kim, B., Singh, D., Zhi, X., Xiao, M., Li, W., 2017. Diversity and Distribution of Thermophilic Bacteria in Hot Springs of Pakistan. *Environmental Microbiology*, 2017 (74), 116-127.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Baltacı, Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Baltacı, O., Genc, B., Arslan, S., Adıgüzel, A. 2016. "Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary."

- Research an biotechnological enzyme potential  
10.1080/01490451.2015.1137662.
- Bajaj, B. K., and Manhas, K. (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 (C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 330-337.
- Beffa, T.; Blance, M.; Lyon. P.F.; Vogt, G.; Marchiani, M.; Lott-Fischer, J.; Aragno, M. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62, 1723- 1727
- Beffa, T.; Blance, M.; Lyon. P.F.; Vogt, G.; Marchiani, M.; Lott-Fischer, J.; Aragno, M. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62, 1723- 1727
- Dulger, S.; Demirbag, Z.; Beldüz, O. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54, 1499-1503.
- Beldüz, A. O.; Dulger, S.; Demirbag, Z. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53, 1315- 1320.
- Cao, Y., Guo, Q., Zhuang, Y., Yu, Z., Guo, W., Zhang, C., Zhu, M., Zhao, Q., Ren, T., 2017. Removal of harmful constituents from geothermal water by selected anion clays. *Science Direct*, 17, 161-164.
- Crapart, S., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Thomas, P., Sery, C., Ollivier, B., & Combet-Blanc, Y. (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(2), 287-292.
- Das, S., Dash, H., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., 2014. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2014 (103), 80-100.
- Derekova, A., Sjøholm, C., Mandeva, R., & Kambourova, M. (2007). *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*, 11(4), 577-583.
- Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., & Kim, S. J. (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3487-3492.
- El Hadj-Ali, N., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., & Nasri, M. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 515-523.
- El-Gayar, K. E., Al Abboud, M. A., & Essa, A. M. (2017). Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 743-753.
- Ercan, S., 2005. Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Palmieri, F., ... & Chain, P. S. (2016). *Anoxybacillus geothermalis* sp. nov., a facultatively

- anaerobic, endospore-forming bacterium isolated from mineral deposits in a geothermal station. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2944-2951.
- Gül, R., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 09(1), 1-10.
- Habib, N., Khan, I. U., Hussain, F., Zhou, E. M., Xiao, M., Ahmed, I., ... & Li, W. J. (2017). *Caldovatus sediminis* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(11), 4716-4721.
- Habib, N., Khan, I. U., Hussain, F., Zhou, E. M., Xiao, M., Dong, L., ... & Li, W. J. (2017). *Meiothermus luteus* sp. nov., a slightly thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2910-2914.
- Hana, Y., Lob, Y., Chengb, C., Yub, W., Nagarajanb, D., Liua, C., Li, Y., Chang, J., 2017. Calcium ion adsorption with extracellular proteins of thermophilic bacteria isolated from geothermal sites—A feasibility study. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 48-56.
- Harris, Kimberly A., et al. "A second RNA-binding protein is essential for ethanol tolerance provided by the bacterial OLE ribonucleoprotein complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2018): 201803191.
- Heck, J. X., Flôres, S. H., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. Z. (2006). Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresource Technology*, 97(15), 1902-1906.
- İnan, K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıçalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazın Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Khan, I. U., Habib, N., Hussain, F., Xian, W. D., Amin, A., Zhou, E. M., ... & Li, W. J. (2017). *Thermus caldifontis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2868-2872.
- Khan, I. U., Hussain, F., Tian, Y., Habib, N., Xian, W. D., Jiang, Z., ... & Li, W. J. (2017). *Tibeticola sediminis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1133-1139.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2499-2508.
- Madern, D., Ebel, C., & Zaccari, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91-98.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2009. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Onbirinci Baskıdan Çeviri, Syf 324-325.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2017. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ondördüncü Baskıdan Çeviri, Syf 158-162.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2017. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ondördüncü Baskıdan Çeviri, Syf 7-10.

- Mohammad, B., Daghistani, H., Jaouni, A., Latif, S., Kennes, C., 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*, 10.1155/2017/6943952.
- Muller, A., Rezende, J., Hubert, C., Kjeldsen, K., Lagkouvardos, I., Berry, D., Jorgensen, B., Loy, A., 2014. Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *Nature*, 2014 (8), 1153-1165.
- Namsaraev, Z. B., et al. "*Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia." *Microbiology* 79.4 (2010): 491-499.
- Norashirene, M. J., Zakiah, Y., Nurdiana, S., Hilwani, I. N., Khairiyah, M. S., & Arif, M. M. (2014). Identification of Cellulose-Hydrolytic Thermophiles Isolated from Sg. Klah Hot Spring Based On 16S rDNA Gene Sequence. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8(9), 1041-1044.
- Öztaş, E., 2017. Erzurum ili sıcak su kaynaklarından termofilik bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Pikuta, E.; Lysenko, A.; Chuvilskaya, N.; Mendrock, U.; Hippe, H.; Suzina, N.; Nikitin, D.; Osipov, G.; Laurinavichius, K. *Anoxybacillus pushchinensis* gen.nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* com. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50, 2109-2117.
- Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., ... & Zaghian, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1113-1119.
- Rashid, F. A. A., Rahim, R. A., Ibrahim, D., Balan, A., & Bakar, N. M. A. (2013). Purification and Properties of Thermostable Lipase from a Thermophilic Bacterium, *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. *JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY*, 7(3), 1635-1645.
- 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, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sarıgül, N., 2007. Ege Bölgesi'ndeki Çeşitli Sıcak Su Kaynaklarından *thermus* Genusu Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu ve  $\beta$ -galaktosidaz Aktivitesinin Saptanması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.



- Shahinyan, G., Margaryan, A., Panosyan, H., Trchounian, A., 2017. Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC Microbiology*, 10.1186/s12866-017-1016-4.
- Tambekar, D. H., Tambekar, S. D., Jadhav, A. S., & Babhulkar, B. V. (2016). Isolation and partial characterization of protease from *Bacillus halodurans* (AJ302709) from alkaline Lonar lake. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(11), 4546.
- Tarakçoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taslimi, P., Nadaroglu, H., and Adıguzel, A. (2013). Removal of some textile dyes from aqueous solution by using a catalase-peroxidase from *Aeribacillus pallidus* (P26). *J. Pure Appl. Microbiol*, 7(4), 2629.
- Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E., & Gutnick, D. L. (1999). *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 239-246.
- Türkiyede jeotermal kaynaklar ve uygulama haritası.<http://13harf2hece.blogspot.com/2016/11/tfc-atlas.html> (19.06.2018).
- Vijayaraghavan, P., Vincent, S. P., and Dhillon, G. S. (2016). Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by *Bacillus halodurans* IND18. *Waste management*, 48, 513-520.
- Yadav, P., Korpole, S., Prasad, G. S., Sahni, G., Maharjan, J., Sreerama, L., & Bhattarai, T. (2018). Morphological, enzymatic screening, and phylogenetic analysis of thermophilic bacilli isolated from five hot springs of Myagdi, Nepal. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 6(3), 1-8.
- Yanmis, D., Baltaci, M. O., Gulluce, M., and Adiguzel, A. (2015). Identification of thermophilic strains from geothermal areas in Turkey by using conventional and molecular techniques. *Res J Biotechnol*, 10(1), 39-45.

## ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2012 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

