



T.C.

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FINDIKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. SUŞLARINDA
ENZİM ÜRETME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE TANIMLANMASI

BURAK AKAYDİN

EKİM 2014

GİRESUN

T.C.

**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FINDIKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. SUŞLARINDA
ENZİM ÜRETME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE TANIMLANMASI**

BURAK AKAYDİN

EKİM 2014

GİRESUN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.... / / 2014

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Müdür

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve yüksek lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirildiğini onaylarız.

Doç. Dr. Hatice KATI

Danışman

JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Hatice KATI

Yrd. Doç. Dr. Cengiz MUTLU

Yrd. Doç. Dr. Hakan BEKTAŞ

ÖZET

FINDIKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. SUŞLARINDA ENZİM ÜRETME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE TANIMLANMASI

AKAYDİN, Burak

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Ekim 2014, 59 Sayfa

Bacillus cinsi bakteriler endüstriyel alanda kullanılan birçok enzimin kaynağıdır. *Bacillus*'lar tarafından sentezlenen enzimler ekmek üretimi, gıda, tekstil, çeşitli içecekler, deterjan, deri işletmeleri, yenilenebilir enerji kaynaklarından alkol üretimi, kozmetik, bileşiklerin sentezi gibi kimya alanının da dahil olduğu çok geniş kullanım alanı bulmuşlardır. Bu sebeple *Bacillus*'lar endüstriyel enzim üretiminde yoğun şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Trabzon ve Giresun illerinden toplanan fındık örneklerinden izole edilen, enzim üretme yeteneğine sahip beş *Bacillus* suşu morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler kullanılarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan F2, F16, F30 ve F36'da yüksek selüloz, F16 ve F28'de yüksek amilaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu altı izolat *Bacillus altitudinis* F2, *Bacillus safensis* F16, *Bacillus safensis* F28, *Bacillus firmus* F30 ve *Bacillus aerophilus* F36 olarak tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fındık, *Bacillus*, Enzim

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND INVESTIGATION OF ENZYME PRODUCTION
CAPABILITIES IN *Bacillus* sp. STRAINS ISOLATED FROM HAZELNUT

AKAYDİN, Burak

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice KATI

October 2014, 59 Pages

Members of the genus *Bacillus* are source of many enzymes used in the industrial field. Enzymes synthesized by *Bacillus* were widely used many industrial applications, for example bread making, food, textiles, beverages, detergents, leather processing, alcohol production from renewable energy sources, cosmetics, synthesis of compounds in the chemical field. Therefore, it is extensively used in the production of industrial enzymes.

In this study, five *Bacillus* strains producing several enzymes and isolated from hazelnut samples collected from Trabzon and Giresun were identified based on morphological, physiological, biochemical and molecular tests. According to test results; F2, F16, F30, and F36 isolates exhibited high cellulose activities. Also, F28 and F16 isolates detected high amylase activity. These isolates were identified as *Bacillus altitudinis* F2, *Bacillus safensis* F16, *Bacillus safensis* F28, *Bacillus firmus* F30 and *Bacillus aerophilus* F36.

Key Words: Hazelnut, *Bacillus*, Enzyme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin hazırlanıp yürütülmesinde her konuda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında beni destekleyerek yönlendiren danışmanım Sayın Doç. Dr. Hatice KATI'ya, teknik ve idari bakımdan her türlü desteği sağlayan Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İhsan AKYURT'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında beni her zaman destekleyen, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen değerli aileme ve Nisa AYDIN'a içten dileklerle teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus</i> 'lar Hakkında Genel Bilgi	2
1.1.1. <i>Bacillus</i> 'ların Habitatu.....	2
1.1.2. Koloni Morfolojisi.....	3
1.1.3. <i>Bacillus</i> Türlerinde Spor Oluşumu	3
1.1.4. <i>Bacillus</i> 'ların Metabolizması.....	4
1.1.5. <i>Bacillus</i> 'ların Genetik Yapısı	5
1.2. <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanımlanmaları	6
1.2.1. Morfolojik Tanımlama.....	6
1.2.2. Yağ Asit Profillerine Göre <i>Bacillus</i> 'ların Tanımlanması	6
1.2.3. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanımlanması	7
1.2.4. <i>Bacillus</i> Türlerinde Toplam Hücre Protein Profili	8
1.2.5. Moleküler Yöntemlerle Tanımlanmaları	9
1.3. <i>Bacillus</i> 'ların Önemi	11
1.4. Enzimler ve Endüstriyel Kullanım Alanları	13
1.5. Tezin Amacı	18
2. MATERYAL VE METOT	19
2.1. Örneklerinin Toplanması.....	19
2.2. <i>Bacillus</i> İzolasyonu	19
2.3. Saf Kültürlerin Oluşturulması	19
2.4. Stokların hazırlanması	19
2.5. İzolatların Çeşitli Boyama Yöntemleri İle Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	20
2.5.1. Gram Boyama	20

2.5.2. Spor Boyama.....	20
2.6. İzolatların Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	21
2.6.1. Lipaz Aktivitesi.....	21
2.6.2. Amilaz Aktivitesi.....	21
2.6.3. Kitinaz Aktivitesi.....	22
2.6.4. Selülaz Aktivitesi.....	22
2.6.5. Pektinaz Aktivitesi.....	22
2.6.6. Proteaz Aktivitesi.....	23
2.7. Yüksek Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerin Tanımlanmaları.....	23
2.7.1. VİTEK 2 Sistemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	23
2.7.2. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
2.7.2.1. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Saptanması.....	24
2.7.2.2. Optimum Büyüme pH Aralıklarının Saptanması.....	24
2.7.2.3. NaCl İhtiyacının Belirlenmesi.....	24
2.7.3. İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
2.7.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	24
2.7.3.2. PCR Yöntemiyle 16S rRNA Çoğaltılması.....	25
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
3.1. Enzim Aktiviteleri.....	30
3.2. VİTEK 2 Sistemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	34
3.3. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Saptanması.....	36
3.4. Optimum Büyüme pH Aralıklarının Saptanması.....	36
3.5. NaCl İhtiyacı.....	37
3.6. İzolatların Moleküler Tanımlanması.....	38
3.6.1. İzolatların 16S rRNA Analizleri.....	38
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR.....	44
EKLER.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	59

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo 3.1. İzolatların morfolojik özellikleri.....	28
Tablo 3.2. İzolatların lipaz aktivitesi sonuçları	31
Tablo 3.3. İzolatların enzim aktivitesi sonuçları.....	33
Tablo 3.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları	34
Tablo 3.5. İzolatların büyümeleri üzerine sıcaklığın etkisi.....	36
Tablo 3.6. İzolatların büyümeleri üzerine pH etkisi	37
Tablo 3.7. İzolatların büyümeleri üzerine NaCl etkisi.....	37
Tablo 3.8. İzolatların 16S rRNA Dizilerine Göre Türlerinin Tayinleri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Gram pozitif <i>Bacillus</i> 'un görünümü	27
Şekil 3.2. İzolatların enzim aktivitelerinin kantitatif olarak görünümü.....	30
Şekil 3.3. İzolatların 16S rRNA ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görünümü.....	38



1. GİRİŞ

Hücrelerdeki metabolik faaliyetleri yöneten özel katalizörlere enzim adı verilmiştir. Kimyasal metotlar ile gerçekleştirilmesi çok zor olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur. Enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Mikroorganizma kökenli enzimlerin biyoteknolojik işlemlerle daha ekonomik biçimde üretimi ve suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasındaki artış nedenleridir (Gümüşel, 2002).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin birçoğu *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak *Bacillus*'ların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik olması, stabiliteye sahip olması, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilebilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerin olduğu şeklinde bir dağılım belirlenmiştir (Rao ve ark., 1998; Kıran ve Çömlekçioğlu 2006).

1.1. *Bacillus*'lar Hakkında Genel Bilgi

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, endospora sahip, açık havada spor oluşturması engellenmeyen, Gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlarla bağlı mezo-diamino pimelik asitten oluşur (Özçelik, 1995). Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de vardır (Ayhan, 2000).

Bacillus cinsi ekstrem şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir (Bonwart, 1989).

1.1.1. *Bacillus*'ların Habitatu

Bacillus'lar, sporları nedeniyle birçok farklı çevreden izole edilebilirler (Zinn ve ark., 2001). Çok çeşitli topraklar asıl habitatını oluşturur (Nicholson ve ark., 1999). Toprak mikroflorasında yer alan *Bacillus*'lar besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* kompleks besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* gibi geliştirmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyan türlerde bulunur (Rosovitz ve ark., 1998). Birçok mikroorganizma çeşidi gibi *Bacillus*'lar içinde önemli bir habitat olan topraktaki farklı ortam şartları, mikroorganizma çeşidinin de artmasına yol açar. Genel olarak iyi havalanmış, nemli ve yüksek organik materyal içeren toprakları seçen mikroorganizmalar, toprağın ilk 10 cm'lik üst kısmında yüksek sayıda bulunurlar. Topraktaki populasyon yoğunluğunun büyük bir kısmını bakteriler oluşturur (Yılmaz, 2003).

Bacillus türleri topraktan başka bitki rizosferi, gıda ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinde bulunabilir. Ayrıca Mosquito, Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera

böceklerinin larvalarından da izole edilmiştir. *Bacillus* türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularda, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus*'lar ise ekstrem şartlarda büyüyebilme kapasitesindedirler ve üre içeren, uç pH değeri olan, asitli veya yüksek sıcaklıktaki ortamlardan izole edilebilirler (Rosovitz ve ark., 1998).

1.1.2. Koloni Morfolojisi

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah, kırmızımsı pigmentler üretebilirler (Rosovitz ve ark., 1998).

1.1.3. *Bacillus* Türlerinde Spor Oluşumu

Bacillus türlerinin en önemli özelliklerinden biri büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturmalarıdır. Endospor oluşumu, spor oluşturan hücrelerin şekli ve sporangiyumlar *Bacillus* türleri için karakteristiktir (Ustaçelebi, 1999).

Spor oluşması sırasında bakteri hücresi içinde birçok değişiklikler meydana gelir. Vejetatif hücrede aktif olan bazı genler aktivitelerini kaybederken sporların oluşmasında etkili olan genler aktivite kazanırlar. İlk olarak çekirdek sporun oluşacağı bölgeye yerleşir. Bunun etrafını çepeçevre çöküntü oluşturmak suretiyle katlanan sitoplazmik zar çevreler ve onu bakteri içerisinde ayrı bir bölümde ayırır. Oluşan bu çift zarın sentezlenmesi ile spora ait diğer bölümler oluşur. Bu şekilde oluşan sporlarda şu bölümler vardır: Birincisi çekirdek kısmı olup sporun protoplastını oluşturur. İçinde tam bir nükleus, protein sentezi için gerekli bütün bileşikler ve bir enerji yapıcı sistem bulunur. Sitokrom bulunmaz, fakat çeşitli enzimler bulunur. Sporların sıcaklığa dirençli olmaları yapılarında bol kalsiyum

dipikolinat bulunmasındandır. Sporlarda bulunan ikinci kısım spor duvarıdır. Spor protoplastını çevreler, yapısında peptidoglikan bulunur ve oluşacak bakterinin hücre çeperi buradan gelişir. Sporlarda bulunan üçüncü kısım kabuk, yani korteks kısmıdır.

Sporun en kalın tabakasıdır. Değişik yapıda peptidoglikan tabakası vardır. Kabuk kısmının dışında keratine benzer, proteinden yapılmış bir kılıf bulunur. En dışta da karbonhidratlı bir protein zar (ekzosporiyum) bulunur (Bilgehan, 1992; Errington, 2003).

Bacillus sporları sıcaklığa vejetatif hücrelerden 5-10 kez, UV ışımaya 7-50 kez daha dayanıklıdır. Sporu çevreleyen membranlar, korteks ve spor paltosu gibi yapılarla çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç de geliştirilmiştir (Rosovitz ve ark., 1998).

1.1.4. *Bacillus*'ların Metabolizması

Genelde prototrof oldukları halde, oksotrof türlere de rastlanır. *Bacillus*'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra, geniş fizyolojik yetenekleri ile de psikrofilikten termofiliğe; asidofilikten alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir. *Bacillus* sp. doğada geniş çapta yayılmaktadır. Çünkü bunların sporları olumsuz koşullara dayanıklıdır. *Bacillus* sp. laboratuvar kültüründe de yaygın kontaminantlardır (Ediz ve Beyatlı, 2005).

Aerobik ya da fakültatif anaerobik olan *Bacillus*'lar genelde Embden-Meyerhof izyolunu kullanırlar. Bunun yanı sıra heterolaktik (fosfoketolaz) iz yolunu kullananları (*Bacillus subtilis*) da vardır (Mignone ve Avignone-Rossa, 1996).

Terminal elektron alıcıları genelde oksijendir, ancak bazı türlerin elektron alıcısı NO_3 de olabilir, denitrifikasyon yapan türleri de (*Bacillus azotoformans*, *Bacillus licheniformis*) vardır. Bazı türler (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*) ise azotu fiske ederler. O_2 - CO_2 - H_2 veya O_2 - CO ortamlarında ototrofik yaşayan türlere (*Bacillus schlegelii*) de rastlanabilir (Rosovitz ve ark., 1998; Sneath, 1986). Aerobik

ortamlarda karbon kaynağı olarak organik asitleri (asetik asit, süksinik asit, laktik asit veya pirüvik asit) kullanarak heterotrofik olarak yaşayabilirler. Kemoorganotroftirler. Sadece bir tür fakültatif kemolitotroftur. Bazı türler aromatik veya hidroksi aromatik bileşenleri metabolize edebilirler ve bu nedenle benzin gibi meddelerin bioremediasyonunda kullanılabilirler.

Bazı *Bacillus* türlerinin (deoksi) nükleozidleri veya (deoksi) ribozları karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı da bildirilmektedir (Sgarrella ve ark., 1997).

1.1.5. *Bacillus*'ların Genetik Yapısı

Bacillus cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından ilginç sonuçlar vermektedir. Doğal bir cinste en fazla % 10-15 aralığında olması gereken % mol G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde % 32-69 arasında değişmektedir. Bu oranın aynı türdeki değişik suşlarda % 40-50 arasında olabildiği bildirilmektedir. Bu bilgiler belki de cinsin yeni cinslere bölünebileceğini göstermektedir (Rosovitz ve ark., 1998).

Plazmitler bazı prokaryotik organizmalarda hücrenin kendi büyük halkasal kromozomlarından ayrı olarak bulunan, konukçu hücrede kendiliğinden replike olabilen, çift zincirli, halkasal DNA molekülleridir. Plazmitler bakterilerin sitoplazmaları içinde bulunabilecekleri gibi, kromozomla da birleşebilirler. Plazmitler bir bakterinin yaşamı için gerekli değildir, ama bakterilere bazı özel yetenekler kazandırabilirler. Bazı durumlarda plazmitler ve kromozom arasında biyokimyasal yönden bir iş birliği gelişebildiği gibi bu işbirliği ters veya olumsuz yönde de gelişebilmektedir. *Bacillus* türlerine ait plazmitler *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. larvae*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. anthracis* gibi birçok türde araştırılmıştır (Chang, 2003).

1.2. *Bacillus* Türlerinin Tanımlanmaları

1.2.1. Morfolojik Tanımlama

Bacillus türlerinin tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları spor morfolojilerine göre de yapılabilmektedir. Sporun hücre içindeki yerleşimi ve şekli türler arasında farklılık göstermektedir. Spor morfolojilerine bağlı olarak *Bacillus* türleri üç gruba ayrılır. *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* var. *mycooides* büyük hücreli birinci grupta yer alır. Bu grubun sporogoniumları şişmemiştir. Gram pozitif çubuk şekilli hücrelerin genişliği 21 µm'dir ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit ya da silindirik sporlar oluştururlar. Poli-β-hidroksibütirat ve parasporal kristaller gibi protoplazmik inklüzyonlar büyük hücreli türlerde bulunur. Klinik olarak önemli *Bacillus* izolatlarının çoğu birinci grupta yer alır. İkinci grup türleri Gram değişkendir ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit sporlar ile şişkin bir sporangiyuma sahiptirler. Bu grupta başlıca *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popillae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* ve *B. brevis* yer alır. Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporogonium şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal ve terminal konumdadır. *B. sphaericus* bu gruba örnektir (Kolaylı ve Beyatlı, 2003).

1.2.2. Yağ Asit Profillerine Göre *Bacillus*'ların Tanımlanması

Mikroorganizmaların hücre yapılarında (sitoplazma ve hücresel membranlarda) fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakarit olarak bulunan yağ asitlerini, sayısına, çeşidine ve yüzde olarak miktarlarına göre tanımlayan sistem 1985 yılında geliştirilmiştir (Miller ve Berger, 1985). Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) olarak isimlendirilen bu yöntem, bilgisayar kontrolünde çalışmakta olup, gaz kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar ünitesi, bilgisayar ünitesiyle uyumlu çalışan kütüphaneler ve yazıcı olmak üzere 5 kısımdan meydana gelmektedir (Lelliott ve Stead, 1987). Anaerobik ve aerobik bakteriler, actinomycetes, maya ve gelişmiş funguslar bu sistem sayesinde kolaylıkla ve çok kısa sürede tanımlanabilmektedir (Miller ve Berger, 1985; Sasser, 1990; Dunfield ve ark., 1999; Buyer, 2002).

Yağ asitleri; içerdikleri karbon atomlarının sayısına, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısına, hangi karbon atomları arasında çift bağ olduğuna ve karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulmuş olup olmamalarına göre farklı isimler alırlar (Şahin, 2003).

Genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve yüzde olarak miktarları (yağ asitleri profili) aynıdır ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmez. Yağ asidi profillerindeki farklılıklar ise dolaylı olarak mikroorganizmalar arasındaki genetiksel farklılığı ifade etmektedir. Bu nedenle kültür ortamında çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı gerekse taksonomik sınıflarının saptanması için yağ asitleri profillerinin kullanılabilceği birçok bilimsel çalışma ile ispatlanmıştır (Şahin, 2003).

1.2.3. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanımlanması

Karbonhidratlar yapı ve depo molekülü olup, enerji kaynağıdır. Bakterilerin, çeşitli karbon kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanma ihtiyacında gösterdiği farklılıklar, tanı ve karakterizasyonda kullanılabilir. Bakteriler biyokimyasal, fizyolojik ve hayatsal faaliyetlerini sürdürmek için biyoenerjiye ihtiyaç duymakta ve dışarıdan aldıkları karbon kaynaklarını metabolik enzimlerle parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmektedirler.

Bakterilerin farklı karbon kaynaklarını (basit şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar, aminoasit benzeri moleküller) kullanımından gösterdikleri farklılıklar metabolik profil olarak adlandırılmaktadır ve profildeki bu farklılık sahip oldukları metabolik enzim çeşitliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Black ve Sweermore, 1994). Mikroorganizmaların taşıdığı bu enzim farklılığı ise onların familya düzeyinden başlayıp alt tür seviyesine kadar devam etmektedir. Ürünlerin metabolik aktivitesi pH indikatörleri aracılığı ile oluşan renk değişimi ile belirlenir (Konopka ve ark., 1998; Yılmaz, 2004).

Bakteriler arasındaki metabolik farklılıkları saptamak için farklı teknikler kullanılmaktadır. Son 20 yıldır otomatik bakteri tanımlama ve duyarlılık test sistemleri geliştirildi ve ticari olarak piyasada yer almaktadır. Ancak bu sistemlerden yalnızca birkaç tanesinden yararlanılmaktadır. Günümüzde, API ve VITEK teknikleri kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir. Bu sistemlerin temeli, sistemde kayıtlı referans organizmalar ile doğal organizmanın biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Üreme temelli testlerde son ürünün ölçülebilmesi için 18-24 saatlik inkübasyon süresi gerekir. Son ürünlerin metabolik aktivitesi pH indikatörleri aracılığı ile oluşan renk değişimi ile belirlenir.

1.2.4. *Bacillus* Türlerinde Toplam Hücre Protein Profili

Bacillus'ların tanımlanmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Ancak yapılan testler sonucunda yanlış tanımlamalar yapılarak, orijinal *Bacillus*'lardan bir veya birkaç yönden ayrı özellikte farklı tür altında değerlendirilmektedir. Bu durumda tür ayrımının güçleşmesine neden olmaktadır (Priest, 1993).

Protein jel elektorforezi mikrobiyal sistemlerde özellikle tür ve alt tür düzeylerinin belirlenmesinde en güvenilir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır. Bu teknik ile tür ve alt türlere ait suşların hücresel proteinleri karşılaştırılarak taksonomik akrabalık sınırları belirlenmektedir (Nick ve ark., 1999).

Tek bir toprak örneğinden izole edilen 10 *Bacillus thuringiensis* izolatu 3 antijenik sero gruba ayrılmış ve sivrisineklere karşı ılımlı larvasidal aktiviteler göstermiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda ise izolatlar arasında protein profilleri bakımından çok yüksek benzerliğin olduğu ve güçlü bir immünolojik akrabalığın bulunduğu görülmüştür (Ishii ve Ohba, 1993).

Hastalık etmeni olan *Bacillus cereus* bakteri türünün toplam hücre protein profili ve alt tiplendirilmesinin yapıldığı çalışmada, 58 *Bacillus cereus* izolatının bir biyotip varlığında 3 antibiyogram ve 22 toplam hücre protein profiline ulaştıkları görülmüştür. SDS-PAGE analizi ile *B. cereus* izolatları arasında % 38 oranında bir

benzerlik bulunduğu için heterojen bir yapı belirlenmiştir. Predominant özellik gösteren 13 *B. cereus* izolatu ile birlikte *B. cereus* ATCC 14579 suşunun polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) yapılan alt tiplendirilmesinde yaklaşık % 89 benzerlik görülmüştür. Toplam hücre protein profiline göre *Bacillus* cinsi bakterilerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve pilot epidemiyolojik çalışmalar için PCR'ın yanı sıra toplam hücre protein profillerinin yardımıyla da tiplendirmenin yapılacağı belirtilmiştir (Matar ve ark., 1996).

Diğer bir çalışmada *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinden de yararlanıldığı ve DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinin benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Buna göre *B. sphaericus* H5a5b suşunun benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu görülmüştür (Çökmüş ve Yousten, 1993).

Çökmüş ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada ise UV ile muamele edilmiş toksik *B. sphaericus* suşlarının larvasidal aktivitesini belirlemişlerdir. SDS-PAGE analizi ile moleküler ağırlıkları bilinen toksik protein bantların varlıkları araştırılmış ve bazı maddelerin gösterdiği koruyucu etkiler tespit edilmiştir.

B. cereus TZ415 suşunun toplam hücre protein profillerine göre farklı pH'larda ve farklı büyüme evrelerinde oluşturduğu aside dayanıklılık cevapları tespit edilmiştir. Bu suşun geç durgun fazda aside karşı tolerans düzeyinin en yüksek seviyeye ulaştığı ve bu toplam hücre protein profillerindeki değişiklikler ile belirlenmiştir (Jobin, 2002).

1.2.5. Moleküler Yöntemlerle Tanımlanmaları

Moleküler yöntemler, bakterilerin meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitlerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıklardan hareket edilerek oluşturulmuştur. Bu yöntemler, karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyali (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile bakterilerin tanı ve

karakterizasyonlarının yapılmasını sağlamaktadır (Manceau ve Horvais, 1997). Bu yöntemlerden birçoğu tek başına, alternatifsiz olarak kullanılabilen ve kısa zamanda çok sayıda örnek tür ve alttür seviyesinde tanımlama yapılabilir. Elde edilen sonuçlar oldukça hassas ve güvenilirdir. Sistemlerin pahalı oluşu ve yetişmiş elemanlarca yapılmasının gerekliliği moleküler yöntemlerin dezavantajını oluşturmaktadır.

16S rRNA Dizin Analizi, mikrobiyal tanımlama yöntemlerinin en önemlilerinden biri haline gelmiştir. Bu yöntemde her türün ribozomlarının 16S'lik küçük alt birimini kodlayan DNA sırasının oldukça özelleşmiş olmasından faydalanılır. Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakterilerin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. Gray ve arkadaşları (1984), 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkarmış ve bazı araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rRNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla özel primerler kullanarak arttırmışlardır (Relman ve ark., 1992). PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rRNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır.

Moleküler biyolojik yöntemlerle yapılan tür tayini çalışmalarında DNA-DNA homolojisi, T_m (DNA'nın çift sarmalının çözüldüğü sıcaklık değeri) ve 16S rRNA'yı kodlayan DNA fragmentinin sekans dizisinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Özellikle mikroorganizmalarda moleküler yapıların ve DNA dizilerinin, klasik fenotipik özelliklere göre evrimsel ilişkileri daha iyi ortaya çıkardığı görülmüştür. Bundan dolayı taksonların tanımlanmasında temel alınan hücresel seviyedeki çalışmalar moleküler düzeye (16S ve 18S rRNA dizi karşılaştırmaları) indirilmiştir (Temizkan, 1999).

DNA-DNA hibridizasyonu nükleik asit dizileri arasındaki benzerliğin ortaya çıkarılması prokaryotların sistematığının yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Böylece genomlar arasındaki benzerlikler gerçekçi bir şekilde ortaya çıkarılmaktadır. Nükleik asit sıralarının ortaya çıkarılması esasına dayanan karşılaştırma çalışmalarında daha çok in vitro nükleik asit hibridizasyonunu esas alan çalışmalar yapılmaktadır.

Yeni bakteri türlerinin ortaya çıkarılmasında en çok kabul edilen parametre genomlar arasındaki DNA benzerliğidir. DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı değerindeki benzerliğin oranı olarak ifade edilen bu değer mikroorganizmalar arasındaki uzaklığı göstermektedir. Bu değerler primer yapı seviyesinde genomik dizi benzerliğinin dolaylı bir yansımasıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Bu yüzden de DNA'nın ayrılıp yeniden birleşmesini konu edinen yaklaşımlar birbirleriyle çok yakın olan prokaryotların akrabalığının gösterilmesinde çok kullanışlı yöntemlerdir (Wayne ve ark., 1987). Yapılan birçok çalışmada, DNA benzerliği ile kemotaksonomik, genomik, serolojik ve fenotipik benzerlikler arasında ilişki olduğu bulunmuştur ve bundan dolayı, DNA'nın iki zincirinin yeniden birleşmesi, türlerin ayrılmasında standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Yapılan birçok çalışma sonucunda tam olarak tanımlanmış birçok türün suşları arasında optimum hibridizasyon şartları uygulandığında %70'den fazla benzerliğin olduğu görülmektedir. Yapılan bütün bu çalışmalar bakteriyel sistematik komitesinin tür tanımında DNA-DNA bağlanma derecesine verdiği öneme ışık tutmaktadır. Bu komitenin bir kararı, bir bakteri türünün suşları arasındaki ΔT_m derecesinin 5°C altındaki bir değerdeki DNA-DNA benzerliğinin % 70 veya daha fazla olması gereğini ortaya koymaktadır (Wayne ve ark., 1987).

1.3. *Bacillus*'ların Önemi

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çekmektedir. Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli

avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (Kim ve ark., 2005; Annamalai ve ark., 2011).

Günümüzde bilinen 8000 antibiyotığın kayıtlarda var olduğu belirtilmiş ve buna her yıl yüzlercesinin eklendiği ilave edilmektedir. Buna rağmen yeni antibiyotiklerin arayış ve keşfinin beklenildiği belirtilmiştir. Bu açıdan bakıldığında *Bacillus* genusu antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir (Eltem ve Uçar, 1998). Yapılan bir çalışmada *Bacillus* suşu sarımsağın rizosferinden elde edilmiştir. Suşun sarımsakta çürümeye yol açan *Fusarium oxysporum* üzerine etkisi araştırılmıştır. İzole edilen *Bacillus polymyxa* KT-8 suşu tarafından üretilen maddeye fusarisidin A adı verilmiştir. Madde funguslara karşı önemli ölçüde aktif, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu, bununla birlikte Gram negatif bakterilere karşı antimikrobal aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir (Kajimura ve Kaneda, 1996). Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi de ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı *Bacillus* türleri bacitracin (*B. licheniformis*), polymyxin (*B. polymyxa*), gramicidin (*B. brevis*), tyrocidine (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve bacilycin (*B. subtilis*) gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Bunların yanı sıra siklik lipoproteinlerden olan iturin (*B. subtilis*) birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır (Rosovitz ve ark., 1998).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmesi, zararlının kontrolünde güvenilir olması, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmaması ve endosporlarının doğada uzun süre kalması nedeniyle tercih edilmektedir (WHO, 1999). Biyoinsektisit olarak bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa gruplarına ait organizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil etmekte olup Lepidoptera (kelebekler), Diptera (sinekler, sivisinekler) ve Coleoptera (kın kanatlılar)'ları hedef almaktadır. Biyolojik mücadele de kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır. *B. thuringiensis* delta endotoksin olarak isimlendirilen protein yapıda ve biyolojik

olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler (Chattopadhyay ve ark., 2004).

Gelişen dünya şartları beraberinde aşırı plastik kullanımını da getirmiştir. Kullanılan bu plastiğin miktarı günümüzde korkunç boyutlara ulaşmıştır. Plastiklerin büyük bir çoğunluğu kullanımdan sonra ortama atık plastik olarak terk edilmektedir. Bu da beraberinde aşırı bir çevre kirliliğini getirmektedir. Günümüzde halen kullanılmakta olan plastik petrolden elde edilen polietilen maddesinden yapılmaktadır ki bunun tabiatta parçalanması yüzlerce yıl almaktadır. İşte bu sebeplerden dolayı bilim adamlarının dikkatini doğada *Bacillus*'lar tarafından parçalanabilen biyoplastik maddesi çekmiştir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003). Dave ve arkadaşları 1996 yılında yapmış oldukları bir çalışmada petrokimyasal atıklarda *Bacillus* cinsinin üretilmesi ve ürettikleri polihidroksibütirikasit (PHB) miktarını araştırmışlardır. 12 suş üzerinde yapılan çalışmada 10 *Bacillus* suşu PHB üretmiştir. Ortama glukoz ilavesi ile üretim 13 kat artmıştır. Karbon kaynağı olarak ortama asetat ve laktoz ilave edildiğinde PHB üretiminde azalma bulunmuştur.

1.4. Enzimler ve Endüstriyel Kullanım Alanları

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks moleküllerdir. Enzimler in vitro koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu enzimleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*'lar, ürettikleri enzimler nedeniyle ticari öneme de sahiptirler. *Bacillus*'ların ürettiği endüstriyel enzimlere örnek verecek olursak selülaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2005; Annamalai ve ark., 2011).

Amilazlar, biracılık ve damıtma, kağıt, fermantasyon, gıda, tekstil ve nişastanın şekerleştirme uygulamalarında (Rezaei ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2010; Annamalai ve ark., 2011b; Asgher ve ark., 2007) yaygın bir kullanım göstermekle birlikte, klinik, medikal ve analitik kimya gibi diğer bazı alanlarda da

kullanılmaktadırlar (Reddy, 2003). Deterjanlardaki enzimler, daha verimli bir yıkamanın oluşabilmesi için kirlilikleri küçük parçalara ayırır ve onların uzaklaştırılmasını arttırır. Bu amaçla amilazlar nişasta ve türevlerinin uzaklaştırılması için kullanılır (Tanaka ve Hoshino, 1999; Paulo ve Gübitz, 2003; Souza ve Magalhaes, 2010). α -amilazlar 1970'lerin başlangıcından beri deterjanlarda kullanılmaktadırlar. Amilazlar biracılıkta arpadan malt eldesi sırasında arpanın nişasta içeren endosperminin parçalanmasında kullanılmış olup, oluşan pürelerin filtrasyonları hem daha hızlı hem de daha kolay gerçekleştirilmektedir (Aehle, 2007). Tekstil ürünlerinin dokuma işlemlerinde daha sağlam olması için uygulanan haşılama işleminden sonra nişastanın uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Paulo ve Gübitz, 2003; Aiyer, 2005; Aehle, 2007; Souza ve Magalhaes, 2010). Bazı araştırmacılar tarafından amilaz aktivitesi gösteren *Bacillus subtilis* (Matsuzaki ve ark., 1974), *Bacillus amyloliquefaciens* (Borgia ve Campell, 1978), *Bacillus caldolyticus* (Grootegoed ve ark., 1973), *Bacillus coagulans* (Bliesmer ve Hartman., 1973), *Bacillus licheniformis* (Meer, 1972; Saito, 1973), *Bacillus Macerans* (Lane ve Pirt, 1973), *Bacillus stearothermophilus* (Ogasahara ve ark., 1970) ve *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* (Matsuzaki ve ark., 1974) türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Selülazlar biracılık, gıda, kağıt ve kağıt hamuru ile tekstil endüstrilerinde geniş uygulama alanı bulmuştur (Das ve ark., 2010). Günümüzde selülazların kullanıldığı çok farklı alanlar vardır. Selülazlar gıda endüstrisinde, zeytinyağlarının ayrılmasında, meyve nektar ve pürelerinin üretiminde, meyve ve sebze içeceklerinin berraklaştırılması gibi alanlarda yoğun şekilde kullanılmaktadırlar (Sukumaran ve ark., 2005). Kullanılmış kağıtlar, gazete kağıtları ve ambalaj kağıtları geri dönüşüm için önemli bir kaynaktır. Kağıtlardaki mürekkeplerin enzimatik yolla uzaklaştırılması, günümüzde kimyasal uygulamanın yerini almış durumdadır (Schafer ve ark., 2007). Yemlerin besin değerlerini artırmak amacıyla tek mideli ve geniş getiren hayvan yemlerinin üretimi için kullanılmışlardır (Kıran ve ark, 2006). Selülazlara ek olarak pektinaz ve hemiselülazlar gibi enzim karışımları yemlerin besin değerlerini artırmak için günlük yemlerine ilave edilmişlerdir (Sukumaran ve ark., 2005). Selülaz aktivitesi gösteren *Bacillus subtilis* (Soutschek-Bauer ve Staudenbauer, 1987), *Bacillus stearothermophilus* (Soutschek-Bauer ve

Staudenbauer, 1987) ve *Bacillus sphaericus* (Singh ve ark., 2004) türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Lipazların başlıca ticari kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz satışının %32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Yaklaşık olarak 13 milyar ton deterjana 1000 ton kadar lipaz eklemesi yapılmaktadır. Az miktarda lipaz gıda, kağıt, süt, kozmetik, pestisit, insektisit, ilaç ve çeşitli kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda, farklı kullanım amaçlı (endüstriyel kullanım, ev içi kullanımlar, çamaşır, bulaşık, toz temizleyiciler vb.) deterjanlarda temizleme gücü artırımı hedeflenerek enzim katkıları kullanılmaya başlanmıştır (Sharma ve ark., 2009). Bazı araştırmacılar tarafından lipaz aktivitesi gösteren *Bacillus pumilus* (Kim ve ark., 2002), *Bacillus alcalophilus* (Ghanem ve ark., 2000) ve *Bacillus thermoleovorans* (Castro-Ochoa ve ark., 2005) türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Proteazlar; protein moleküllerini parçalayarak çamaşırlardaki lekeleri çıkarabilecek veya deterjan içeriğindeki diğer maddelerle çözünebilecek hale getirmektedir. İdeal deterjan proteazları, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için, geniş substrat özgüllüğüne sahip olmalıdır. Deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun izoelektrik noktasıdır. Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Ayrıca bir proteazın izo elektirik nokta değeri ne kadar yüksekse, o proteaz o kadar yüksek pH'larda etki gösterebilmektedir (Çelik, 2006). Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalara göre kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel dericilikteki banyo işlemi, deri üretim proseslerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ham deri yapısında bulunan globüler proteinler parçalanmakta ve bu yapıların açılımı sağlanmaktadır (Mukhtar ve Haq 2008). Buğday unu fırıncılıkta en önemli bileşendir. Fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten maddesi, suda çözünmeyen bir proteindir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo ve eksoproteazlar sınırlı bir proteoliz ile buğday

glutenini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Fungal proteazlar, beyaz ekmekek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fungal proteazların aşırı miktarları, ekmeği hamurumsu bir hale getirmektedir. Enzim ilavesi özellikle sert ve elastiki hamurlar için uygundur. Hamura yapılan enzimatik muamele, hamurun elle veya makine ile üretimini kolaylaştırır, böylece ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretilmesini sağlar. Proteazların ilavesi ile artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık %25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004; Celik, 2006). Bu alanda asidik mantar proteazlar amilazlarla birlikte kullanılarak ürünün tadına ve aromasına da etki etmektedir (Krajewska, 2003). Proteazlar, kozmetikte kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenoz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının proteolitik hidroliziyle elde edilmektedir (Langmaier ve ark., 2002).

Kitinazlar organizmalar arasında oldukça yoğun bir dağılım gösterir. Bu dağılım bakteriler, mantarlar, yüksek bitkiler, böcekler, kabuklular ve bazı omurgalıları içermektedir (Flach ve ark., 1992). Kitinazların bu organizmalardaki rolleri çok çeşitlilik gösterir (Shubakov ve Kucheryavykh, 2004). Bitkiler, mantarlara karşı savunma mekanizması olarak kitinaz üretirler. Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalar. Kitinaz geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler fungusid ve insektisid özellikler kazanmakta ve böyle transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle savaşabilmektedir. Doğal olarak genotipinde kitinaz geni bulunduran bazı bitkiler bilinmektedir. Örn; akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe ağaçlarının sağlıklı gövde ve kök dokularında β -1,3-glukanaz ve kitinaz varlığı tespit edilmiş ve bu enzimlerin bu ağaçlarda patojen olan *Armillaria mellea*'nin hif çeperlerinin erimesine sebep olduğu bildirilmiştir. Bakteriler tarafından üretilen kitinaz ise, kitini karbon (C) ve enerji kaynağı olarak kullanma amacına yöneliktir (Leah ve ark., 1995). Endokitinazlar, ekzokitinazlar, beta-N-Asetilglüköaminidazlar ve kitobiazlar olarak sınıflandırılan kitinazların, kitin ve onun türevlerini parçaladıkları bilinmektedir. Endokitinazlar kitin polimerini içten parçalayarak ekzokitinazlar da kitobiozu bir uçtan salıvererek işlev görürler. Beta-Nasetil glikozaminidaz N-asetil glikoz amin monomerlerini kitinden çıkarır bu

durumda kitobiaz da kitobiozu N-asetil glikozamine hidroliz eder. Kitinazlar birçok mikrobiyal türlerin bünyesinde barınmaktadır. *Serratia*, *Bacillus*, *Vibrio* türlerinin birçok kitinolitik enzim salgıladıkları ve kitin bağlayan protein ihtiva ederek bunların kitini sinerjistik olarak parçaladığı ve ekstraselüler çevreye salgıladıkları bilinmektedir (Suzuki ve ark., 1998). *Bacillus* türleri arasında kitinaz ve kitobiaz dağılımı incelenmiş ve *Bacillus licheniformis* 2X-70 suşunda termostabil kitinaz aktivitesi olduğunu saptamıştır. *Bacillus circulans* yaban tipi (wild type) 12 suşu kültür besiyeri içine kitinazı salgılama yeteneğindedir. Bakteri içerisinde teşvik edici substrat olarak kitin ihtiva eden besiyerinde üretildiği zaman, 6 ayı kitinaz enzimini salgılamakta ve enzim kültürün süpernatantından elde edilebilmektedir. Kitinaz A-1'in kitine karşı yüksek düzeyde affinitesi olduğu ve kitinaz sistemi içerisinde kitinazı parçalaması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. *Bacillus circulans* 4.1 suşunun kitini yüksek pH'da (6-12) parçaladığı ve bu organizmadan kitinazın kısım kısım saflaştırılarak elde edildiği ve elde edilen kitinazın da güve larvaları üzerine toksik etkili olduğu saptanmıştır. *Bacillus thuringiensis*'in böcekler üzerindeki toksisitesi kitinaz kodlayan gen tarafından artırılabilir (Rojas-Avelizapa ve ark., 1999).

Pektinazlar 60 yıldan daha fazla süredir gıda ve meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır. Ticari pektinaz üretiminde kullanılan asıl mikroorganizma *Aspergillus niger*'dir. Pektinazlar elma, armut, üzüm, turuncgiller, kuru erik gibi meyve sularının domates suyu gibi sebze sularının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Yüksek poligalakturonaz aktivitesine sahip pektik enzimlerin kullanımı ile meyve sularındaki bulanıklığın kararlı hale gelmesi başarılmıştır. Pektin parçalayan enzimler gıda endüstrisinde özellikle meyve sularının berraklaştırılmasında, meyve suyu üretiminde filtrasyonu kolaylaştırıp verimin artırılmasında, C vitamini sentezi için çıkış maddesi olan galakturonik asit eldesinde, şarap endüstrisinde, yağların ekstraksiyonunda, pigmentlerin ve selüloz fiberlerin hazırlanmasında, kahve ve çay fermantasyonunda fonksiyonel gıda maddeleri olarak oligosakkaritlerin üretiminde yeni uygulamalar için kullanılmaktadırlar (Telefoncu, 1997; Phutela ve ark., 2005; Patil ve ark., 2006; Botella ve ark., 2007).

1.5. Tezin Amacı

Bu çalışmada Trabzon ve Giresun'dan toplanan fındıklardan *Bacillus* izolasyonu yapılarak, bu izolatlarda bazı enzimleri (lipaz, amilaz, selülaz, proteaz, kitinaz, pektinaz) üretme yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yüksek enzim aktivitesi gösteren *Bacillus* izolatları fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizleri yapılarak tanımlanmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Örneklerinin Toplanması

Çalışma için kullanılacak olan fındık örnekleri Trabzon ve Giresun illerinden toplandı. Farklı lokasyonlardan toplanan fındık örneklerinin her birine bir numara verildi.

2.2. *Bacillus* İzolasyonu

Her bir lokasyondan toplanan fındıklardan 10'ar adet alınarak 250 ml'lik beherlere konuldu. Üzerlerine 5 ml nutrient broth eklendi ve karıştırıldı. Her bir beherden deney tüplerine 3 ml Nutrient Broth (NB) alınarak 30°C de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 65°C de yarım saat bekletildi. Her bir tüpten 200 µl alınarak Nutrient Agar (NA) besiyerine yayma ekimleri yapıldı. 30°C'lik etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.3. Saf Kültürlerin Oluşturulması

Yayma ekim sonuçları incelendi. Her bir petriden rastgele 5 koloni seçilerek nutrient agar besiyerine çizgi ekimleri yapıldı. 30°C'lik etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.4. Stokların hazırlanması

Stoklama işlemi ise Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine ekilmiş taze kültürler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lik steril gliserol içerisinde -20°C'lerde muhafaza edilmiştir.

2.5. İzolatların Çeşitli Boyama Yöntemleri İle Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.5.1. Gram Boyama

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyamadır. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglukan tabakaları incedir. Gram pozitif olarak boyananlar ise kalın bir peptidoglukan tabakasına sahiptir. Bu yüzden farklı renkte boyanırlar. Boyamada çeşitliliği bu unsur sağlar.

Gram boyama için genç kültürlerden (24 saatten az) smear hazırlandı. 60 saniye kadar kristal viyole ile muamele edildikten sonra saf su ile boya yıkandı. 60 saniye kadar lugol ile muamele edildi ve saf suyla yıkama işlemi yapıldı. Aseton alkol ile 20 saniye kadar yıkama işlemi yapıldı. Son olarak safranin 30-60 saniye kadar uygulandı. Son kez saf su ile yıkanarak mikroskop altında incelendi ve mor renkli bakteriler Gram pozitif olarak değerlendirildi.

2.5.2. Spor Boyama

Endospor, bazı bakterilerin uygun olmayan hayat şartlarında oluşturdukları, çoğu dış etkiye dayanıklı olan yapılardır. İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığı ve endospor hücre içindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla yaşlı kültürler (2-5 günlük) kullanıldı. Kültürlerden smear yapıldıktan sonra sporları gözlemek için Coomassie Brilliant Blue kullanıldı. Coomassie Brilliant Blue boyası smear üzerine damlatılarak 3-4 dakika bekletildi ve saf suyla yıkanarak mikroskopta spor şekilleri incelendi.

2.6. İzolatların Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.1. Lipaz Aktivitesi

Tween 20, Tween 80 ve Tribütirin agar besiyerlerine her bir izolattan nokta ekimler yapıldı ve 30°C de 3 gün inkübe edildi. Tween 20 ve Tween 80 besiyeride kolonilerin etrafında kristal yapılar gözlenmesi ve tribütirin besiyerinde ise şeffaf zonların oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Tween 20, Tween 80 ve Tribütirin Besiyerleri; %1 Tripton, %0,5 Maya ekstraktı, %0,5 NaCl, %0,01 CaCl₂.2H₂O (pH 7.2), 100 ml dH₂O, %1 oranında da istenilen besiyeriye göre Tween 20, Tween 80 ve Tributirin içermektedir.

Aktivite gösteren bakteriler daha sonraki aşamada Rhodamin B besiyerine ekildi ve 1 gece 30°C de inkübe edildi. Transilluminatorde Ultra viole (UV) ışık altında (365 nm) bakıldığında besiyeride koloniler çevresinde turuncu renkli yapılar gözlenmesi lipaz aktivitesini belirtir (Kugiyama, 1980).

Rhodamin B besiyeri; 10 ml Rhodamin B boyası (1mg/ml), 8g Nutrient broth, 4g NaCl, 16g Agar, 25ml zeytinyağı ve 1L dH₂O içermektedir.

2.6.2. Amilaz Aktivitesi

Amilaz aktivitesi için nişasta agar besiyerine nokta ekimler yapıldı. 30°C de 1 gece inkübe edildi. Büyüme gözlendikten sonra koloniler üzerine iyot solüsyonu (I₂= 1g, KI=2g /300ml) damlatıldı ve seffaf zonlara bakılarak amilaz aktivitesi belirlendi (Sambrook ve Russell, 2001; Çoşkun, 2010).

Amilaz besiyeri; 10g Tripton, 5g Maya Ekstraktı, 10g NaCl, 15g Agar, 5g Nişasta ve 1L dH₂O içermektedir.

2.6.3. Kitinaz Aktivitesi

Kitinaz aktivitesi için kitin besiyerine nokta ekimler yapıldı ve 10 gün 30°C de inkübasyona bırakıldı. Kitinaz aktivitesi besiyeride seffaf zon oluşumu ile gözlemlendi (Roberts ve Selitrennikoff, 1988; Okay, 2005).

Kitinaz besiyeri için 100 mg koloidal kitin 20 ml dH₂O çözüldükten sonra 1.6 g NB, 2 g agar ve 80 ml dH₂O içeren karışıma ilave edildi.

2.6.4. Selülaz Aktivitesi

Selülaz aktivitesi için karboksimetilselülaz (CMC) içeren besiyeri kullanıldı. Selülaz besiyerine nokta ekimler yapıldı ve 1 gece 30° de inkübe edildi. Büyüme gözlemlendikten sonra besiyerini kaplayacak şekilde kongo kırmızısı eklendi. 15 dakika bekledikten sonra boya döküldü. Tekrar besiyeri üzerine 1 M NaCl eklendi ve 15 dakika bekletildi ve selülaz aktivitesi kırmızı ortamda sarı zon oluşumuyla gözlemlendi (Sambrook ve Russell, 2001; Çoşkun, 2010).

Selülaz besiyeri; 10g Tripton, 5g Maya Ekstraktı, 10g NaCl, 15g Agar, 1g CMC ve 1L dH₂O içermektedir.

2.6.5. Pektinaz Aktivitesi

Pektinaz varlığını araştırmak için aşağıdaki besiyerleri kullanıldı. 30 °C'de 3-4 günlük inkübasyon sonucunda hazırlanan 1% (w/v) cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) solüsyonu oluşan koloniler üzerine döküldü. Oda sıcaklığında 10 dak. bekletikten sonra kolonilerin etrafında açık zon oluşumu bakterilerin pektinaz ürettiğini gösterir (Kobayashit ve ark.,1999; Altan, 2004). Pektinaz besiyeri için iki metot kullanıldı.

Birinci metot; 1g Maya ekstraktı, 2g Amonyumsülfat, 6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g Pektin (Casein) ve 20g Agar içermektedir.

İkinci metot; 1g Amonyum sülfat, 6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g Polygalacturonicacid ve 20g Agar içermektedir.

2.6.6. Proteaz Aktivitesi

Bacillus suşlarında proteaz aktivitesini araştırmak için jelatin içeren besiyeri kullanıldı. Besiyerilerine ekilen *Bacillus*'lar 30°C'de iki gün inkübe edildikten sonra bakterilerin etrafında tespit edilen zonlar proteaz aktivitesi için pozitif sonuçtur (Josephine ve ark., 2012).

Proteaz besiyeri; 2g K₂HPO₄, 1g glukoz, 5g pepton, 15g agar, 15g jelatin ve 1L H₂O içermektedir.

2.7. Yüksek Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerin Tanımlanmaları

2.7.1. VİTEK 2 Sistemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatlar nutrient agara ekim yapılarak bir günlük inkübasyon sonrası biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Giresun İl Kontrol Laboratuvarı Mikrobiyoloji Analiz Birimi'nde bulunan VİTEK 2 cihazı kullanıldı.

VİTEK 2 sisteminde (bioMe'rieux) flurosan temelli bir teknolojiyi kullanmaktadır. Sistemde sıvı dilüsyon bazlı Gram pozitif, Gram negatif, maya ve küf gibi organizmaların tanımlanmalarını sağlayan 64 tane kuyucuklu kartlar kullanılmaktadır (Verweij ve ark., 1999; Pincus, 2002).

Kültür sistemi bu plastik kartlardır. Test edilecek bakteri süspansiyonu, kapiller yoluyla kuyucuklara geçer ve kuyucuklardaki kimyasal ajanlar ile rehidrate olur. Kısa sürede üreyen bakterilerin bulanıklık oluşturması, besiyerinde türbidimetrik olarak ölçülür. Üremenin lineer regresyon analizi ve algoritmalar ile minimal inhibisyon konsantrasyonu belirlenir.

2.7.2. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.7.2.1. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Saptanması

İzolatların büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine ekim yapıldı. Her bir örnek 25°C, 30°C, 40°C ve 50°C'ye ayarlı su banyolarında 16-24 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede (OD 600 nm'de) ölçümleri yapıldı. Bu sayede izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları belirlendi.

2.7.2.2. Optimum Büyüme pH Aralıklarının Saptanması

İzolatların büyüebildiği pH aralıklarının belirlenmesi için değişik pH değerlerine (5, 6, 7, 8, 9) sahip TSB besiyerine inoküle edildi. Her bir izolat maksimum büyüme sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede (OD 600 nm'de) ölçümler yapılarak izolatların maksimum ve minimum büyüebileceği pH değerleri tespit edildi.

2.7.2.3. NaCl İhtiyacının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %2, %5, %7 ve %9 oranlarında NaCl eklenmiş TSB besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 4'er ml deney tüplerine alınarak her bir izolattan ekim yapıldı. 1 gün boyunca uygun sıcaklığa ayarlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede (OD 600 nm'de) ölçümler yapılarak izolatların hangi oranda tuzu tolere edebildiklerine belirlendi.

2.7.3. İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.7.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yöntemle göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlar NB besiyerinde

30°C'de bir gece inkübe edilerek üretilmiştir. Elde edilen sıvı kültür iki kez oda sıcaklığında 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant kısmı dökülerek pelletin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilmiş ve pellet çözülmüştür. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslenmiş ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için, 50 µl %10'luk SDS eklenerek 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda, tüpe 3 M'lık 0,1 hacim 55 µl sodyum asetat (pH 5,2) eklenerek 65°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Üzerine 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilmiş ve 4 dakika 13000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınıp temiz tüpe bırakılmıştır. Bu tüpe tekrar 500 µl kloroform eklenmiş ve alt-üst edilerek 13000 rpm'de tekrar 4 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra üst sıvı kısım yeni tüpe alınmıştır. Bu sıvı kısma 0,1 hacim (55 µl) 3 M sodyum asetat ve 2 hacim (1000 µl) %96'lık etanol ilave edilmiş ve -20 °C'de 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımdaki sıvı boşaltılmıştır. Kalan peltenin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki sıvı dökülerek pellet açık havada kurutulmuştur. Elde edilen DNA pelleti, 50-100 µl TE tamponun'da çözülmüş, agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.7.3.2. PCR Yöntemiyle 16S rRNA Çoğaltılması

İzole edilen DNA'ların 16S rRNA gen analizi yapılabilmesi için aşağıdaki primerler kullanılmıştır.

Forward, 5'–ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA–3';

Reverse, 5'–ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA–3'.

Elimizdeki izolatların 16S rRNA gen analizlerinin yapılabilmesi için yukarıdaki primerler kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon 50 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. PCR tüpüne, 2,5 ünite Go Taq DNA polimeraz, 10 µl 5x

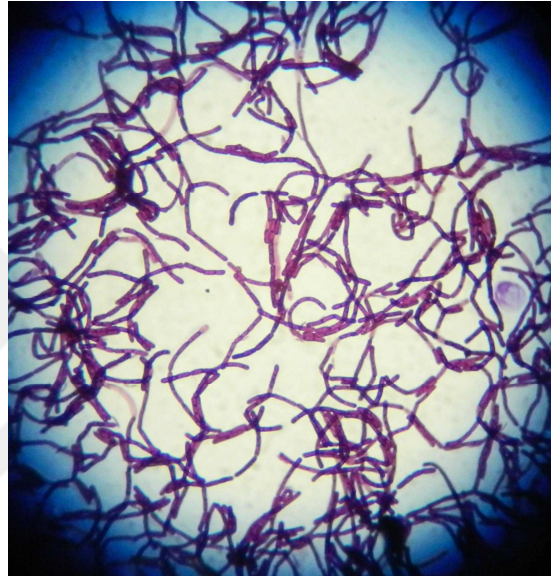
PCR tamponu (10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 2,5 mM MgCl₂, 1,5 µl 1 mM ileri primeri, 1,5 µl 1 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 95°C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir (Riffard ve ark., 1998). PCR reaksiyonu, 10 mg/ml EtBr ihtiva eden %1'lik agaroz jelde 80V'da 45 dakika yürütülerek, jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri ilgili firmaya (Macrogen, Hollanda) gönderilerek sekansları gerçekleştirildi. Sekans sonucunda elde edilen 16S rRNA genleri NCBI gen bankasında bulunan diğer 16S rRNA genleri ile Blast (basic local alignment search tool) programı kullanılarak karşılaştırması yapıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu alıőmada Trabzon ve Giresun illerinin 9 farklı lokasyondan toplanan fındık örneklerinden 115 bakteri örneği izole edildi. Bu örnekler Gram boyama sonucu 29 izolatın *Bacillus* olduğu belirlendi (Şekil 3.1). Koloni morfolojisi stereo mikroskop altında incelendi (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. Gram pozitif *Bacillus*'un görünümü

Tablo 3.1. İzolatların morfolojik özellikleri

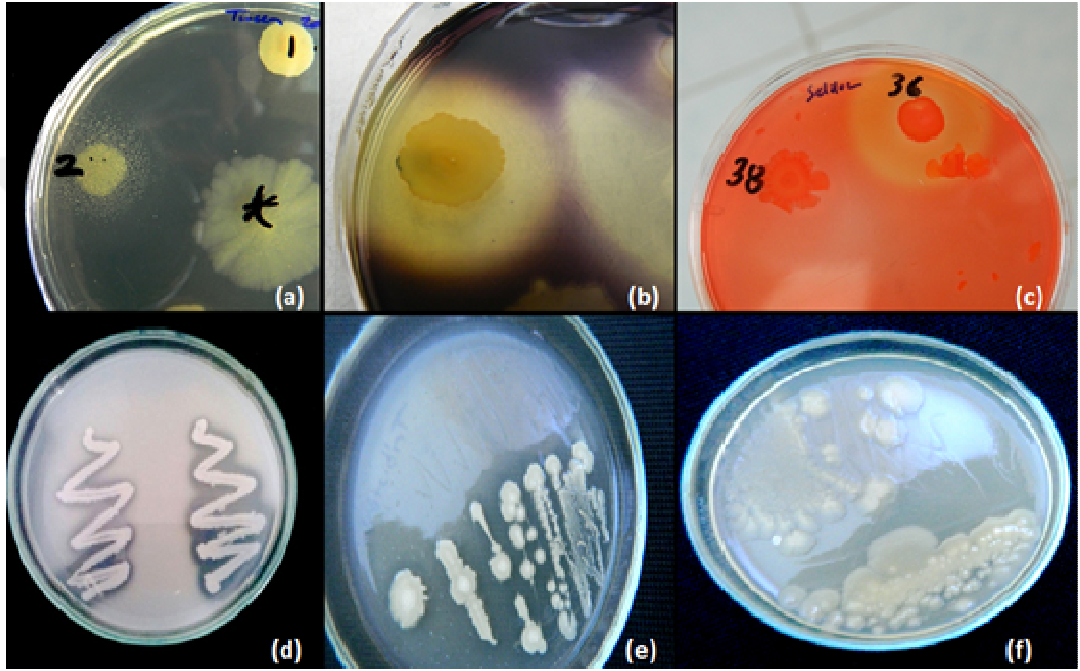
İzolatlar	Bölge	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Bakteri Şekli	Gram Boyama	Spor
F1	Giresun	Beyaz	Pürüzlü dış hat şekilsiz yuvarlak	Streptobasil	+	Merkezi
F2	Giresun	Beyaz	Dış hat şekilsiz yuvarlak	Basil	+	Terminal
F4	Giresun	Beyaz	Merkez koyu yuvarlak	Streptobasil	+	Terminal
F8	Giresun	Beyaz	Dış hat koyu yuvarlak	Streptobasil	+	Terminal
F9	Beşikdüzü	Saydam	Şekilsiz mukus benzeri	Streptobasil	+	Terminal
F10	Düzköy	Beyaz	Merkezi koyu dış hat dumansı yuvarlak	Streptobasil	+	Terminal
F11	Düzköy	Beyaz	Merkez koyu yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F12	Düzköy	Beyaz	Pürüzlü dış hat koyu	Streptobasil	+	Merkezi
F13	Düzköy	Beyaz	Merkezde koyu halka yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F14	Düzköy	Beyaz	Merkezde koyu halka yuvarlak	Streptobasil	+	Merkezi
F15	Düzköy	Beyaz	Dışhat koyu yuvarlak	Basil	+	Terminal
F16	Akçaabat	Beyaz	Dış hat şekilsiz	Streptobasil	+	Merkezi
F17	Akçaabat	Beyaz	Yuvarlak	Streptobasil	+	Merkezi
F18	Akçaabat	Saydam	Yuvarlak	Basil	+	Terminal
F20	Akçaabat	Beyaz	Yuvarlak	Streptobasil	+	Subterminal
F22	Trabzon	Beyaz	Dış hattı koyu yuvarlak	Basil	+	Terminal
F23	Trabzon	Saydam	Yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F24	Trabzon	Beyaz	Merkez koyu yuvarlak	Basil	+	Terminal
F25	Yomra	Beyaz	Merkez koyu yuvarlak	Basil	+	Terminal
F27	Pelitli	Sarı	Merkez koyu yuvarlak	Basil	+	Terminal
F28	Pelitli	Beyaz	Dış hat şekilsiz	Basil	+	Merkezi
F29	Pelitli	Beyaz	Yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F30	Pelitli	Kırmızı	Yuvarlak	Basil	+	Subterminal

Tablo 3.1. (devam)

İzolatlar	Bölge	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Bakteri Şekli	Gram Boyama	Spor
F32	Pelitli	Sarı	Yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F34	Köprübaşı	Beyaz	Yuvarlak	Basil	+	Merkezi
F35	Köprübaşı	Beyaz	Pürüzlü yuvarlak	Streptobasil	+	Merkezi
F36	Köprübaşı	Beyaz	Pürüzlü şekilsiz	Basil	+	Terminal
F38	Görelle	Beyaz	Parlak yuvarlak	Streptobasil	+	Merkezi
F39	Görelle	Beyaz	Dış hat açık renk yuvarlak	Basil	+	Terminal

3.1. Enzim Aktiviteleri

İzole edilen 29 *Bacillus* sp. suşlarının lipaz, amilaz, selüloz, kitinaz, pektinaz ve proteaz aktivitelerine bakıldı. İzolatların 6 tanesinde amilaz, 9 tanesinde selüloz, 3 tanesinde kitinaz ve 5 tanesinde de proteaz aktivitesi görülürken lipaz ve pektinaz aktivitesi hiç birinde görülmedi (Şekil 3.2; Tablo 3.2, 3.3).



Şekil 3.2. İzolatların enzim aktivitelerinin kantitatif olarak görünüşleri.

- (a) Tween 20 besiyerinde kristal yapıların görünümü;
- (b) Amilaz aktivitesi; (c) Selüloz aktivitesi;
- (d) Proteaz aktivitesi; (e) Kitinaz aktivitesi;
- (f) Tribütirin aktivitesi

Tablo 3.2. İzolatların lipaz aktivitesi sonuçları

İZOLATLAR	LİPAZ			
	TWEEN 20	TWEEN 80	TRİBÜTİRİN	RHODAMİN B
F1	-	-	-	-
F2	++	+	-	-
F4		-	-	-
F8	+	-	-	-
F9	-	-	-	-
F10	-	-	-	-
F11	+	-	-	-
F12	-	-	-	-
F13	-	-	-	-
F14	-	-	-	-
F15	-	-	-	-
F16	++	-	-	-
F17	+	-	-	-
F18	+	++	-	+
F20	-	-	-	-
F22	-	-	-	-
F23	+++	+	-	-
F24	-	-	-	-
F25	-	-	-	-
F27	-	-	-	-
F28	+	-	-	-
F29	++	-	-	-
F30	++	-	-	-

Tablo 3.2. (devam)

İZOLATLAR	LİPAZ			
	TWEEN 20	TWEEN 80	TRİBÜTİRİN	RHODAMİN B
F32	-	-	-	-
F34	-	-	-	-
F35	+	-	-	-
F36	++	+	-	-
F38	-	-	-	-
F39	-	-	-	-

(+):Düşük aktivite; (++): İyi aktivite; (+++): Yüksek aktivite, (-): Aktivite yok

Tablo 3.3. İzolatların enzim aktivitesi sonuçları

İZOLATLAR	AMİLAZ	SELÜLAZ	KİTİNAZ	PROTEAZ	PEKTİNAZ
F1	-	-	-	-	-
F2	-	+++	+	+	-
F4	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	-
F9	-	-	-	+	-
F10	+	-	-	-	-
F11	-	-	-	-	-
F12	-	-	-	-	-
F13	-	++	-	-	-
F14	-	-	-	-	-
F15	-	++	-	-	-
F16	+++	+++	+	+	-
F17	-	-	-	-	-
F18	+	-	-	-	-
F20	-	-	-	-	-
F22	-	-	-	-	-
F23	-	+	+	-	-
F24	-	-	-	-	-
F25	-	-	-	-	-
F27	-	-	-	-	-
F28	+++	+	-	+	-
F29	-	++	-	-	-
F30	+	+++	-	-	-

Tablo 3.3. (devam)

İZOLATLAR	AMİLAZ	SELÜLAZ	KİTİNAZ	PROTEAZ	PEKTİNAZ
F32	-	-	-	+	-
F34	+	-	-	-	-
F35	-	-	-	-	-
F36	-	+++	-	-	-
F38	-	-	-	-	-
F39	-	-	-	-	-

(+):Düşük aktivite; (++): İyi aktivite; (+++): Yüksek aktivite, (-): Aktivite yok

3.2. VITEK 2 Sistemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyokimyasal özelliklerini tespit etmek ve tanımlama yapabilmek için VITEK 2 sistemi kullanılmıştır. Yüksek enzim aktivitesi gösteren izolatların biyokimyasal özellikleri Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları

TESTLER	İZOLATLAR				
	2	16	28	30	36
BETA-XYLOSIDASE	+	+	+	+	-
L-lysin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	-
L-aspartat-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	-
Leucin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	+
Fenylalanin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	(+)
L-prolin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	-
BETA-GALACTOSIDASE	(+)	+	+	-	+
L-pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-	+	+
ALFA-GALACTOSIDASE	-	-	+	+	+

Tablo 3.4. (devam)

TESTLER	İZOLATLAR				
	2	16	28	30	36
Alanin-ARYLAMIDASE	-	-	+	-	(-)
Tyrosin-ARYLAMIDASE	-	-	(+)	+	+
BETA-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE	-	-	(+)	-	+
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	+	+	(+)	+
CYCLODEXTRIN	-	-	-	-	+
D-GALACTOSE	-	-	-	-	-
GLYCOGEN	-	-	-	-	(+)
myo-INOSITOL	+	+	+	+	-
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSID- acidifikasyon	+	+	-	-	+
ELLMAN	-	-	-	-	+
METHYL-D-XYLOSID	-	-	-	-	-
ALFA-MANNOSIDASE	+	+	+	-	-
MALTOTRIOSE	+	-	-	(+)	+
Glycin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-	-
D-MANNITOL	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	+	+	+	+	+
D-MELEZITOSE	-	-	-	+	-
N-ACETYL-D-GLUCOSAMIN	+	-	-	+	-
PALATINOSE	-	-	-	-	+
L-RHAMNOSE	-	-	-	+	-
BETA-GLUCOSIDASE	+	+	+	+	+
BETA-MANNOSIDASE	-	-	-	-	-
FOSFORYLCHOLIN	-	-	-	-	-
PYRUVAT PVATE	(+)	(+)	+	-	+
ALFA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-	-
D-TAGATOSE	+	+	+	-	+
D-TREHALOSE	(+)	(+)	+	-	+
INULIN	+	+	+	+	+
D-GLUKOSE	-	-	-	+	+
D-RIBOSE	(-)	-	-	+	+
PUTRESCIN-assimilation	-	-	-	-	-
VÆKST I 6,5% NaCl	+	+	+	-	+
KANAMYCIN-RESISTENS	-	-	-	-	-
OLEANDOMYCIN-RESISTENS	+	+	+	+	+
AESKULIN-hydrolyse	+	+	+	+	+
TETRAZOLIUM-RØD	+	+	+	-	(+)
POLYMYXIN	-	-	-	-	-

+ : pozitif; - : negatif; (+): pozitive yakın; (-): negatife yakın

3.3. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Saptanması

Elde edilen enzim aktivitesi sonuçlarına göre yüksek aktivite gösteren 5 *Bacillus* sp. suşu üzerinde 25°C, 30 °C, 40°C ve 50°C deki sıcaklıklarda büyüme sonuçları Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. İzolatların büyümeleri üzerine sıcaklığın etkisi

İZOLAT NO	20°C	30°C	40°C	50°C
F2	-	+	++	ZB
F16	+	++	ZB	ZB
F28	+	++	+	ZB
F30	-	+	++	++
F36	+	++	ZB	-

(+):Büyüme var; (++) : Optimum büyüme; (ZB): Zayıf büyüme, (-):Büyüme yok

3.4. Optimum Büyüme pH Aralıklarının Saptanması

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarına göre pH değerleri 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlanan TSB besiyerindeki büyüme sonuçları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. İzolatların büyümeleri üzerine pH etkisi

İZOLAT NO	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
F2	-	ZB	ZB	ZB	-
F16	-	+	+	++	+
F28	-	+	+	+	+
F30	-	-	+	+	+
F36	ZB	+	+	++	++

(+):Büyüme var; (++): Optimum büyüme; (ZB): Zayıf büyüme, (-):Büyüme yok

3.5. NaCl İhtiyacı

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarına göre tuzluluk oranları %2, %5, %7 ve %9 olarak ayarlanan TSB besiyerindeki büyüme sonuçları Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. İzolatların büyümeleri üzerine NaCl etkisi

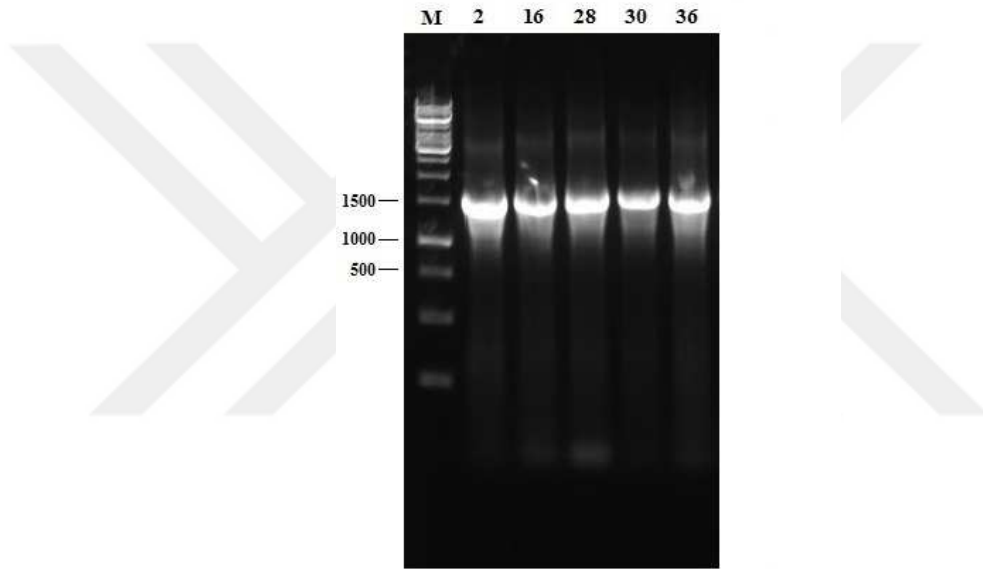
İZOLAT NO	%2 NaCl	%5 NaCl	%7 NaCl	%9 NaCl
F2	ZB	-	-	-
F16	++	+	+	+
F28	++	+	ZB	ZB
F30	++	+	-	-
F36	++	++	+	+

(+): Büyüme var; (++): Optimum büyüme; (ZB): Zayıf büyüme, (-):Büyüme yok

3.6. İzolatların Moleküler Tanımlanması

3.6.1. İzolatların 16S rRNA Analizleri

İzolatların 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda yaklaşık 1400 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İzolatların 16S rRNA ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görünümü

İzolatların çoğaltılan 16S rRNA'larının sekansları NCBI gen bankasında karşılaştırıldıktan sonra benzediği bakteriler tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. İzolatların 16S rRNA Dizilerine Göre Türlerinin Tayinleri

İzolat No	Kayıt No	16S rRNA Dizisine Göre En Fazla Benzediği Bakteri	%
F2	JX293284	<i>Bacillus pumilus</i> strain D51	99
F2	KC414717	<i>Bacillus altitudinis</i> strain KUDC1738	99
F2	KC414715	<i>Bacillus aerophilus</i> strain KUDC1736	99
F2	HQ625386	<i>Bacillus safensis</i> strain RRLKE1	98
F2	JX680136	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain MCCC 1A00009	98
F16	JN210909	<i>Bacillus pumilus</i> strain WS31	99
F16	KC414720	<i>Bacillus aerophilus</i> strain KUDC1741	99
F16	KC414710	<i>Bacillus altitudinis</i> strain KUDC1731	99
F16	JX094180	<i>Bacillus safensis</i> strain E3-2	99
F16	JX680075	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain MCCC 1A00440	99
F28	JF411308	<i>Bacillus safensis</i> strain KM8	99
F28	JF746161	<i>Bacillus pumilus</i> strain SY28	99
F28	KC414715	<i>Bacillus aerophilus</i> strain KUDC1736	99
F28	KJ009497	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 2-Sj-3-3-3-M	99
F28	KF535147	<i>Bacillus altitudinis</i> strain BAB-1830	98
F28	HQ704705	<i>Bacillus subtilis</i> strain C301	98
F30	KF944305	<i>Bacillus infantis</i> strain BW-02	98
F30	HQ397586	<i>Bacillus firmus</i> strain BSCS3	98
F30	NR_118438	<i>Bacillus drentensis</i> strain LMG 21831	98
F36	KF933672	<i>Bacillus pumilus</i> strain HNS75	99
F36	KJ716453	<i>Bacillus altitudinis</i> strain VIT-JPAN	99
F36	KJ575038	<i>Bacillus aerophilus</i> strain NIOT-Ch-27	99
F36	KF668462	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain IHB B 6832	99
F36	JQ283971	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain SF-19	99

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Rao ve ark., 1998; Wolfgang, 2004). Mikroorganizma kaynaklı enzimler; katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, ekstrem koşullarda çalışabilmeleri, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasından dolayı tercih edilmektedirler. Bu enzimler ekstrem sıcaklık, tuz ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterebilmektedirler (Horikoshi, 1999). Sentezlenen enzimler gıda, tekstil, ekmek üretimi, deterjan, çeşitli içecekler, deri işletmeleri, biyoremediasyon, yenilenebilir enerji kaynaklarından alkol üretimi, kozmetik, kiral bileşiklerin sentezi gibi kimya ve farmasötik alanında dahil olduğu çok yaygın bir kullanım alanı bulmuşlardır (Niehaus ve ark., 1999).

Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. *Bacillus* sp. suşları, proteolitik enzimler ve karbohidratazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar. (Aygan, 2008). *Bacillus* türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel amilaz, selülaz, proteaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig, 1998).

Bu çalışmada fındıktan 29 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiştir. Bu izolatların lipaz, amilaz, selülaz, proteaz, kitinaz ve pektinaz aktivitelerine bakıldı. Beş *Bacillus* sp. suşunda yüksek enzim aktivitesi belirlendi.

F2 izolatu Gram pozitif, beyaz renkli ve yuvarlak kolonilere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bakteri Tween 20, Tween 80 agar besiyerlerinde aktivite göstermiş fakat Rhodamin B agar besiyerinde aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre lipaz aktivitesi sahip olmadığı tespit edildi. Ancak bu bakteride kitinaz, proteaz ve yüksek selülaz aktivitesi olduğu belirlendi. Sıcaklık deneyinde 30-50°C aralığında büyüdüğü, optimum büyüme sıcaklığının 40°C olduğu tespit edildi. Tuzluluk toleransının %2, pH büyüme aralığının 6-8 olduğu saptandı. Sekans sonuçlarına göre

F2 numaralı izolat %99 oranlarında *Bacillus pumilus*, *B. altitudinis*, *B. aerophilus* ve %98 oranında *B. safensis*, *B. stratosphericus* olarak belirlenmiştir. Shivaji ve arkadaşlarının 2006 yılında yüksek rakımlarda hava örnekleri toplamak için kullanılan kriyojenik tüplerden *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus* ve *B. altitudinis* izolasyonu adlı makalesinde *B. altitudinis*'in Gram pozitif, beyaz renkte yuvarlak kolonili, lipaz aktivitesinin negatif, büyüme sıcaklığının 8-45°C, tuzluluk toleransının %2, büyüebileceği pH aralığının 5-8 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerinden myo-inositol, N-acetyl-D-glucosamin, inulin aktivitelerinin de benzer olduğu görülmüştür. Morfolojik özellikler ve VITEK 2 sistemiyle belirlenen biyokimyasal testler ile 16S rRNA sonuçlarına göre F2 numaralı izolatın *B. altitudinis* bir suşu olabileceğine karar verildi.

F16 suşu Gram pozitif, beyaz renkli ve şekilsiz kolonilere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bakteri Tween 20 agar besiyerinde aktivite göstermiş fakat Rhodamin B agar besiyerinde aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre lipaz aktivitesi olmadığı tespit edildi. Ancak bu bakteride kitinaz, proteaz, yüksek selülaz ve amilaz aktivitesi olduğu belirlendi. Sıcaklık deneyinde 20-50°C aralığında büyüdüğü, optimum büyüme sıcaklığının 30°C olduğu tespit edildi. Optimum tuzluluk toleransının %2-9, pH büyüme aralığının 6-9, optimum pH 8 olduğu saptandı. Sekans sonuçlarına göre F16 numaralı izolatın %99 oranlarında *B. pumilus*, *B. aerophilus*, *B. altitudinis*, *B. safensis* ve *B. stratosphericus* olarak belirlenmiştir. Masataka ve arkadaşlarının 2006 yılında uzay aracı ve montaj tesis yüzeylerinden *B. safensis* izolasyonu adlı yaptıkları çalışmada, *B. safensis*'in Gram pozitif, beyaz renkte şekilsiz kolonili, büyüme sıcaklığının 10-50°C, optimum büyüme sıcaklığı 30-37°C, tuzluluk toleransının %10, büyüebileceği pH aralığının 5-6 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerinden Beta-Galactosidase, Beta-N-Acetylglucosaminidase, D-Mannitol, D-Mannose, D-Melezitose, Beta-Glucosidase, Alfa-Glucosidase, D-Glukose aktivitelerinin de benzer olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak F16 numaralı izolatın *B. safensis* bakterisinin bir suşu olduğuna karar verildi.

F28 suşu Gram pozitif, beyaz renkli ve şekilsiz kolonilere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bakteri Tween 20 agar besiyerinde aktivite göstermiş fakat

Rhodamin B agar besiyeride aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre lipaz aktivitesi olmadığı tespit edildi. Ancak bu bakteride proteaz, selüloz ve yüksek amilaz aktivitesi olduğu belirlendi. Sıcaklık deneyinde 20-50°C aralığında büyüdüğü, optimum büyüme sıcaklığının 30°C olduğu tespit edildi. Optimum tuzluluk toleransının %2-9, pH büyüme aralığının 6-9 olduğu saptandı. Sekans sonuçlarına göre F28 numaralı izolatın %99 oranlarında *B. pumilus*, *B. aerophilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus* ve %98 oranlarında *B. altitudinis*, *B. subtilis* olarak belirlenmiştir. Masataka ve arkadaşlarının 2006 yılında uzay aracı ve montaj tesis yüzeylerinden *B. safensis* izolasyonu adlı yaptıkları çalışmada, *B. safensis*'in Gram pozitif, beyaz renkte şekilsiz kolonili, büyüme sıcaklığının 10-50°C, optimum büyüme sıcaklığı 30-37°C, tuzluluk toleransının %10, büyüyebileceği pH aralığının 5-6 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerinden Beta-Galactosidase, Beta-N-Acetylglucosaminidase, D-Mannitol, D-Mannose, D-Melezitose, Beta-Glucosidase, Alfa-Glucosidase, D-Glukose aktivitelerinin de benzer olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu bakteri F16 numaralı izolat ile de benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak F28 numaralı izolatın *B. safensis* bakterisinin bir suşu olabileceği düşünülmektedir.

F30 suşu Gram pozitif, beyaz renkli kırmızımsı pigment üreten ve yuvarlak kolonilere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bakteri Tween 20 agar besiyerinde aktivite göstermiş fakat Rhodamin B agar besiyeride aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre lipaz aktivitesi olmadığı tespit edildi. Ancak bu bakteride amilaz ve yüksek selüloz aktivitesi olduğu belirlendi. Sıcaklık deneyinde 30-50°C aralığında büyüdüğü, optimum büyüme sıcaklığının 30-40°C olduğu tespit edildi. Optimum tuzluluk toleransının %2, pH büyüme aralığının 7-9 olarak saptandı. Sekans sonuçlarına göre F30 numaralı izolatın %98 oranlarında *B. infantis*, *B. firmus*, *B. drentensis*; VITEK 2 sonuçlarına göre %87 oranında *B. coagulans* olarak belirlenmiştir. Gordon ve arkadaşları 1977 yılında *B. firmus* ve *B. lentus* türlerini karşılaştırdıkları çalışmada, *B. firmus*'un Gram pozitif, pembe pigment üreten yuvarlak kolonili, optimum büyüme sıcaklığının 35°C ve tuzluluk toleransının %7 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerinden glikoz ve mannitol aktivitelerinin aynı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak F30 numaralı bakterinin *B. firmus* bakterisine benzer suş olduğu belirlendi.

F36 suşu Gram pozitif, beyaz renkli ve şekilsiz kolonilere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bakteri Tween 20, Tween 80 agar besiyerinde aktivite göstermiş fakat Rhodamin B agar besiyerinde aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre lipaz aktivitesi olmadığı tespit edildi. Ancak bu bakteride yüksek selüloz aktivitesi olduğu belirlendi. Sıcaklık deneyinde 20-40°C aralığında büyüdüğü, optimum büyüme sıcaklığının 30°C olduğu tespit edildi. Tuzluluk toleransının %2-9, pH büyüme aralığının 5-9, optimum pH aralığı 8-9 olarak saptandı. Sekans sonuçlarına göre F36 numaralı izolatın %99 oranlarında *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus* ve %98 oranında *P. Polymyxa*; VITEK 2 sonuçlarına göre %85 oranında *B. licheniformis* olarak belirlenmiştir. Shivaji ve arkadaşlarının 2006 yılında yüksek rakımlarda hava örnekleri toplamak için kullanılan kriyojenik tüplerden *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus* ve *B. altitudinis* izolasyonu adlı çalışmalarında, *B. aerophilus*'un Gram pozitif, beyaz renkte şekilsiz kolonili, büyüme sıcaklığının 8-37°C, tuzluluk toleransının %11.6, büyüebileceği pH aralığının 6-10 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerinden myo-inositol, N-acetyl-D-glucosamin, inulin aktivitelerinin de benzer olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak F36 numaralı izolatın *B. aerophilus* olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- AEHLE, W., 2007. Enzymes in Industry Production and Applications. Third, Completely Revised Edition. Wiley-Vch Verlag Gmbh and Co, KGaA, Germany, pp. 99-262.
- AIYER, P. V., 2005. Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology* 4 (13): 1525-1529.
- ALTAN, A., 2004. Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills. Yüksek lisans Tezi.
- ANNAMALAI, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., ve Balasubramanian, T., 2011. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal Microbiology*, 51:424-429.
- ASGHER, M., Asad, M. J., Rahman, S. U. ve Legge, R.L., 2007. A Thermostable α -Amylase from a Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing. *Journal of Food Engineering* (79): 950–955.
- AYHAN, K., 2000. *Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, pp. 43-44, Sim Matbaacılık Ltd, Ankara.
- AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- BİLGEHAN, H., 1992. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilim*. Barış Yayınları, İzmir, pp. 42-47.
- BLACK, R. ve Sweetmore, A., 1994. Appropriate Bacterial Identification Systems For Small Plant Pathology Laboratories Overseas Incorporating The Biolog Method. *Plant Pathology* 43, 438-441.
- BLIESMER, B.O. ve Hartman, P.A., 1973. Differential Heat Stabilities of *Bacillus subtilis* Amylases. *Journal of Bacteriology* 113, 526-528.
- BONWART, G. J., 1989. *Basic Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold, pp. 773, New York.
- BORGIA, P. T. ve Campbell. L. L., 1978. α -Amylases from Five Strains of *Bacillus amyloliquefaciens*. Evidence for Identical Primary Structures *Journal Bacteriology* 134 (2):389-393.

- BOTELLA, C., Diaz, A., Ory, I., Webb, C. ve Blandino, A., 2006. Xylanase and Pectinase Production by *Aspergillus awamori* on Grape Pomace in Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, (42): 98-101.
- BUYER, J. S., 2002. Identification of Bacteria from Single Colonies by Fatty Acid Analysis. *Journal of Microbiological Methods* 48, pp. 259-265.
- CASTRO-OCHOA, L. D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G. ve Ros, R. O., 2005. Screening, Purification and Characterization of The Thermoalkalophilic Lipase Produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 37, pp. 648-654.
- CHANG, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. ve Liu, H. W., 2003. PCR Assay of The GroEL Gene for Detection and Differentiation of *Bacillus cereus* Group Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4502-4510.
- CHATTOPADHYAY, A., Bhatnaga, N. B. ve Bhatnagar, R., 2004. Bacterial Insecticidal Toxins. *Critical Reviews in Microbiology* 30 (1): 33-54.
- ÇOŞKUN, A., 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi.
- ÇELİK, N. 2006. *Bacillus Clausii* Gmbae 42'den Saflastırılan Alkalin Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu²⁺ İyonları ile Termostabilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, pp.11-56, Kocaeli.
- ÇÖKMÜŞ, C. ve Yousten, A. A., 1993. Bacteriocin Production by *Bacillus sphaericus*. *The Journal of Invertebrate Pathology* (61): 323-325.
- ÇÖKMÜŞ, C., Sayar, H., Saçılık, S. C., Osmanağaoğlu, Ö. ve Berber, I., 2000. Effects of UV-light on *Bacillus sphaericus* and Its Protection by chemicals. *Journal of Basic, Microbiology* 40 (4): 215-221.
- DAS, A., Bhattacharya, S. ve Murali, L., 2010. Production of Cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from Cow Dung. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Sciences* 8 (6): 685-691.
- DAVE, H., Ramakrishna, C. ve Desai, J. D., 1996. Production of Polyhidroxy Butyrate by Petrochemical Activated Sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. *Indian Journal of Experimental Biology* 34, pp. 216-219.
- DUNFIELD, K. E., Xavier, L. J. C. ve Germida, J. J., 1999. Identification of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium* sp. (Cicer) Strains Using a Custom Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Profile Library. *Journal of Applied Microbiology* 86, pp. 78-86.

- EDİZ, N. ve Beyatlı, Y., 2005. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* (5): 1-22.
- ELTEM, R. ve Uçar, F., 1998. Bir Soda (Na₂SO₄) Gölü Olan Denizli (Acıgöl)' den İzole Edilmiş 23 *Bacillus* Suşunun Antimikrobiyal Aktivite Spekturumlarının Saptanması. *Kükem Dergisi* 21 (1): 57-64.
- FADİLOĞLU, S. ve Erkmen O., 2004. Gıda Sanayinde Enzimlerin Önemi. Gaziantep Üniversitesi, *Bilimsel yayınlar kataloğu*, pp. 1-16.
- FLACH, J., Plet, P. E. ve Jolles, P. 1992. *What's the new in chitinase research?*. *Experientia* (48): 701-716.
- GHANEM, E. H., Al-Sayed, H. A. ve Saleh, K. M., 2000. An Alkalophilic Thermostable Lipase Produced by a New Isolate of *Bacillus alcalophilus*. *The World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, pp. 459-464.
- GOODFELLOW, A. ve O'Donnell, G., 1993. Root of Bacterial Systematics, *Handbook of New Bacterial Systematics*, Goodfellow, M., O'Donnell, A. G., Eds., Academic Pres Ltd., London.
- GORDON, R. E., HYDE, J. L. ve MOORE, J. A., 1977. *Bacillus firmus*-*Bacillus lentus*: a Series or One Species?. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27 (3): 256-262.
- GRAY, M. W., Sankoff, D. ve Cedergren, R. J., 1984. On The Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A global Phlogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 12, pp. 5837- 5852.
- GROOTEGOED, J.E., Lauvers, A.M. ve Heinen, W., 1973. Separation and Partial Purification of Extracellular Amylase and Protease from *Bacillus caldolyticus*. *Archives of Microbiology* 90, pp. 223-232.
- GÜMÜŞEL, F., 2002. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. *Kocaeli Sanayii için Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi*, pp. 73-135.
- HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (63): 735-750.
- ISHII, T. ve Ohba, M., 1993. Characterization of mosquito spesific *Bacillus thuringiensis* strains coisolated from a soil population. *Systematic Applied Microbiology* 16 (3): 494-499.
- JAOUA, S., Zouari, N., Tounsi, S. ve Ellouz, R., 1996. Study of the Delta Endotoxins Produced by Three Recently Isolated Strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* 145 (3): 349-354.

- JOBIN, M. P., Clavel, T., Carlin, F. ve Schmitt, P., 2002. Acid Tolerance Response is Low-pH and Late-Stationary Growth Phase Inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology*, in Pres, pp. 2495.
- JOSEPHINE, F. S., Ramya, V. S, Neelam, D., Suresh, B. G., Siddalingeshwara, K. G., Venugopal, N. ve Vishwanatha, T., 2012. Isolation, Production and Characterization of Protease from *Bacillus* sp Isolated from Soil Sample. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2 (1): 163-168.
- KAJIMURA, Y. ve Kaneda, M., 1996. Fusaricidin A, a New Depsipeptide Antibiotic Produced by *Bacillus Polymyxa* KT-8 Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. *The Journal of Antibiotics* 49 (2): 129-135.
- KIRAN, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, *Fen ve Mühendislik Dergisi* 9 (1): 12-19.
- KIM, J. Y., Hur S. H., ve Hong J. H., 2005. Purification and Characterization of an Alkaline Cellulase from A Newlyisolated Alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnology Letters* (27): 313–316.
- KIM, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B. ve Oh, T. K., 2002. Expression and Characterization of Ca²⁺-Independent Lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 205–212.
- KOBAYASHIT HATADA, Y., Higaki, N., Lusterio, D. D., Ozawa, T., Koike, K., Kawai, S. ve Ito, S., 1999. Enzymatic Properties and Deduced Amino Acid Sequence of A High Alkaline Pectatylase from An Alkaliphilic *Bacillus* İsolate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427, pp. 145-154.
- KOLAYLI, E. ve Beyatlı, Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 01 (12): 24-35.
- KONOPKA, A., Oliver, L. ve Turco, R. F., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Enviromental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology* 35, pp. 103- 115.
- KRAJEWSKA, B., 2003. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations. *Enzyme and Microbial Technology* (35): 126-139.
- KUGIYAMA, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. ve Tagagi., Y., 1980. Molecular cloning and nucleotide sequence of lipase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 14,185–190.

- KUMAR, G. S., Chandra, M. S., Mallaiah, K. V., Sreenivasulu, P. ve Choi, Y. L., 2010. Purification and Characterization of Highly Thermostable α -Amylase from Thermophilic Alicyclobacillus Acidocaldarius. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (15): 435-440.
- LANE, A. G. ve Pirt, S. J., 1973. Production of Cyclodextrin Glycoyltransferase by Batch and Chemostat Cultures of *Bacillus macerans* in Chemically Defined Medium. *Journal Applied Chemistry Biotechnology* 23, pp. 309-321.
- LANGMAIER, F., M., Mladek, K., Kolomaznik ve S., Sukop, 2002. Isolation of Elastin and Collagen Polypeptides from Long Cattle Tendons as Raw Material for the Cosmetic Industry. *Czech Republic*, pp. 1-9.
- LEAH, R., Tommerup, H., Svendsen, I. B. ve Mundy, J. 1995. Biochemical and Molecular Characterisation of Three Barley Seed Proteins with Antifungal Properties. *Journal Biology Chemistry* (266): 1564-1573.
- LELLIOTT, R. A. ve Stead, D. E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. *Blackwell Scientific Publications*, pp. 216.
- MANCEAU, C. ve Horris, A., 1997. Assessment of Genetic Diversity Among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. Tomato. *Applied and Environmental Microbiology* 63, pp. 498-505.
- MATAR, G. M., Slieman, T. A. ve Nabbut, N. H., 1996. Subtyping of *Bacillus cereus* by Total Cell Protein Patterns and Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction. *European Journal of Epidemiology* 12 (3): 309-314.
- SATOMI, M., La Duc, M. T. ve Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., Isolated from Spacecraft and Assembly-Facility Surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (8): 1735-1740.
- MATSUZAKI, H., Yamane, K., Yamaguchi, K., Nagata, K. ve Marou, B., 1974. Hybrid α -Amylases Produced by Transformants of *Bacillus subtilis*. I Purification and Characterization of Extracellular α -Amylases Produced by the Parental Strains and Transformants. *Biochimica et Biophysica Acta* 365, pp. 235-247.
- MEER, J. L., 1972. The Regulation Of α -Amylase Production in *Bacillus licheniformis*. *Antonievon Leuvenhoek: Journal Microbiol Serol* 38, pp. 570-585.
- MIGNONE, C. F. ve Avignone-Rossa, C., 1996. Analysis of Glucose Carbon Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (46): 78-88.

- MILLER, L. ve Berger, T., 1985. Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acids. *In The Hewlett-Packard Application Note*, pp. 228-241, Hewlet-Packard, Avondale, Pa.
- MUKHTAR, H., Haq, I., 2008. Production of Alkaline Protease by *Bacillus subtilis* and Its Application as a Depilating Agent in Leather Processing. *Institute of Industrial Biotechnology*, G.C. University, Lahore 54000, Pakistan
- NICHOLSON, W. L. ve Law, J. F., 1999. Method for Purification of Bacterial Endospores from Soils: UV Resistance of Natural Sonoran Desert Soil Populations of *Bacillus* spp. with Reference to *B. subtilis* Strain 168. *Journal of Microbiological Methods* (35): 13-21.
- NICK, G., De Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. ve Lindström, K., 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., Isolated from Leguminous Trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* (49): 1359-1368.
- NIEHAUS, F., Bertoldo, C., Kahler, M., ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application. *Applied Microbiology Biotechnology* (51): 711-729.
- OGASAHARA, K., Imanishi, A., ve Isemura, T., 1970. Studies on Thermophilic α -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I some General and Physiochemical.
- OKAY S., 2005. Cloning of Chitinase A Gene (Chia) from *Serratia marcescens* bn10 and Its Expression in Coleoptera-Specific *Bacillus thuringiensis*. Yüksek Lisans Tezi.
- ÖZÇELİK, S.,1995. *Genel Mikrobiyoloji*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, pp. 1-33, Isparta
- PAULO, A. C., ve Gubitz, G. M., 2003. *Textile Processing with Enzymes*. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.
- PATIL, S .R. ve Dayanand, A., 2006. Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technology Biotechnology* 44, pp. 289-292.
- PHUTELA, U., Dhuna, V., Sandhu, S. ve Chadha, B. S., 2005. Pectinase and Polygalacturonase Production by a Thermophilic *Aspergillus fumigatus* Isolated from Decomposing Orange Peels. *Brazilian Journal of Microbiology* (36): 63-69.
- PINCUS, D. H., 2006. Microbial identification using the bioMérieux VITEK 2 System. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, Bethesda, MD: Parenteral Drug Association.

- PRIEST, F. G., 1993. *Bacillus*, Biotechnology, Biological Fundamentals, by H. Sahm. Wiley-Vch Verlag GmbH, vol. 1, Weinheim.
- RAO, M. B., Tanksale, A. M., Gathe, M. S. ve Deshpande, V. V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-635.
- REDDY, N. S., Nimmagadda A., ve Rao K. S., 2003. An Overview of The Microbial α -Amylase Family. *African Journal of Biotechnology* (2): 645-648.
- RELMAN, D. A., Schmidt, T. M., Macdermott, R. P. ve Falkow, S., 1992. Identification of The Uncultured *Bacillus* of Whipple's Disease. *The New England Journal of Medicine* 327, pp. 293-301.
- REZAEI, P. S., Darzi, G. N. ve Shafaghat H., 2010. Optimization of the Fermentation Conditions and Partial Characterization for Acido-Thermophilic α -Amylase from *Aspergillus niger* NCIM 548. *Korean Journal Chemistry Engineering* (27): 919- 924.
- RIFFARD, S., Lo Presti, F., Vandenesch, F., Forey, F., Reyrolle, M. ve Etienne, J., 1998. Comparative Analysis of Infrequent-Restriction-Site PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Typing Of Legionella Pneumophila Serogroup 1 Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (1): 161-167.
- ROBERTS, W. K. ve Selitrennikoff, C. P., 1988. Plant and Bacterial Chitinases Differ In Antifungal Activity. *Journal of general microbiology* 134, pp. 169-176.
- ROBINSON, R. K., 1985. *Dairy Microbiology*, pp. 258.
- ROJAS-AVELIZAPA, Crus-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodriguesvazquez, R. ve Ibarra, J. E. 1999. Selection and Characterisation of A Proteo-Chitinolytic Strain of *Bacillus thuringiensis* Able to Grow in Shrimp Waste Media. *World Journal Microbiology and Biothechnology* (15): 299-308.
- ROSOVITZ, M. J., Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., 1998. *Bacillus*, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, *Systematic Bacteriology*, Ninth Edition, Volume 2, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Pres, New York, 1152-1162.
- SAITO, N., 1973. A Thermophilic Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 155, 290-298.
- SAMBROOK, J. ve Russell, D. W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA.

- SASSER, M.S., 1990. Identification of by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Technical Note 101, Newark, DE, Microbial ID Inc.
- SCHAFFER, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L., Salmon, S., Pedersen, S., Hansen, H. P. H., Poulsen, P. B., Lund, H., Oxenboll, K. M., Wu, G. F., Pedersen, H. H. ve Xu H., 2007. *Industrial enzymes. Advances Biochemistry Engineering/Biotechnology* (105): 59–131.
- SGARRELLA, F., Poddie, F. P. A., Meloni, A. M., Sciola, L., Pippia, P. ve Tozzi, M. G., 1997. Channelling of Deoxyribose Moiety of Exogenous DNA into Carbohydrate Metabolism: Role Of Deoxyriboaldolase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117 B (2): 253-257.
- SHARMA, A., Bardhan, D. ve Patel, R., 2009. Optimization of Physical Parameters for Lipase Production from *Arthrobacter* sp. BGCC 490. *Indian Journal Biochemistry and Biophysics* (46): 178-183.
- SHIVAJI, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar J. V. ve Bhargava P. M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. And *Bacillus altitudinis* sp. nov., Isolated From Cryogenic Tubes Used for Collecting Air Samples from High Altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, pp. 1465–1473.
- SHUBAKOV, A. A. ve Kucheryavykh, P. S., 2004. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40 (5): 445-447.
- SINGH, J., Batra, N. ve Sobti, R. C., 2001. A highly thermostable, alkaline CMCCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (17): 761-765.
- SNEATH, P. H. A., 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, edited by P. H. A Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, 1104-1139, Baltimore.
- SOUTSCHEK-BAUER, E. ve Staudenbauer, L., 1987. Synthesis and Secretion of a Heat Stable Carboxymethylcellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Molecular Genetics and Genomics* (208): 537-541.
- SOUZA, P. M. D. ve Magalhaes, P. D. O., 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry. *Brazilian Journal of Microbiology* (41): 850-861.
- STACKEBRANDT, E. ve Goebel B. M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present

Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, pp. 846-849.

SUKUMURAN, R. K., Singham R. R. ve Pandey A., 2005. Microbial Cellulases Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific And Industrial Research* (64): 832-844.

SUZUKI, K., Suzuki, M., Tayıyojı, M., Mikaidou, N. ve Watanabe, T. 1998. Chitin-binding Protein (CBP-21) in The Culture Supernatant *Serratia marsescens* 2170. *Biocience Biothechnology Biochemistry* (62): 128-135.

SWIECICKA, I., 2001. Protein Profile and Biochemical Properties of *Bacillus circulans* Isolated from Intestines of Small Free-Living Animals in Poland. *Folia Microbiologica* 46 (2): 165-171.

ŞAHİN, F., 2003. Moleküler Tanı Yöntemleri. *Biyoinformatik-I Lisansüstü Yaz Kursu Kitabı*, 6. Bölüm (Telefoncu, A., Küfrevioğlu, İ. ve Pazarlıoğlu, N., Eds.), Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.,

TANAKA, A. ve Hoshino, E., 1999. Study on the Substrate Specificity of α -Amylases That Contribute to Soil Removal in Detergents. *Journal of Surfactants and Detergents* (2): 193-199.

TELEFONCU, A., 1997. *Enzimoloji*. Yüksek Lisans Yazokulu. Kuşadası, Aydın, Türkiye.446 s.

TEMİZKAN, G., 1999. *Genetik II: Moleküler Genetik*, İ. Ü. Yayınları Sayı: 4067 Fen Fak. No:245, İ. Ü. Fen Fak. Basımevi, İstanbul.

TOURASSE, N. J., Helgason, E., Okstad, O. A., Hegna, I. K. ve Kolsto A. B., 2006. The *Bacillus cereus* Group: Novel Aspects of Population Structure and Genome Dynamics. *Journal of Applied Microbiology* (101): 579–593.

USTAÇELEBİ, Ş., 1999. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, pp. 411-412, 624-625.

UHLIG, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. New York: John Wiley and Sons, pp. 37-202.

VERWEIJ, P. E., Breuker, I. M., Rijs, A. J. ve Meis, J. F., 1999. Comparative Study of Seven Commercial Yeast Identification Systems. *Journal of Clinical Pathology* 52 (4): 271-273.

WAYNE, L. G., Brenner, D. J., Coiwell, R. R., Grimon, P. A., Kandler, M. I., Krichevsky, L. H., Moore, W. E., C.Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, Starr, M. P. ve Truper, H. G., 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, pp. 463-464.

- WIPAT, A. ve Harwood, C. R., 1999. The *Bacillus* Genome Sequence: The Molecular Blueprint of A Soil Bacterium. *FEMS Microbiology Ecology* (28): 1-9.
- WISEMAN, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, pp. 274-373, New York.
- WOLFGANG, A., 2004. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wileyvc Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- WORLD HEALTH ORGANİZATİON, The Inter Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, 1999. Environmental Health Criteria 217-Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*, pp. 1-125.
- YILMAZ, M., 2003. Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- YILMAZ, H., 2004. *Dendroctonus micans*'ın Bakteriyal Florası ve Mikrobiyal Mücadele Ajanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- ZINN, M., Wiltholt, B. ve Egli, T., 2001. Occurrence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Reviews* (53): 5-21.

EKLER

“F2” izolarına ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi

GCGGTCACCTGGCGGCGTGCTATAATGCAAGTCGAGCGGAAGAAGGGAG
CTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAG
TTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTT
ACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACC
AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCCAGATTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAC
TGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCT
AGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGC
GAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGTCTTGAATACGTGCTCCGGTTCATGGTCC

“F16” izolarına ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi

GCCGTGCAGCTGGCGGCGTGCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGG
AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCA
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGATAA
CTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACC
CTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCT
GCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCTTTTTGAATCGTCTCCAGGTCCGGGAA

“F28” izolarına ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi

CCGCATCACCTGTCGGCCTGCTACTAATGCAAGTCGAGCGGAAGAAGGG
AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCA
TTTACAGATGGACCCGGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCA
CCAAGGGGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAA
CTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACC
CTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCT
GCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCACCATGCTCTTATCTAGAGTGTTGCAGGTCCAGAATC

“F30” izolarına ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi

CCCGACGACCTGTCACCGGCTATAATGCAAGTCGAGCGGACGGATGGGA
GCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT
AATGCACAGCCTCTCATGAGGCTATGCTGAAAGATGGTTTCGGCTATCAC
TTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCAACGATGCGTACCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAAACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAA
CTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCTGAATTATTG
GGAGTAAAGCGCCCGCAGGCGGTTTCTTTTAGTCTGATGTGAAAGCGCAC
CGCTCAATCGTGGACGGTCATTGGAAACCTGGGGGACTTGAGCGCAGAA
GAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTGTGGTCTGTAACGTCTCTGAGGC
GCCAAAGCGTCGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACTCC
GTAAACGATGAGTACTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCA
GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACAAC
CCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGATGACAGGTGGTGCA
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGG
GCTGCAAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTTCG
GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAATAAGCTGGAATCGTTAGTAATCGC
GCATCACGCTACCATATCTAGAGTGATGCTGCTCATGTCTTGG

“F36” izolarına ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi

CCCGCTCAACAGGTCGGCGTGCCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGAAG
GGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCG
GATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGTTGT
CATTTCCAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGT
AACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA
GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAC
CCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGC
TGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGA
TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCACTTTTGTATACTGTGTCCGGCTCCGGGAA

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Akçaabat Merkez İlköğretim okulunda tamamladı. Lise öğrenimini 2006 yılında Akçaabat Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Temmuz 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Giresun Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladı.

