T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN ENZİMLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Zindar ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Mart-2018

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Zindar ASLAN tarafından yapılan "Termofilik Bakterilerin Enzimleri Üzerine Çalışmalar" konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir .

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan:Prof.Dr. Kemal GÜVEN (Danışman)

Üye : Doç.Dr. İhsan EKİN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Medeni AYKUT

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 09/02./2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Kemal Güven danışmanlığında yapılmıştır. Bu araştırma boyunca bana çalışma olanağı sunan, ihtiyaç duyduğum her an bilgi ve birikimleri ile yol gösteren danışman hocam sayın Prof.Dr. Kemal GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Dr.Fatma MATPAN BEKLER'e, tecrübeleri ve yardımıyla yol gösteren Dr.Ömer ACER'e değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimi yazma aşamasında yardımlarından dolayı kıymetli arkadaşım Beyhan BUDAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR..... I

İÇİNDEKİLER..... II

ÖZET..... VI

ABSTRACT..... VII

ÇİZELGE LİSTESİ..... VIII

ŞEKİL LİSTESİ..... IX

KISALTMA VE SİMGELER..... XI

1. GİRİŞ..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 3

2.1. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler..... 3

2.2. Sınıflandırma Çeşitleri 5

2.2.1. Doğal Sınıflandırma 5

2.2.2. Genetik Sınıflandırma 6

2.2.3. Fajla Tiplendirme 6

2.3. Canlıların Filogenetik Analizi 6

2.3.1. *Bacillus* 7

2.3.2. *Bacillus subtillis* 9

2.3.3. *Bacillus licheniformis* 11

2.3.4. *Bacillus paralicheniformies*..... 12

2.3.5. Termofilik Basiller..... 13

2.4. Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı 13

2.4.1. Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı 14

2.5. Enzimler 15

2.5.1. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler ……..... 15

2.5.2 . Proteazlar ……..... 16

2.5.3. Proteazların Biyoteknolojide Kullanımı.……..... 17

2.5.4. Amilazlar……..... 17

2.5.5. Amilaz Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları……..... 17

2.5.6. Nişasta……..... 18

3. MATERYAL VE METOT……..... 19

3.1. Materyal……..... 19

3.2. Kimyasal Maddeler……..... 21

3.3. Boya Maddeleri……..... 22

3.3.1. Gram Boyama……..... 22

3.4. Tamponlar……..... 22

3.5. Besi Yerleri……..... 22

3.5.1. Katı Besi Yeri……..... 22

3.5.2. Sıvı besi Yeri……..... 22

3.6. İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi……...…..... 22

3.7. Mikroorganizmaların Gelişiminde pH'nın Etkisi…….……..... 23

3.8. Mikroorganizmaların Gelişimine İnkübasyon Süresinin Etkisi……..... 23

3.9. Bakterilerin Gram Boyaması……..... 23

3.10. Sıcaklığın Bakteri Üremesine Etkisinin Araştırılması……..... 24

3.11. Mikroorganizmalara Biyokimyasal Testlerin Uygulanması……..... 24

3.11.1. Katalaz Testi……..... 24

3.11.2. Nişasta Hidrolizi Testi……..... 24

3.11.3. Üreaz Testi……..... 24

3.11.4. Jelatin Hidroliz Testi……..... 25

3.11.5. Kazein Hidroliz Testi……..... 25

3.12. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi……..... 25

3.13. Bakterilerde Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi……..... 25

3.13.1. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi,1951)……..... 26

3.13.2. Proteaz Enzimi Aktivitesinin İncelenmesi (Leighton ve ark.1973)……..... 26

3.13.3. Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi (Bernfeld Yöntemi, 1955)..... 27

3.14. Proteaz ve Amilaz Enzimlerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi……..... 27

3.15. Proteaz ve Amilaz Enzimleri Aktivitesine Zamanın Etkisi……..... 27

3.16. Proteaz ve Amilaz Enzimlerine pH' nın Etkisinin İncelenmesi……..... 27

3.17. 16S rRNA Gen Dizi Analizi……..... 28

4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR……..... 29

4.1. Bakterilerin İzolasyonu……..... 29

4.2. Zamanın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi……..... 30

4.3. pH'nın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi……..... 31

4.4. Sıcaklığın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi……..... 32

4.5. Bakterilerin Gram Boyaması……..... 33

4.6. Bakterilerin Fizyolojik, Morfolojik ve Biyokimyasal Testlerinin Genel İncelemesi……..... 33

4.6.1. Nişasta Hidroliz Testi……..... 34

4.6.2. Katalaz Hidroliz Testi……..... 35

4.6.3. Jelatin Hidroliz Testi……..... 36

4.6.4. Kazein hidroliz Testi……..... 37

4.6.5. Üreaz Testi……..... 38

4.6.6. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Duyarlılığı……..... 39

4.6.7. Farklı İnkübasyon Sürelerinde Proteaz ve Amilaz Enzimlerinin Aktivitesi.... 41

4.6.8. Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitelerine pH'nın Etkisi……..... 42

4.6.9. Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi……..... 43

4.6.10. 16S rRNA Gen Dizi Analizine Göre İzolatların Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi……..... 45

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..... 47

6. KAYNAKLAR……..... 51

ÖZGEÇMİŞ……..... 57

ÖZET

TERMAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİN ENZİMLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zindar ASLAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2018

Bu çalışmada sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilere ait enzimlerin endüstriyel alanda önem arz etmelerinden dolayı Bingöl İli Ilıcalar beldesinden getirilen su örneklerinden bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin endüstriyel açıdan önemli olan enzimleri üretme durumları araştırılıp bu enzimler üzerine çalışmalar yapılması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada izole edilen su ve toprak örneklerinde 2 bakteri izole edildi. Bu bakterilerin çeşitli biyokimyasal testleri ile morfolojik ve fizyolojik analizleri yapıldı. İzole edilen 4NK bakterisinin çubuk şeklinde gram pozitif olduğu, 5NK bakterisinin de gram pozitif ve çubuk şeklinde olduğu tespiti yapılmıştır.İzole edilmiş bu iki bakteri için optimum pH değerinin 6 olduğu tespit edildi.Optimum üreme sıcaklıkları ise sırasıyla 40 ve 45 ^{o}C olarak belirlenmiştir.

İzole edilen bakterilerin optimum koşulları belirlendikten sonra bunların ürettikleri enzimlerin optimumları belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre 4NK bakterisinin proteaz ve amilaz enzimlerini üretim açısından optimum süreleri sırasıyla 24. ve 15. saatler olduğu belirlenmiştir. Proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'ları sırasıyla 8 ve 4-11; optimum sıcaklıkları sırasıyla 40 ve 60 ^{o}C olarak bulunmuştur. 5NK bakterisinin ise proteaz ve amilaz enzimlerini üretim açısından optimum süreleri sırasıyla 24. ve 12.saat olarak belirlenmiştir. Bu bakteri varyetesinin proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'ları 8 ve 4-11; optimum sıcaklıkları 50 ^{o}C olarak bulunmuştur.

İzolasyonu yapılan 4NK ve 5NK bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi yapılmış, buna göre filogenetik olarak hangi tür ve alt türlere yakın olduğu tespiti yapılmıştır. Analiz sonucu 4NK bakterisinin *Bacillus subtilis* türüne yakın, 5NK bakterisinin ise *Bacillus paralicheniformis* türüne filogenetik olarak yakın olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amilaz, proteaz, sıcak su kaynakları, enzim, *Bacillus*

ABSTRACT

STUDIES ON BACTERIAL ENZYMES ISOLATED FROM THERMAL RESOURCES

MASTER THESİS

Zindar ASLAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2018

In this study, bacterial isolates were isolated from the Bingöl Ilicalar landfill samples due to the importance of bacterial enzymes isolated from hot water sources in the industrial area. It is aimed to investigate the production of industrially important enzymes by these isolated bacteria and to work on these enzymes.

In this study, 2 bacteria were isolated in isolated water and soil specimens. Various biochemical tests, morphological and physiological analyzes of these bacteria were performed. It was determined that the isolated 4NK bacteria were rod-shaped gram positive and 5NK bacteria were gram positive and rod-shaped. The optimum pH value for these two isolated bacteria was determined to be 6. Optimum reproductive temperatures were 40 and 45 ^{o}C, respectively.

Once the optimum conditions of the isolated bacteria have been determined, attempts have been made to determine the optimums of the enzymes they produce. Accordingly, it has been determined that the optimal time for production of protease and amylase enzymes of 4NK bacteria is 24th and 15th hours, respectively. The optimum pHs of protease and amylase enzymes were 8 and 4-11, respectively; optimum temperatures were found to be 40 and 60 ^{o}C, respectively. The optimal time for production of protease and amylase enzymes of 5NK bacteria was determined to be 24th and 12th hours, respectively. The optimum pHs of protease and amylase enzymes of this bacterial variant were 8 and 4-11; the optimum temperatures were found to be 50 ^{o}C.

16S rRNA sequence analysis of isolated 4NK and 5NK bacteria was performed and it was determined which species and subspecies are phylogenetically close to each other. It was determined that the resultant 4NK bacteria were close to *Bacillus subtilis* and 5NK bacteria were phylogenetically close to *Bacillus paralicheniformis*.

Keywords: Amylase, protease, hot water source, enzyme, *Bacillus*

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1	Bakterilerin sistematiğinde kullanılan bazı kategori ve karakterler	4
Çizelge 3.1	Kullanılan aletler	21
Çizelge 4.1	4NK ve 5NK bakterisinin test sonuçlarının incelenmesi	34
Çizelge 4.2.	Antibiyotik duyarlılık test sonuçları	40
Çizelge 4.3.	16S rRNA dizi analizi	45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:		Sayfa
Şekil 2.1.	Filogenetik sınıflandırma analizi	7
Şekil 3.1.	Bingöl ilçe ve kaplıcaları	19
Şekil 3.2.	Kös Kaplıcası	20
Şekil 3.3.	Kös Kaplıcası	20
Şekil 3.4.	Sabırtaşı Kaplıcası	20
Şekil 4.1	4NK İzolatının çizgi ekimi	29
Şekil 4.2.	5NK İzolatının çizgi ekimi	29
Şekil 4.3.	İnkübasyon Süresinin 4NK'nın üremesine etkisi	30
Şekil 4.4.	İnkübasyon süresinin 5NK'nın üremesine etkisi	30
Şekil 4.5.	pH'nın 4NK üremesine etkisi	31
Şekil 4.6.	pH 'nın 5NK'nın üremesine etkisi	31
Şekil 4.7.	Sıcaklığın 4NK 'nın üremesine etkisi	32
Şekil 4.8.	Sıcaklığın 5NK'nın üremesine etkisi	32
Şekil 4.9.	4NK'nın gram boyaması	33
Şekil 4.10.	5NK'nın gram boyaması	33
Şekil 4.11.	4NK'nın nişasta hidroliz testi	35
Şekil 4.12.	5NK'nın nişasta hidroliz testi	35
Şekil 4.13.	4NK'nın katalaz testi	36
Şekil 4.14.	5NK'nın katalaz testi	36
Şekil 4.15.	4NK'nın jelatin hidroliz testi	37
Şekil 4.16.	5NK'nın jelatin hidroliz testi	37
Şekil 4.17.	4NK'nın kazein hidroliz testi	38
Şekil 4.18.	5NK'nın kazein hidroliz testi	38
Şekil 4.19.	4NK'nın üreaz testi	39
Şekil 4.20.	5NK'nın üreaz testi	39
Şekil 4.21.	4NK'nın antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.22.	5NK'nın antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.23.	4NK'nın değişik inkübasyon sürelerine bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi	41
Şekil 4.24.	5NK'nın değişik inkübasyon sürelerine bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi	42

Şekil 4.25. 4NK'nın pH'ya bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi 42
Şekil 4.26. 5NK'nın pH'ya bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi 43
Şekil 4.27. 4NK'nın sıcaklığa bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi 44
Şekil 4.28. 5NK'nın sıcaklığa bağlı amilaz ve proteaz aktivitesi 44

KISALTMA VE SİMGELER

CaCI	: Kalsiyum Klorür
dk	: Dakika
$FeCI_3$	: Demir(III) Klorür
g	: Gram
g/L	: Gram/Litre
H_2O	:Su
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
H_2SO_4	:Sülfirik Asit
I_2	: Iyot
K_2HPO_4	: Di Potasyum Fosfat
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KI	: Potasyum Iyodür
L	: Litre
mg	: Miligram
$MgSO_4$	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
$MnSO_4$	: Mangan(II)Sülfat
N	: Normal
NaCl	:Sodyum Klorür
$Na_2HPO_4.7H_2O$	: Di Sodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
NH_4CI	: Amonyum Klorür
NK	: Normal Katıdan
µl	: MikroLitre
µm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarını anlamak ve değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikleri ve işlemleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Canlıların iyileştirilmesi ya da endüstriyel kullanımına yönelik ürünler geliştirilmesini, modern teknolojinin doğa bilimlerine uygulanmasını kapsar.

Bakterilerin biyoteknolojide kullanım alanları son yıllarda oldukça artmıştır. Son on yıl içinde moleküler kimya, biyokimya ve tıp alanındaki ilerlemeler bakterilerin kullanımını artırmış ve bazı hastalıkların tedavisinde vektör olarak kullanılmıştır. Bakterilerin biyoteknolojide kullanılmasının nedeni; hızlı çoğalmaları ve maliyetlerinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Bakterilerin biyoteknolojide bazı hastalıkların tedavisinde vektör olarak kullanılmalarının yanı sıra bunların salgıladığı enzimler endüstriyel alanda önemlerini artırmıştır. Endüstri alanında kullanılan enzimlerin çoğu bakterilerden elde edilmektedir. Bu enzimlerin bakterilerden elde edilmesinin nedeni istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve yüksek sıcaklıklarda bozulmamalrından kaynaklanmaktadır. Bakteriyel enzimler özellikle çevre kirliliğinin önlenmesinde, kumaş boyasında, leke çıkarmada, mayalanmada, ilaç sanayisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Bacillus türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α-amilaz, proteaz, glukanaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig 1998).

Bakterilerin salgıladığı ve biyoteknolojik olarak önemi olan enzimlerden biri amilazlardır. Yapılan çalışmalarda ticari olarak ilk kullanılan enzimin amilaz olduğu belirlenmiştir(Güven 2011). Amilaz enzimi nişastayı moleküllerine parçalayan kuvvetli bir enzimdir. Nişasta molekülünü parçalamasıyla maltoz ve dekstrin molekülleri meydana gelir. Endüstriyel alanda özellikle bakteriler tarafından salgılanan amilaz enzimi kullanılır. Bunun içinde *Bacillus* cinsi bakteri en çok kullanılandır. Bu enzim özellikle tekstil ve kâğıt sanayisinde, nişastanın parçalanmasında kullanılmaktadır.

Bacillus cinsine ait bakterilerin salgıladığı ve biyoteknolojide kullanılan bir diğer önemli enzim proteaz enzimidir. Proteaz enzimi canlılarda bulunması gereken,

büyüme ve çoğalma için önemli olan bir enzimdir. Proteaz enzimi bitkisel, hayvansal ve bakteriyel kökenli olabilir. Proteaz enzimi endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Özellikle deterjan ve besin endüstrisinde kullanılmaktadır. Proteazlar optimum pH aralığına göre nötr, alkali ve asidik proteazlar olarak gruplandırılır. Bunlardan alkali proteazlar özellikle deterjan sanayisinde kullanılmaktadır. Bu enzimler özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilir. Bu bakterilerden elde edilen proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya karşı oldukça dayanıklıdır.

Yapılan bu araştırmada sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin enzimleri üzerine çeşitli incelemeler yapılmıştır. Yapılan bu incelemenin nedeni; bakterilerin salgıladığı enzimlerin endüstriyel açıdan oldukça önemli olmasıdır. Salgılanan bu enzimler kimya, tıp ve eczacılıkta önemli yer tutmaktadır. Bu nedenle yapılan çeşitli testlerle bakterilerin enzimleri üzerine çalışılmıştır.

İzolasyonu yapılan bakterilerin enzimleri endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Bu da bakterilerin enzimleri üzerine olan araştırmaları artırmıştır. Bakterilerin bu enzimleri yüksek ısıya dayanıklı olması nedeniyle ve ekstrem koşullarda bozulmadığından endüstride tercih edilmektedir. Termofilik bakteriler ile yapılan çalışmaların çoğu *Bacillus* türleri ile yapılmaktadır. Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklığa dayanıklı olması onların hücre duvarlarında bulunan doymuş yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin sentezlediği enzimler birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Bu bakteriler, amilaz, proteaz, pektinaz gibi enzimleri üretebilme yeteneğine sahiptir.

Bu çalışmada, Bingöl sıcak su kaplıcalarından alınan su ve çamur örneğinden bakteri izolasyon işlemi yapılıp bakterilerin biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Tanımlama sonucunda, bu izolatların *Bacillus subtilis* ve *Bacillus paralicheniformis* türüne ait varyeteler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, amilaz ve proteaz enzimlerinin üretimi ve enzim karakterizasyonu çalışması yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler

Sistematik ve identifikasyon, mikrobiyoloji disiplinlerinde merkezi rol oynamaktadır (Ludwig 2007). Mikroorganizmaları belli, geçerli ve devamlı bir klasifikasyona tabi tutma fikri eskiden başlamış olmasına karşın, yeni mikroorganizmaların bulunması ve bunların değişik karakterlere sahip olmaları nedeniyle yapılan sistematikler devamlı değişmekte ve yerlerine yeni bulgulara uygun olanları hazırlanmakta ve konulmaktadır (Arda 2000).

Güvenilir bir sınıflandırma sistemi, mikroorganizmaların muazzam çeşitliliğini izlemek amacıyla, mikroorganizmalarla ilgilenen bilim adamları için bir ön koşuldur. Biyolojik sınıflandırmanın nihai hedefi; organizmaların karekterizasyonunu yapmak ve onları gruplar içerisinde kurallı bir şekilde düzenlemektir (Schleifer 2009).

- Mikropları ilk bulan, şekillerini çizen ve hareketlerini izleyen A. Van Leeuwenhoek ve daha sonra Carl Von Linne (Carolus Linneaus) bakterileri kendi yaptığı bir sınıflamaya dahil etmiş ve ilk defa klasifikasyonuna çalışmıştır (Trüper 2005, Carpenter 1972).
- Otto Frederich Müller 1773'de bakterileri iki cins olarak vermiştir. Monas : oval ve yuvarlak bakteri türleri ve Vibrio: uzun formlu (çomak biçiminde) olanları kapsamaktadır (Trüper 2005; Arda 2000).
- Ehrenberg, mikroorganizmaları 4 cinse ayırmıştır (*Bacterium, Sprillum, Spirochaeta, Spirodiscus)* (Trüper 2005; Carpenter 1972).
- 19. Yüzyılın sonları, bakteriyel taksonomi ve Ferdinand Cohn döneminin başlangıcı olmuştur (Schleifer 2009).
- 1897'de Migula mikroorganizmaları morfolojik, renk ve fizyolojik karakterlerine göre sistem geliştirmiş ve bunu''System of the Bacteria''adı ile yayınlamıştır.
- 20.yy başlarında organizmaların belirlenmesinde önemli morfolojik ve fizyolojik belirteçler kullanılmıştır.
- 1923 yılında bakteriler tek hücreli bitkiler olarak tanımlanmıştır.
- 1925'te Edouard Chatton, ilk kez prokaryot ve ökaryotlardan bahsetmiştir.

- 1962'de A.Lwoff, R.Stanier ve C.B. Van Niel prokaryot ve ökaryotları detaylı olarak birbirinden ayırmıştır.
- 1977' de arkeabakteriler gen dizilerine göre ayrı bir alem olarak tanımlanmıştır.

Yukarda bakteriler ile ilgili tarihsel gelişim verilmiştir. Bakterileri hücre şekli, flagella, endospor ve kapsül gibi özel yapılarına göre sınıflandırmak yeterli olmamıştır. Bakterilerin daha detaylı sınıflandırılması için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bakterilerin sistematiğinde kullanılan bazı kategorlar, karakterler ve yöntemler çizelge 2.1 (Busse ve ark.1996 ve Black 1996'dan modifiye edilmiştir.)'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Bakterilerin sistematiğinde kullanılan bazı kategori ve karakterler (Busse ve ark. 1996 ve Black 1996).

Kategoriler	Örnekler
Üreme	Sıvı ve katı kültürlerdeki ayırt edici özellikleri,koloni morfolojisi,koloni rengi,pigment oluşumu
Morfolojik Özellikler	Hücre morfolojisi, hücre boyutu, hareket,gram boyama,asit fast boyama, flagella tipi, endospor, kapsül
Fizyolojik Özellikler	Sıcaklık (optimum ve aralık), pH (optimum ve aralık),oksijen gereksinimi, tuz gereksinimi ve toleransı
Biyokimyasal özellikler	Karbon kaynağı kullanımı, karbonhidrat oksidasyonu, karbonhidrat fermantasyonu,enzim profili
İnhibitör Testler	Seçici ortam, antibiyotik dirençliliğive duyarlılığı
Serolojik Testler	Aglütinasyon
Kemotaksonomik Analizler	Yağ asidi, polar lipid,kinon sistemleri, lipopolisakkarit kompozisyonu, hücre aminoasit kompozisyonu,tüm hücre şekerleri, hücre duvarı şekerleri, hücre proteinleri

Genetik Analizler	DNA baz oranı (G+C oranı), RAPD(Random amplified polymorphic DNA), RFLP(Restriction fragment lenght polymorphism), PFGE (Pulsedfield gel electrophoresis of DNA fragments)
Filogenetik Analizler	DNA-DNA hibridizasyonu, DNA-RNA hibridizasyonu, 16 S rRNA dizi analizi, 23S rRNA dizi analizi

2.2. Sınıflandırma Çeşitleri

2.2.1. Doğal Sınıflandırma

Doğal sınıflandırmada canlıların tüm iç ve dış özellikleri dikkate alınarak yapılır. Yapılan bu sınıflandırmada homolog organlar dikkate alınır. Doğal sınıflandırmada temel biri tür'dür ve yapılan gözlemler niceldir.

Doğal sınıflandırmada ölçüt alınan özellikler vardır. Bunlar ;

- Hücre tipi ve sayısı
- Organeller
- Morfolojik yapı
- Anatomik yapı
- Fizyolojik yapı
- Protein yapısındaki benzerlik
- Beslenme şekli ve yaşam alanları

Doğal sınıflandırmada dikkate alınan bu özellikler canlıların ayırt edilmesinde yetersiz kalmış bunlara ek olarak yapısal özellikler incelenmiş ve çeşitli testler yapılmıştır. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için nişasta, kazein oksidaz gibi testler yapılmıştır. Kültürel özelliklerin belirlenmesi için bakterilerin oksijen durumlarına bakılmış ve hangi ortamlarda daha iyi üreme gösterdiği belirlenmiştir. Bakterilerin morfolojik özellikleri ise dizilişleri, şekilleri ve boyama özellikleri incelenmiştir.

2.2.2. Genetik Sınıflandırma

Genetik sınıflandırmada bakterilerin nükleik asit analizleri yapılarak belirlenmiştir. Bu sınıflandırma çeşidinde DNA'da bulunan guanin ve sitozin bazının yüzdesi kullanılarak yapılmaktadır. Yapılan çeşitli araştırmalar ile DNA 'daki G+C oranları belirlenmiş ve 16S rRNA analizleri yapılmıştır.

GC Oranları: Guanin +sitozin oranı organizmanın DNA'sında bulunan Guanin ve sitozininde bulunduğu toplam nükleik asit yüzdesi olarak tanımlanır. Bakteriyel taksonların belirlenmesinde kullanılan klasik genotipik yöntemlerden biri DNA'da bulunan guanin(G)+ sitozin (C) içeriğinin belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır (Vandamme ve ark.1996, Ludwig 2007). Bu oran, DNA'nın erime sıcaklığının ölçümü veya kromotografi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir (Madigan ve Martinko 2010).

16 S rRNA Analizi: Günümüzde rRNA, prokaryotik canlıların filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında en iyi hedef olarak kabul edilmekte ve birçok filogenetik araştırma, RNA'ya bağlı olarak yapılmaktadır (Vandamme ve ark.1996; Busse ve ark. 1996, Schleifer 2009). rRNA yaklaşımı, günümüzde birçok mikrobiyoloji disiplinlerinde en yaygın kullanılan standart tekniklerden biridir (Ludwig ve ark. 1998). Birbirlerine çok yakın olan türlerin 16 S rRNA dizilerinin karşılaştırılması ile bu molekülde filogenetik araştırmalar için önemli olan korunmuş bölgelerin yanı sıra oldukça değişken olan fragmentlerin varlığı tespit edilmiştir. 16 S rRNA'da bulunan bu değişken fragmentlerin dizileri, birbirine çok yakın olan türleri birbirlerinden ayırmak için kullanılabilir (Busse ve ark.1996).

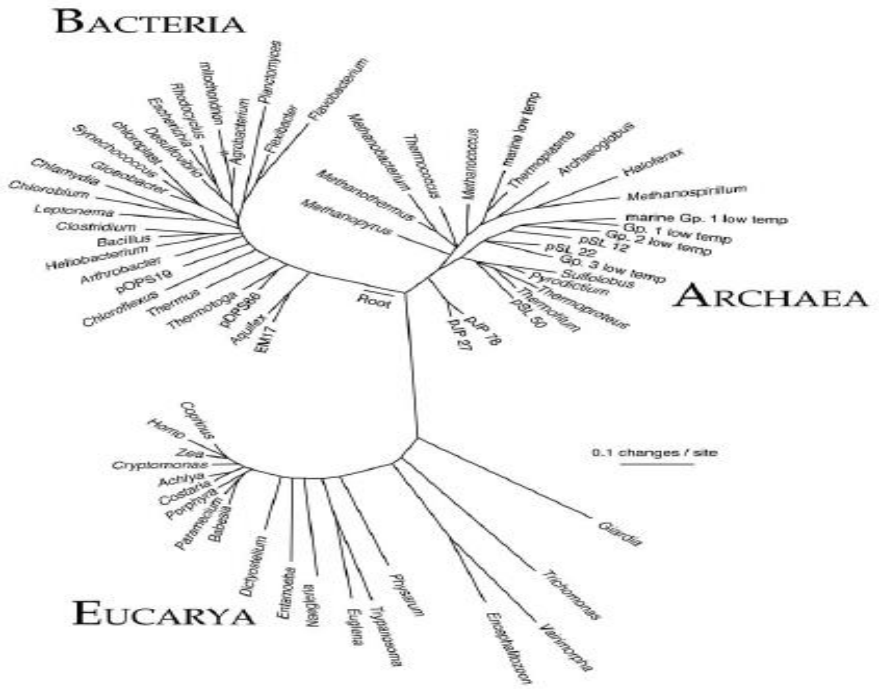
2.2.3. Fajla Tiplendirme

Türler içi veya türler arası ilişkiyi saptamada fajla tiplendirmede kullanılmaktadır. Aynı türe ait suşlar, kendilerine özgü fajlara göre gruplara ayrılabilmektedirler (http://www.Mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010701.pdf).

2.3. Canlıların Filogenetik Analizi

Filogenetik analiz çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkinin araştırılmasıdır. Evrimsel hayat ağacının araştırılması için filogenetik analiz yöntemleri vazgeçilmez hale gelmiştir. Filogenetik ağaç dizileme çalışmaları ile elde edilen bilginin özetlenmesini ve görsel olarak anlaşılabilmesini sağlar. Canlılar önceleri beş alem

içerisinde sınıflandırılmıştır: bitkiler, hayvanlar, funguslar, protistalar ve monera alemi. Daha sonra yapılan çalışmalar ile üç domain içerisinde gruplandırılmıştır. Bu gruplar bacteria, archea ve eukaryatlardır.



Şekil 2.1. Filogenetik sınıflandırma analizi (Clarridge 2004).

2.4. *Bacillus*

Yaygın bulunan *Bacillaceae* familyasında bulunan *Bacillus* cinsi bakteriler gram pozitif ya da gram negatif aerob yada anaerob bakteriler olabilir. *Bacillus* bakterileri mikroskopla incelendiğinde dizilişlerinin tek tek veya zincir halinde olduğu belirlenir. Bu bakterilerin şekilleri çubuk, çok küçük ya da büyük olabilirler. *Bacillus* terimini ilk kez Ferdinand Cohn 1872 yılında kullanmıştır (Lin 1997).

Bacillus sp. IMD 435 α-amilaz üretimi ile ilgili çalışmıştır. Yapılan bu çalışma da bakterilerin çoğaltılması için gerekli olan süre ve bu sürede bakterilerin üretimi için gerekli olan sıcaklık belirlenmiştir. Bu belirlemelere göre bakteri üretimi için gerekli olan sürenin 41.saat, sıcaklığın ise; 40 C^o olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda laktozlu ortamlarda bakterinin üremesine ve pH'sına bakılmıştır. Buna göre laktozlu ortamlarada bakterilerinin çoğalmasının az olduğu, kısmen saflaştırılan enzimde maksimum amilaz aktivitesinin pH 6. 0 olduğu sonucuna varılmıştır (Hamilton ve ark.1999).

Bacillus suşlarından α-amilaz üretimi sağlamak ve bu bakterileri yeni ortamda geliştirmek için çalışılmıştır. Bakteriler farklı elementlerin bulunduğu ortamlarda üretimleri sağlanmıştır. Bütün *Bacillus* suşlarında optimum sıcaklık ve pH belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre optimum sıcaklık 55 ^{o}C, pH 5.9-7.0 olduğu bulunmuştur (Sarıkaya ve Gürgün 2000).

Bacillus türleri üremek ve gelişmek için gerekli vitaminleri bulunduğu ortamdan alırlar. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Madigan ve ark. 2003).

Hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaktan izole edilebilirler. Yaygın olarak toprakta sporofit olarak ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar fakat kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı su, deniz suyu, çöl toprakları da bu cinslerin yaşam alanlarındandır (Özşahin 2006, Maugeri ve ark. 2001, Yılmaz 2002).

Bacillus sp. PN5'ten alkalin amilaz üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaya göre, inkübasyon süresi 60 saat, optimum sıcaklık 60 ^{o}C ve pH'nın 7.0 olduğu bulunmuşur (Saxena ve ark. 2007).

Bingöl'ün Kös sıcak su kaynağından *Bacillus* sp. KG5 bakterisi izole edilmiştir. Bu çalışmada bakterinin optimal üretimi sağlanmış, saflaştırma ve karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *Bacillus* bakterisinin proteaz enzimini sentezlenmiş ve enziminin molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Buna göre molekül ağırlığı 48 kDA olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı, pH ve enzim üretimi için inkübasyon süresi sırasıyla 45 ^{o}C, 7.0 ve 24 saat olarak belirlenmiştir. Enzimin kalsiyum ortamında stabil olduğu ve Cu^{+2}, Zn^{+2}, Hg^{+2} ve SDS ile inhibe olduğu belirlenmiştir (Ahmetoglu 2015).

Baltacı (2016) yapmış olduğu çalışmada; Türkiye'deki kaplıcalardan farklı türden termofilik bakterilerin izolasyonu identifikasyonu ve karakterizasyonu yapmıştır. Geleneksel (morfolojik, fizyolojikve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemlerle (yağ asidi metil esterleri, GTG55-PCR ve 16 rRNA dizilemesi) çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra termofilik bakteriler üzerine lipaz, proteaz, amilaz ve selülaz testleri yapılmıştır. Bu tanımlama çalışmalarına göre O20 suşu tanımlanmış ve yeni türe ait

olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen tüm izolatların taramaları yapılmış ve bu bakterilerin üretiği enzimlerin endüstriyel olarak önemli olduğu ortaya konulmuştur. Bu izolatların en az iki enzim ürettiği tespit edilmiştir.

Contesini 2017, *Bacillus* cinsinin dünyada en önemli proteaz kaynağı olduğu nötür ve alkalin proteazlar üretebildiğini, deterjan, organik çözücüler, oksitleyici bileşiklere karşı dayanıklı olduğuna vurgu yapmışlardır. Proteazlar deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Özellikle lekelerin çıkarılmasında alkalin proteazlar kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmalarda, *Bacillus* türlerine ait proteazların saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışmalar ağırlık kazanmıştır.

2.4.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus türlerinin bazılarının termofilik, bazılarının ise mezofilk oldukları bilinmektedir. Örneğin; *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* ılımlı sıcaklıklarda büyüme gösterirken, *Bacillus stearothermophilus* 65 ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda büyüme gösterir (Demirijian 2001, Black 1996, Ahmetoglu ve ark. 2015).

Bacillus türü bakterilerin karakterizasyonu yapılmış ve bu bakteri cinsinin salgıladığı proteaz enzimi ile çalışılmıştır. İzole edilen *Bacillus subtilis* bakterisi proteaz eldesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İzole edilen bakteriler agar ortamında bir gece inkübasyonda bırakılmıştır. Bakterilerin eklenmesinden sonra maksimum aktivite bölgesi 22 mm olduğu tespit edilmiştir. Uygun koşullar altında 45 ºC'de, pH 10'da 36 saat boyunca 180 rpm'de bırakılan bakterilerin proteaz üretimi incelenmiştir. Ortamda galaktoz ve pepton varlığı diğer karbon ve azot kaynakları ile karşılaştırıldığında enzim üretimi % 0. 5 oranında arttığı gözlenmiştir. Bu kaynakların eklenmesi proteaz üretimini ve çeşitli endüstri uygulamalarını artırabileceği belirlenmiştir (Pant 2015).

Ilımlı termofilik *Bacillus subtilis*'in termostabil amilaz enzimi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Enzimlerin optimum üretimi, sıcaklığı pH'sı, ve maksimum aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre; nişastalı besi ortamında enzim üretimi maksimum bulunmuştur. Enzimin sıcaklığı 135 ºC ve pH 6. 5'da maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Konsula ve ark.2004).

Amilaz, nişastanın şekerlere parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Deterjanlar, tekstil, yağ hidrolizi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Yapılan bir

çalışmada daha iyi ürün geri kazanımından dolayı amilaz üretimi için katı hal fermantasyonu(SSF) su altında fermantasyon da (SmF) kullanılmıştır. *Bacillus subtilis* alfa amilaz üreticisi olarak bilinir. Bu çalışmada substrat olarak buğday kepeği kullanılmış, 37 ^{o}C'de 48 saat süreyle katı fermantasyonu kullanılarak testler yapılmıştır. Farklı fermantasyon sürelerine bakılarak 48 saat sonra yüksek alfa amilaz üretimi olduğu tespit edilmiştir. Bu alfa amilazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7.1 ve 40 ^{o}C olduğu bulunmuştur. Alfa amilazı saflaştırma amacı ile %30-70 $(NH_4)_2SO_4$ kullanılmış ve etkinliğinin üç kat arttığı tespit edilmiştir. Amilazın tam moleküler ağırlığı, diğer protein saflaştırma teknikleriyle belirlenmeye çalışılmıştır (Raul 2014).

Diğer bir çalışmada sıcak su kaynaklarından *Bacillus subtilis* bakterisi izole edilmiştir. İzolasyon sonucunda yaptığı çeşitli çalışmalarla bakterinin amilaz enziminin karakterizasyonu üzerine çalışılmıştır. Bu enzim için optimum sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 65 ^{o}C ve 7.0 olduğu belirlenmiştir (Agüloğlu ve ark. 2008). Suudi Arabistan'ın Gazan kentinde yerel sıcak su kaplıcalarından termofilik amilaz üreten bakteri izole edilmiştir. Bu bakteri suşunun 16S rRNA dizi analizi ve filogenetik analizini yapmışlardır. Buna göre bu bakterinin *Bacillus subtilis*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis*'in nişasta olan ortamda maksimum amilaz ürettiğini gözlemlemişlerdir. Alkalin amilaz üretimi için 48 saat süreyle 45^{o}C'de inkübe edilmiştir (AlJohani ve ark. 2017).

Diğer bir çalışmada *Bacillus subtilis*'in nişastayı parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. *Bacillus subtilis* tarafından gösterilen maksimum amilaz aktivitesi 288U/ml olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7. 0 ve 37 ^{o}C olarak belirlenmiştir. Maksimum amilaz etkinliği %1 oranında nişasta bulunan ortamda gerçekleşmiştir. Saflaştırılan amilazın geniş pH aralığında stabilite gösterdiği ve SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı 59 kD olarak belirlenmiştir (Dilara 2015).

Mısır kabuğu substrat olarak kullanılarak *Bacillus subtilis*'in amilaz enzimi üretiminin incelendiği bir çalışmada *B.subtilis* için önceden optimum koşullar belirlenmiştir. Buna göre mısır kabuğu kullanılarak fermantasyon ortamında 51.65 ± 0.13 U / g amilaz üretimi 35 ^{o}C'de ve pH 7, nem içeriği 1:2 ve 72 saat gibi koşullarında sağlanmıştır (Madika ve ark. 2017).

Harikrishna ve ark (2012) *Bacillus subtilis*'ten amilaz enzimi üretimi çalışmışlardır. 72 saat üreme inkübasyonundan sonra nişasta ve pepton kullanımının enzim üretimi için en iyi ortamlar olduğu tespit edilmiştir. Maksimum enzim üretme süresi, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 72 saat 7.0 ve 30 ^{o}C olduğu belirlenmiştir.

Hasan ve AbdKarim (2012) ayrıca, *Bacillus subtilis* te en yüksek amilaz aktivitesini 48 saat inkübasyondan sonra 39 U/g olarak bulmuşlardır.

Ekstrasellüler proteazlar ticari değere sahip olup endüstriyel sektörlerde birçok uygulama alanı bulmaktadır. Endüstriyel sektörlerin deterjan, gıda, ilaç, deri, atık ve geri dönüşüm alanlarında enzim satışının %40'nı proteazlar oluşturur. Proteazlar için tercih edilen kaynak mikroplardır. Proteazların büyük bir bölümü *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir. Sathiya (2013); *Bacillus subtilis*'ten proteaz saflaştırılması yapmış ve potansiyel uygulama alanları için çalışmıştır. Bu çalışma sonucunda *Bacillus subtilis*'in proteaz için güçlü bir kaynak olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda protein konsantrasyonun da artış sağlanmıştır. Ayrıca proteaz kullanılarak işlenen deri numunelerinde maksimum yumuşaklık olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, deri işleme sürecinde çevre kirliliğinin önlenmesinde proteazlar yardımcı olur.

2.4.2. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis bakterisi toprak ve bitki materyallerinden izole edilebilir. Bu bakteriler gram pozitif bakterilerdir. *Bacillus licheniformis* bakterisi endospor oluşturabilen saprofitik organizmalardır. Bu organizmalar besin döngüsünde önemli yer tutar. Hayvanlar ve bitkiler için patojen özellik göstermezler.

Bacillus licheniformis genom sekansları belirlenmiş olan *Bacillus* cinslerinden *Bacillus subtilis'*in olduğu grupta yer almaktadır. Bunlar *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis* ve alkalifilik türlerden olan *Bacillus halodurans* ve *Bacillus subtilis*'tir (Veith ve ark.2004).

Bacillus licheniformis NH1 salgılanan amilaz enzimi üzerine Hamidet ve ark.(2008) çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada bakteri üretimi için gerekli olan inkübasyon süresi 48 saat, sıcaklık 37 ^{o}C ve pH 7. 0 olduğu tespiti yapılmıştır. Yapılan saflaştırma işleminden sonra amilaz enziminin optimum sıcaklığı 90 ^{o}C, pH 5.0 olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Türkiye'nin Erzurum ilinin Pasinler kaplıcasından izole edilen bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Termofilik bakterilerin fenotpik ve genotipik karakterizasyonu için PCR, 16S ve rDNA sekans verileri kullanılmıştır. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere dayanarak 9 farklı bakteri türü seçilmiştir. Yağ asitleri ve 16S rDNA sekanslarını içeren moleküler testlerle ESE suşu karakterize edilmiştir. Yağ asit analiz verileri incelenen 9 bakteri suşunda 14 farklı yağ asidi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bunlardan 5 tane yağ asidi; 15: 0 izo, 15:0 anteiso, 16:0 izo, 17:0 izo ve 17:0 anteiso tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Yağ asidi analiz sonuçları değerlendirildiğinde bakteri soylarının 2 fenotipik gruba ayrıldığı saptanmıştır. Buna göre ilk grupta tanımlanan 4 suşun *Bacillus licheniformis* olduğu, ikinci gruptaki 5 suşun ise *Aeribacillus pallidus* olduğu tespit edilmiştir (Adıgüzel 2011).

Bacillus licheniformis ATCC 9945'ten amilaz enziminin üretimi ve saflaştırılmasını yapmışlardır. Bu çalışmada maksimum enzim üretimini 24. saate ve 37 ^{o}C'de elde etmişlerdir. Amilaz enziminin saflaştırılması işlemi 6 kez yapılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra enzimin molekül ağırlıkları tespiti de yapılmıştır (Bozic ve ark.2011).

Başka bir çalışmada izole edilen termofilik DV3 bakterisi çalışılmıştır. Bu bakterinin *Bacillus licheniformes* bakterisi olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterinin amilaz enzim aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığı 7.0 ve 70 ^{o}C olduğu, proteaz enziminin aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığı ise 10.0 ve 50 ^{o}C olarak belirlenmiştir. Amilaz enziminin aktivitesinin Mn^{+2} varlığında arttığını Ca^{+2} ve Cu^{+2} ile inhibe olduğu tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesinin ise EDTA ile inhibe olduğu belirlenmiştir (Acer 2015).

2.4.3. *Bacillus paralicheniformis*

Bacillus paralicheniformis 14DA11, fermente soya fasulyesi hamurundan gram (+), fakültatif anaerob, hareketli ve endospor oluşturan bir tür olarak izole edilmiştir. Bu bakterinin klindamisin direnci gösteriği, 15-60 ˚C ve pH 6-11 aralıklarında ürediği ve % 10 NaCl toleransına sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda genomik analizler sonucunda *Bacillus paralicheniformis*'in *B. licheniformis*'ten dört gen farkıyla ayrıldığını belirlemişlerdir. Filogenetik ve fenotipik analizler sonucunda *Bacillus*

paralicheniformis sp.'nin yeni bir tür olduğunu tespit etmişlerdir (Dunlap ve ark. 2015, Lee ve jeong 2017).

Aşırı derecede halotolerant *Bacillu*s türlerinin izolasyonunun araştırıldığı ilk çalışmada ölü deniz siyah çamurundan dokuz izolat izole edilmiştir. İzolatlara morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmış ve buna göre Halotolerant *Bacillus* bakterisi olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda çoğu koloni beyaz ile açık sarı renginde dairesel ve düzensiz olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar gram pozitif, çubuk şekilli endospor oluşturan, fakültatif anaeroblar olduğu tespit edilmiştir. İzolatların oksidaz testi negatif, katalaz testi pozitif olup jelatini hidrolize eden bakterilerdir. Bakterilerin 16S rRNA dizi analizi yapılmış olup hangi bakteri türüne yakın oldukları belirlenmiştir. Analizler sonucunda DSM2 izolatının *B. paralicheniformis* türünün aktivitelerini gösterdiği belirlenmiştir (Obeidat 2017).

2.4.4. Termofilik Basiller

Termofilik basiller 1994 yılına kadar iki cins halinde (*Bacillus* ve *Alicyclobacillus*) sınıflandırılmaktaydı ve bu türlerin çoğu *Bacillus* cinsi içerisinde yer almaktaydı. Sonradan yapılan çalışmalarda, *Bacillus* cinsi bakterilerin biyokimyasal ve genetik özelliklerine göre yeniden ele alınarak yeni cinslere bölünmüştür. Bunlar; *Alicyclobacillus, Aneurinibacillus, Brevibacillus, Gracilibacillus, Paenibacillus, Salibacillus, Ureibacillus, Virgibacillus* ve son olarak *Geobacillus*'tur. Bu yeni cinsler 16S rRNA gen sekans analizleri baz alınarak ayrı filogenetik gruplara dahil edilmiştir. (Rainey ve ark. 1994, Banat ve ark. 2004**).**

Termofilik basiller, sıcaklıkla muamele edilmiş besin ürünlerinin kontaminantları olarak düşünülselerde esas potansiyelleri proteaz, amilaz, lipaz ve DNA restriksiyon enzimleri gibi termostabil enzimlerin kaynağı olarak öneme sahiptirler (Rainey ve ark. 1994). *Bacillus* türleri endüstriyel önemi olan termoaktif, termostabil, alkalin ve şelatör dirençlilik özelliğine sahip enzimler üretirler. Bu enzimler kaotropik ajanlara (üre, tiyoüre vb.) ve organik çözücüler gibi kimyasal denatürantlara karşı genellikle dirençlidirler (Arıkan 2008).

2.5. Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Biyoteknoloji; canlı sistemlerin bilim ve mühendislik uygulanarak mal ve hizmet üretmek amacıyla çeşitli yöntemlerle kullanılmasıdır. Biyoteknolojik yöntemlerle

hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan enzimler izole edilerek çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların kısa sürede çoğalmaları, maliyetlerinin az olması gibi sebeplerden dolayı çok fazla tercih edilmektedir.

Dünyada bol miktarda bulunan çok çeşitli endüstri atıkları, bu mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilir. Böylece birçok atık maddenin değerlendirilmesi veya yok edilmesine de yardımcı olabilir. Kontrol edilebilen şartlarda fermantasyon reaktörü içinde sürekli kültür halinde üretilebildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez (Özdemir 2004; Castro 1999).

2.5.1. Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofiller; sığ, sıcak yer kaynakları, hidrotermal ağız sistemleri, volkanik adalardaki tortullar ve derin deniz hidrotermal ağızları dahil olmak üzere jeotermal olarak ısınmış birçok deniz ve kara habitatlarından izole edilmiş 60 ve 108 ^{o}C arasında optimal büyüme ısılarına sahip mikroorganizmalardır (Maugeri ve ark.2001, Atlas 1995).

Ekstrem mikroorganizmalardan özellikle termofiller, termostabil biyokatalizörlerden dolayı çok ilgi çekmektedir. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkansız olduğu sıcaklıklarda bile termofil bakterilerin enzimleri kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir (Akkaya ve Kıvanç 2009).

Biyoteknolojik açıdan büyük potansiyellere sahip olan ekstremozimler içerisindeki en önemli enzimler termostabil enzimlerdir ve bu enzimler protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Diğer önemli bir neden ise bu enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerdeki avantajlarıdır (Becker, Abu-Reesh, Markossian, Antranikian and Markl 1997). Yüksek sıcaklık bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini azaltır. Ayrıca sıcaklığın arttırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon

katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Bruins ve ark. 2001).

Termofillerin ısıya, denatürasyona, proteolizise dayanıklı proteinler içerdikleri rapor edilmiştir. Bu organizmalar tarafından sentezlenen ve şaperonin proteinleri olarak adlandırılan bu proteinler, denatüre proteinlerin katlanmasına yardımcı olarak doğal formlarını almalarına ve fonksiyonlarını yeniden kazanmalarına yardımcı olurlar. Ayrıca termofiller non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfit köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara adapte olurlar (Haki ve Rakhshit 2003).

Biyoteknolojinin ilerlemesiyle ve enzimlerin saf olarak elde edilmeleriyle uygulamalar birçok alanda artmıştır ve termostabil enzimlerin kullanılabilirliğiyle endüstriyel işlemler için birçok yeni imkân ortaya çıkmıştır. Termostabil enzimler çoğunlukla termofilik organizmalardan izole edilirler ve doğal yapılarındaki stabiliteden dolayı birtakım ticari uygulama alanları bulurlar (Haki ve Rakhshit 2003).

2.5.2. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğinde olan protein yapısındaki maddelerdir. Bazı reaksiyonları gerçekleştiren ve ribonükleik asit yapısında olan ribozimler dışında enzimlerin tamamı protein yapısındadır (Demirijian ve ark. 2001). Bir hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere ekstraselüler, sentezledikleri hücre içinde kalarak etkisini gösteren enzimlere intraselüler enzimler denir (Özata ve Türe 2001).

Mikroorganizmalar biyokimyasal olarak çeşitli olmaları ve genetik müdahalelere uygunlukları sebebiyle çok iyi bir enzim kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı (%90) mikroorganizmardan elde edilmektedir (Gupta ve ark.2003).

2.5.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler

Enzimler protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimler optimum sıcaklık, pH vs. koşullarda maksimum aktivite gösterirler. Enzimlerin optimum çalışma aktivitesine etki eden çeşitli etkenler vardır bunlardan bazıları şunlardır:

- Enzim konsantrasyonunun etkisi: Enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı artar.

- Isının etkisi: Enzim aktivitesinin hızı sıcaklık artıkça artar. Sıcaklık optimumu aşarsa enzim denatüre olur.
- Substart konsantrasyonunun etkisi: Enzim reaksiyonunun hızı substrat konsantrasyonu ile artar belirli bir süre sonra sabit devam eder.
- Zamanın etkisi: Enzimlerin aktivitesinde zamanın etkisi vardır.
- pH'nın etkisi: Her enzimin belirli bir pH aralığı vardır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH aralığına optimum pH denir.

Enzimler başlamış olan bir tepkimeyi hızlandırır, tepkimeleri başlatamazlar. Enzimler tepkimelerden değişmeden çıkar. Enzimler mayalı ekmek, peynir, yoğurt, şarap yapımında kullanıldığı bilinmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Bunun nedeni; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır (Kıran 2003, 2006, Nascimento ve Martins 2004).

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bu özelliklerinden dolayı bu enzimler pek çok alanda kullanılmaktadır. Ekmek yapımı, peynir, gıdaların yapımında çeşitli deterjanların yapımında kağıt ve kumaş sanayisinde, tıp ve ilaç yapımında da enzimlerden faydalanılır.

2.5.4. Proteazlar

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadır ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini kolaylaştırmaktadır (Tari ve ark.2006, Venugopal 2006).

Bilimsel olarak bilinen bazı proteazlar:

- Sistein proteaz
- Aspartik asit
- Threonine proteaz
- Serin proteaz
- Metalloproteaz

- Glutamik asit proteaz

2.5.5. Proteazların Biyoteknolojide Kullanımı

Porteaz enzimi endüstride en çok kullanılan enzimlerden bir tanesidir. Proteazlar günümüzde çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle deterjan üretimi, etlerin yumuşatılması, lekelerin giderilmesi, DNA teknolojisinde kullanılmaktadır.

Proteazlar hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilir. Bunlar arasında en etkin olanlar bakterilerden elde edilen proteazlardır. Son zamanlarda araştırmacılar bu özelliğinden dolayı endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere uygun proteazları üreten mikroorganizmalar üzerinde çalışmaktadır (Özşahin 2006, Najafi ve Sariri 2006).

Termofilik ve *Bacillus* bakterileri tarafından sentezlenen proteazlar yüksek sıcaklığa dayanıklı oldukları için endüstri alanlarında en çok tercih edilen enzimlerdir. Günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni proteazlar üzerinde durmaktadır (Özşahin 2006).

2.5.6. Amilazlar

Nişasta ve glikojen molekülleri amilazlar tarafından hidroliz edilerek, glikoz birimlerinden oluşan daha küçük yapılar ve dekstrinler gibi ürünler oluşturulur. Amilazları, hayvanlar ve bitkiler de sentezler, ancak biyoteknolojik olarak mikroorganizmalar daha avantajlıdır çünkü kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilir (Chakraborty ve ark. 2011). Bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen α-amilaz, β-amilaz, glikoizomeraz ve glikoamilaz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Kıran ve ark.2006, Lee 1994).

2.5.7. Amilaz Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları

Amilazlar biyoteknolojik öneme sahip çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar (Aygan 2008).

Gıda endüstrisinde amilazın kullanımı çok yaygındır. Ekmek ve unlu mamullerde kabarma, yumuşak ürün elde etmede, ekmeğin tat ve kalitesini düzeltici

etkilerde bulunur. Nişastanın parçalanmasıyla elde edilen glukoz ve fruktoz en çok üretim alanıdır. Bunlar özellikle tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.

Amilazların tekstil endüstrisinde üretimi ise ipliklerin sağlam olması için kullanılır. Amilazların kâğıt ve kâğıt hamurunda kullanım alanı ise; kâğıdın nişasta ile kaplanması kâğıdı hasarlara karşı korur. Kâğıdın sertliğini, direncini ve kalitesini de artırmaktadır.

Deterjan endüstrisinde amilazların kullanımı ise; kirliliğin temizlenmesi amacıyla kullanılır. Bu amaçla özellikle sıvı deterjanlar içerisinde amilaz enzimi kullanılır. Amilazlar ayrıca tıbbi alanda da ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Kandra 2003).

2.5.8. Nişasta

Nişasta yumrulu bitkilerde buğday, pirinç gibi tahılarda bulunan bir karbonhidrattır. Nişasta amiloz ve amilopektin olmak üzere iki karbonhidrattan oluşur. Amiloz ve amilopektin arasındaki farklılık; amiloz da dallanmalar yoktur ve α-1,4 bağları ile bağlıdır. Amilopektin ise dallanmalar oluşturur ve α-1,6 bağları vardır.

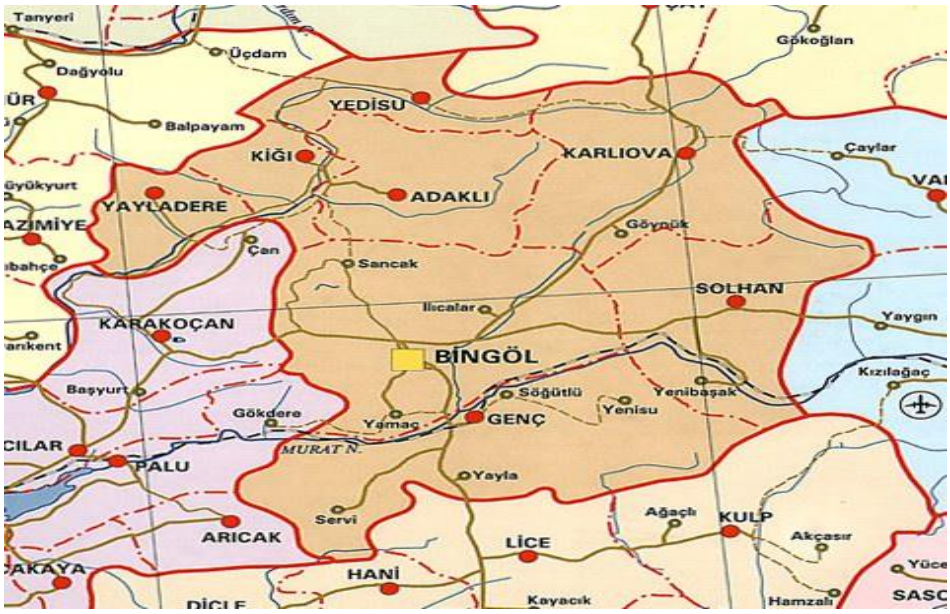
Amiloz sarmal bir yapı oluşturur. Amiloz iyot ile mavi renk verir. Yapısındaki hidrojen bağlarından dolayı çok az miktarda su bulundurur bu nedenle yapısı yoğundur. Amilopektinde ise dallanma noktaları vardır ve dallandıkça genişleyen bir yapısı vardır. Yapısı düzensiz ve düzenli halkalardan oluşurbu nedenle incelendiğinde kristal bir yapı oluşturur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Bingöl ilinin ılısu beldesinin Binkap kaplıcalarından alınan su ve çamur örneklerinden bakteri analizlerini yapabilmek için bakteri izolasyonu yapılmıştır.

Bingöl kaplıcaları; Kös kaplıcaları ve binkap içmeleri, Ilıcalar, Haçyan Çermiği, İngan Çermiği, Dikpınar Kaplıcası gibi kaplıcalar bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Bingöl ilçe ve kaplıcaları

Ilıcalar: Bingöl ili merkez ilçesine bağlıdır. Bingöl il merkezinin Doğu kuzeydoğu yönünde 19 km uzağında bulunur. La Deresinde kendiliğinden çıkan ve doğal sıcaklığı 40-50 ˚C olan suyun içerdiği mineraller sayesinde böbrek taşlarını düşürmede büyük fayda sağlıyor. Bu kaplıca Kös kaplıcası olarakta biliniyor. İki kaynağı bulunur.

a) **Hamam Kaynağı:** Bikarbonat, sodyum, kalsiyum, bromür ve arsenik içerir. Sıcaklığı 42,5^{o}C ve pH'sı 6,15'tir.
b) **Moteller Kaynağı:** Sodyum, kalsiyum içeren sülfatlı bir sudur. pH'sı 7,0 ve sıcaklığı 45^{o}C'dir.



Şekil 3.2. Kös Kaplıcası



Şekil 3.3. Kös Kaplıcası

Has köy-Alınyazı-Sabırtaşı (Yayladere) Kaplıcaları:

Bu kaplıcalar Bingöl'ün Yayladere ilçesi çevresinde bulunur. Hasköy ılıcası Yayladere merkezine 5 km güneyde bulunur. Alın yazı ve Sabır taşı ılıcaları ise 25 km doğusunda bulunur. Has köy ılıcasının sıcaklığı 33^{o}C pH'sı 6, Alın yazı Ilıcası sıcaklığı 46^{o}C pH'sı 6.60, Sabır taşı ılıcası sıcaklığı 47^{o}C pH'sı 8.30' dur.



Şekil 3.4. Sabır Taşı Kaplıcası (Çelebi 1994)

Haçyan Çermiği: Bingöl'ün Genç İlçesinin 30 km batısında Haçyan Köyündedir. Bu çermiğin su cilt hastalıklarına iyi geldiği tespit edilmiştir.

İngan Çermiği: Genç İlçesinin İngan köyündedir. Cilt hastalıklarına iyi gelir.

Dikpınar Ilıcası: Bingöl'ün Genç ilçesinin batısındadır.

Çizelge: 3.1. Kullanılan aletler

Kullanılan Aletler:
Etüv(Heraus)
İnkübatör(Sanyo)
Çalkalayıcı(Julobo)
Vorteks(Stuart)
Otoklav
pH metre(Jenvay 3010,PCP J01 elektrod)
Magnetik Karıştırıcı (Stuart)
Steril Kabin(Telstar AV-100)
Sterilizatör (Heraus)
Spektrofotometre (Pharmaci 4KB Novaspec 2)
Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)
Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100 ˚C)
Dijital Göstergeli Hassas Terazi (GEC, AVERY, 0,0001)

3.2. Kimyasal Maddeler

SDS, MERCK DARMSTAG' dan elde edilmiştir.

Nutrient Broth, OXOID' den temin edilmiştir.

Agar, ATABAY ' dan temin edilmiştir.

Tris –Base[Tris (hydroxymetyl) amino methane],akrilamid, standart proteinler ticari α amilaz, SDS (sodyum dodesil sülfat), glisin, N-N-Metilen bisakrilanid ve Gliserol, MERCK DARMSTAG'dan temin edilmiştir.

3.3. Boya Maddeleri

3.3.1. Gram Boyama için;

Lugol, sulu fuksin, %96 ‘lık alkol, kristal viyole kullanıldı.

3.4. Tamponlar

pH: 4, pH:5, pH:6 tamponları için; 0,1 M sitrik asit ,

pH:7, pH:8, pH:9 tamponları için; 0,1M tris-HCl,

pH:10, pH:11 tamponları için; 0,1 M karbonat/ bikarbonat tamponları hazırlandı.

3.5. Besi Yerleri için;

3.5.1. Katı Besi Yeri için;

15 g agar 25 g Nutrient Broth üzerine ilave edilip distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlandı.

3.5.2. Sıvı Besi Yeri için;

Bir litre sıvı besi yeri için 25 g Nutrient Broth ve distile su karıştırılarak otoklavlandı.

3.6. İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi

Bu çalışma için içerisinde 90 ml steril su bulunan erlenlere steril ortamda 10 gr çamurlu örnek aktarılarak 10^{-1} lik seyreltmeler elde edilmiştir. Elde edilen karışımlar çalkalanarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra aynı şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4},10^{-5} lik dilüsyonlar sağlanmıştır.

Seyreltilerek farklı oranlarda elde edilen süspansiyonlardan 1ml alınarak daha önceden steril edilen ortamda ve petri kutularına aktarılmış, üzerlerine 20 ml besiyerlerinden ilave edilerek homojenizasyonları sağlanmıştır. Bu işlemler yapılmadan önce 80°C‘de 10 dakika boyunca seyreltilmiş bu süspansiyonlar bekletilmiştir. Bu süre de bekletilen mikroorganizmalardan spor oluşturabilenler canlılıklarını korurken, spor oluşturamayanlar canlılıklarını yitirir. Seyreltilen süspansiyonlar petri kutularına aktarılmış. Hazırlanan 10 petri kutusuna ekim yapılarak mikroorganizmaların izolasyonları için 55°C’de 3-6 gün boyunca inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların izolasyonunu sağlamak için su ve çamur örneklerinden alınan örnekler besiyerine

ekimleri yapıldı ve 55 °C de inkübasyona bırakıldı. 24 saat süre ile inkübasyonu sağlanan besiyerlerinden, katı besiyerlerine ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir. Mikroorganizmaları sıvı besi yerine aktarmak için, hazırlanan NB sıvı besiyerine katı besiyerinden öze yardımıyla ekim yapıldı. Ekim yapılan sıvı besiyeri çalkalayıcıda 200 rpm' de 24 saat boyunca 55 °C bırakıldı.

3.7. Mikroorganizmaların Gelişiminde pH'nın Etkisi

Mikroorganizmaların gelişimleri üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi için 100 ml sıvı besi yerlerine pH 4-5-6-7-8-9-10-11 şeklinde ayarlanarak besiyerleri otoklava bırakıldı. İzolasyonu yapılan mikroorganizmalardan 1 ml alınarak ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı. İzolasyonu yapılan mikroorganizmalar optimum sıcaklıkta ve optimum üreme zamanında 160 rpm' de inkübasyon için çalkalayıcıya bırakıldı. Daha sonra optimum pH'nın tespiti için spektrofotometrede 470 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.

3.8. Mikroorganizmaların Gelişimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Mikroorganizmaların gelişimi üzerine inkübasyon süresinin etkisinin araştırılması için 100 ml sıvı besi yeri otoklavlandı. Daha önce elde edilen mikroorganizmalardan 1 ml alınarak besi yerlerine bakteri ekimi yapıldı. Hazırlanan besi yerleri 160 rpm'de 45 °C'de çalkalayıcıya bırakıldı ve 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 ve 48. saatlerde üretilen bakterilerin 470 nm' de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

3.9. Bakterilerin Gram Boyaması

Bakterilerin gram boyaması için katı besi yeri hazırlandı. Katı besi yerine bakterilerin ekimi bir gün öncesinde yapıldı. 24 saat sonrasında plastik öze yardımıyla koloni alınıp lamın üzerine bırakıldı. Birkaç damla distile su ile yayma işlemi yapıldı. Yayma işlemi bittikten sonra lam kurutulup, alevden geçirildi bakterilerin tespiti yapıldı. Daha sonra hazırlanan preparat üzerine kristal viyole damlatılarak 2 dakika boyanması için bekletildi. Preparat daha sonra su ile yıkandı. Sudan geçirildikten sonra lugol damlatılarak 1 dakika bekletildikten sonra yıkandı. Damlatılan lugolun preparatan tam çıkması ve bakterilerin tespiti için %96 lık alkol preparata döküldü 10-15 sn. bekletildi daha sonra tekrar yıkandı. Son basamakta ise sulu fuksin preparata dökülerek

2 dakika bekletildi. Boyanın giderilmesi için su ile yıkandı. Preparat kurutma kağıdında kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelendi.

3.10. Sıcaklığın Bakteri Üremesine Etkisinin Araştırılması

NB ile hazırlanan sıvı besi yerine daha önceden izole edilen bakterilerden 1ml alınarak ayrı ayrı erlenlere ekimleri yapıldı. Sıcaklığın bakteri üremesi üzerine etkisini incelemek için 20-25-30-35-40-45-50-55 $^{\circ}C$ ye bırakıldı. İzole edilen her bakteri için optimum üreme zamanında çalkalayıcıda bekletildi. Son olarak da spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

3.11. Mikroorganizmalara Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

3.11.1. Katalaz Testi

Mikroorganizmaların katalaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini araştırmak amacıyla bu test yapılır. Bu testin yapılması için 24 saat önce hazırlanmış katı besi yerinden mikroorganizmalar kullanılır. Plastik öze yardımıyla bir miktar kültürden alınır ya da kültürün bulunduğu petri kutusuna hazırlanan %3 lük hidrojen peroksit ilave edilip incelenir. Kolonilerin üzerine hidrojen peroksit ilave edildikten sonra eğer kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıklar oluşursa bu mikroorganizmaların katalaz enzimini sentezlediği, hava kabarcıkları oluşmazsa katalaz enziminin sentezlenmediği tespit edilir.

3.11.2. Nişasta Hidrolizi Testi

Nişasta hidroliz testi, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen amilaz enziminin nişastayı parçalayıp parçalamadığını incelemek amacıyla yapılır. Bu testin yapılması için petri kutularına %3 lük hazırlanan nişastalı agar dökülür. Hazırlanan nişastalı agar üzerine elde edilen bakterilerin çizgi ekimi yapılır ve her bakteri için optimum sıcaklıkta 2-4 gün bekletilir. Bu sürenin sonunda agarın bulunduğu petri kutularına 0,5g I_2 ve 1g KI (150 ml) ile hazırlanan karışım ile kaplandı ve tepkime için 4-5 dakika içinde değerlendirildi.

3.11.3. Üreaz Testi

Bu biyokimyasal testin yapılmasının nedeni; bakterilerin üreyi parçalayan üreaz enzimini üretip üretmediğini incelemek için yapılır. Bunun için üre ile hazırlanan agar

tüplerde hazırlandı. Hazırlanan besi yerine bakterilerin ekimi yapıldıktan sonra 2-5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Optimum sıcaklık süresinde bırakılan besiyerlerinde renk değişiminin olup olmadığı incelendi.

3.11.4. Jelatin Hidroliz Testi

Bu biyokimyasal testin yapılama nedeni jelatini parçalayan jelatinaz enziminin bakteriler tarafından üretilip üretilmediğini incelemek için yapılır. Bu inceleme için %10 jelatin içeren besi yeri hazırlandı. Bu besi yerine taze hazırlanan bakteri kültüründen ekim yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri optimum sıcaklıkta 8-10 gün kadar bekletildi. Daha sonra bu sürenin sonunda buzdolabın da 1-3 saat bekletildi. Hazırlanan bu jelatin de erimenin olup olmadığı incelendi.

3.11.5. Kazein Hidroliz Testi

Bu biyokimyasal testin yapılma nedeni bakterilerin süt proteini olan kazeini proteaz enzimi aracılığıyla parçalayıp parçalamadığını incelemek için yapılır. Bu incelemenin yapılması için %10 skim milk olan katı besi yeri hazırlandı. Bu besi yerine hazırlanan bakteri kültüründen ekim yapıldı ve 24 saat optimum sıcaklıkta bekletildi. 24 saatin sonunda besiyerinde üreyen bakterilerin kolonilerinin etrafında şeffaf zonların oluşup oluşmadığı incelendi. Bu zonların daha iyi incelenmesi için %1 HCI dökülerek incelendi.

3.12. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi

Bu testin yapılma nedeni bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri duyarlılığı incelemek için yapılır. Bu inceleme için bakterilerin üremesi için katı besi yeri hazırlandı. Bu besi yerine bakteri ekimi yapıldıktan sonra ortama Lincomycin (My15), Penicilin G(P_2), Ampicilin (AMP10) antibiyotiklerinin bulunduğu diskler belirli aralıklarla besi yerine bırakıldı. Daha sonra optimum sıcaklığa bırakıldı. Süre sonunda disklerin etrafında zon olup olmadığı incelendi ve varsa ölçümler yapıldı.

3.13. Bakterilerde Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

Bakterilerin enzim aktivite tayinlerinin yapılması için NB-sıvı besi yeri hazırlandı. Daha önce kültürü hazırlanan bakterilerden öze yardımıyla sıvı besi yerine ekim yapıldı. Bakterilerin optimum üreme süresi ve sıcaklığında 24 saat bekletildikten

sonra besi yeri 10.000 rpm ‘de 5 dakika santrifüj edildi. Enzim aktivitelerinin ölçümü için üst sıvı kullanıldı.

3.13.1. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi,1951)

Alkalin Çözeltisi Hazırlanışı

Alkalin çözeltisi için üç farklı cam tüpte ayrı ayrı çözelti hazırlanır. Bunu için;

X; % Na-K-Tartarat içerisinde %5 $CuSO_4.5H_2O$ çözdürüldü.

Y; 0,1 N NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3 çözüldü.

Z; 50 ml X ile 1 ml Y çözeltileri karıştırılarak oluşturulur.

Protein miktar tayini için standart protein çözeltisi hazırlanır. Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre hesaplanması için hazırlanan standart ve 50 µl enzim karıştırılıp çözelti haline getirildikten sonra hazırlanan cam tüplere 5 ml alkalin çözeltisi eklendi. Hazırlanan bu çözelti 40 ºC ‘de 15 dakika bekletildi. Hazırlanan tüplere 1:1 oranında seyreltilen 500 µl FCR (Folin reaktifi) eklendi. FCR eklendikten sonra 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. Beklenen süre geçtikten sonra 660 nm’de spektrofotometrede absorbans değerleri incelenir.

3.13.2. Proteaz Enzimi Aktivitesinin İncelenmesi (Leighton ve ark.1973)

Proteaz enzimi aktivitesinin incelenmesi için Leighton ve ark.(1973) substrat olarak 500 µl azokazein kullanıldı. Bu substratın üzerine 250 µl enzim eklendi. Hazırlanan çözelti 50ºC’de 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda başlayan reaksiyonun durdurulması için 2 ml TCA (trikloroasetikasit) eklendi. Bu çözelti eklendikten sonra 4 ºC’de 15 dakika bekletilir. Daha sonra santrifüj edilir ve üst sıvıdan 400 µl süzüntü alındı. Alınan üst sıvının üzerine 800 µl 1,8 M NaOH eklenir. Daha sonra elde edilen çözelti 420 nm’de absorbansı ölçüldü.

Azokazein Çözeltisinin Hazırlanması

%5‘lik azokazein 0,1 M karbonat/ bikarbonat tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

3.13.3. Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi (Bernfeld Yöntemi, 1955)

Amilaz enziminin aktivitesini incelemek için Bernfeld yöntemi ile inceleme yapıldı. Buna göre santirifüj edilen sıvı besiyeri üzerinden alınan enzim çözeltisinden (üst sıvı) 100µl alınıp cam tüpe konulur. Üzerine 200 µl %0. 5'lik nişasta çözeltisi konulur ve 30 dakika boyunca 50 ^{o}C'de bekletilir. Başlayan reaksiyonu süre sonunda durdurmak için 400 µl DNS (3,5 dinitro salisilik asit) eklenir ve su banyosunda 5 dakika beklenir. DNS ' nin reaksiyona girmesi için kaynar su banyosunda bekletilmesi gerekir. DNS sıcakta reaksiyona girerek renk değişimine de neden olur. Son olarak 3 ml su ile seyreltme yapılır ve 489 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılır.

Bernfeld Yöntemiyle Reaktifin Hazırlanması

Beher içerisinde 20 g DNS 400 ml distile su içerisinde çözündürüldü. 32 g NaOH 300 ml distile suda çözündürüldü. Hazırlanan NaOH çözeltisi yavaş bir şekilde DNS üzerine eklendi ve su banyosunda bekletildi. Sıcak su banyosunda biraz bekletildikten sonra yavaş yavaş 600 g Na-K eklendi. Elde edilen karışım 2000 ml'ye su ile tamamlandı.

3.14. Proteaz ve Amilaz Enzimlerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Enzimlerin üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için sıvı besi yerinde üretilen bakteriler santrifüj edilip üst sıvı alındı. Alınan üst sıvı ile 20 ^{o}C 'den başlanarak 60 ^{o}C'ye kadar Leighton ve ark. (1973) proteaz enzimi, Bernfeld (1955) yöntemine göre amilaz enzimi aktivitesine bakıldı.

3.15. Proteaz ve Amilaz Enzimleri Aktivitesine Zamanın Etkisi

Hazırlanan 100 ml NB sıvı besi yerlerine 1'er ml bakteri ekimi yapıldı. Her bakteri için optimum sıcaklığa bırakıldı. 3 saatlik aralıklar ile 48 saate kadar Bernfeld yöntemine göre amilaz ve Leinghton ve ark. (1973) göre proteaz enzimi inkübasyon süreleri araştırıldı.

3.16. Proteaz ve Amilaz Enzimlerine pH' nın Etkisinin İncelenmesi

Proteaz ve amilaz enzimlerine pH' nın etkisini ölçmek için NB sıvı besi yerinde hazırlanan bakteriler santrifüj edilip üst sıvı alındı. Substrat olarak nişasta ve azokazein

kullanıldı. Bunun için nişasta ve azokazein %0,5'lik olacak şekilde sitrik asit (0,1M pH 4-5-6) Tris-HCI (0,1M pH 7-8-9) ve karbonat/bikarbonat (0,1 M pH 10-11) tamponlarında hazırlandı. Tamponlar hazırlandıktan sonra Bernfeld (1955) yöntemine göre amilaz ve Leighton ve ark. (1973) göre proteaz enzimlerine pH etkisi incelendi.

3.17. 16S rRNA Gen Dizi Analizi

Bakterilerin 16S rRNA dizi analizi için izole edilen bakterilerin örnekleri Ankara üniversitesi Gen Araştırma ve Biyoteknoloji laboratuarı REFGEN'e gönderilmiştir. İzole edilen bakterilerin filogenetik ağaçları çıkarılmıştır. Bakterilerin yakın olduğu türler belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bingöl'ün Ilıcalar ilçesinin sıcak su kaynaklarından alınan su örneklerinden bakteri izolasyonu yapıldı. Su ve çamur örneklerinden plastik öze yardımıyla hazırlanan katı –agar besi yerine çizgi ekim yapıldı. Sıcak su kaynağının farklı yerlerinden alınan örneklere isim verildi. Kaynağın çıkış noktasından alınan farklı su örnekleri 1NK (normal katıdan), 2NK, 3NK, 4NK ve 5NK ve 6D (dirkt örnek) olarak adlandırıldı. Bunlardan en iyi üreme gösteren 4NK ve 5NK seçilmiştir.



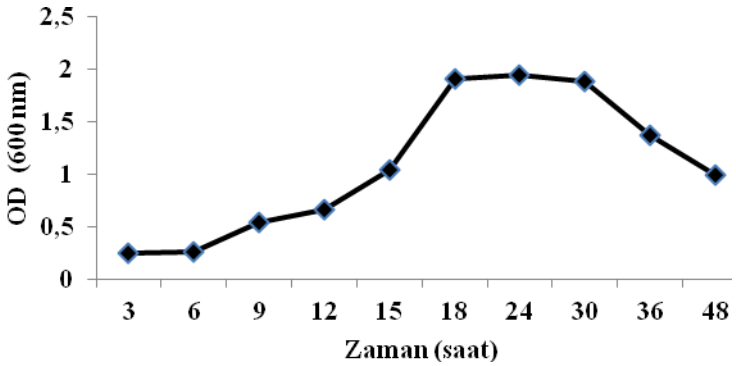
Şekil 4.1. 4NK İzolatının Çizgi Ekimi



Şekil 4.2. 5NK İzolatının Çizgi Ekimi

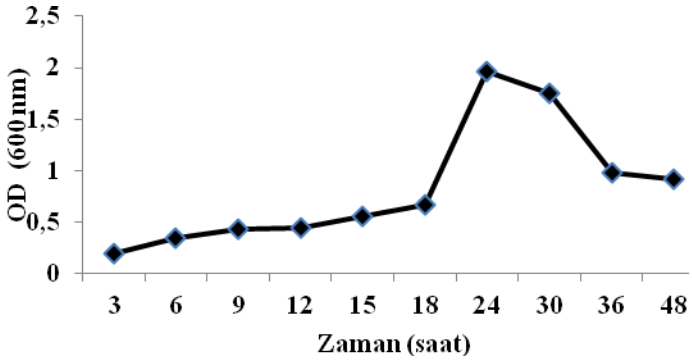
4.2. Zamanın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi

Sıcak su kaynağından izole edilen 4NK için uygun inkübasyon süresi incelendi. Bunun için besi yerine ekimi yapılan 4NK bakterisi 40 ºC'de üretimi yapılmıştır. Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi 6. saatten itibaren bakteri üremesinde artış olmuş ve 15.saatten itibaren maksimum değere ulaşmış, 30. saatten sonra ise azalma eğilimine girmiştir. Buna göre 4NK'nın inkübasyon süresinin bakteri üremesine optimum zamanı 24 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. İnkübasyon Süresinin 4NK'nın üremesine etkisi

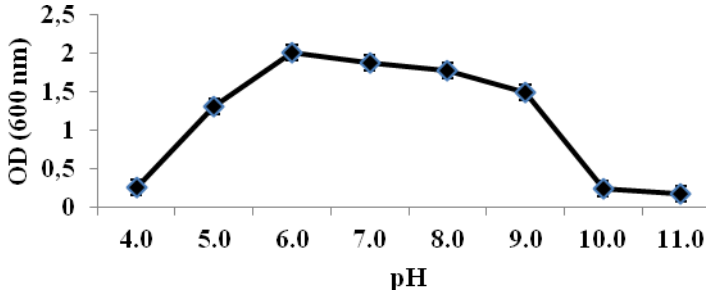
Sıcak su kaynağından izole edilen 5NK için uygun inkübasyon süresi incelendi bunun için besi yerine ekimi yapılan 5NK bakterisi 45 ºC'de üretimi yapılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi 3. saatten itibaren bakteri üremesinde artış olmuş,18.saatten itibaren maksimum değere ulaşmış, 24. saatten itibaren azalma eğilimine girmiştir. Buna göre 5NK'nın inkübasyon süresinin bakteri üremesine optimum zamanı 24 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. İnkübasyon süresinin 5NK'nın üremesine etkisi

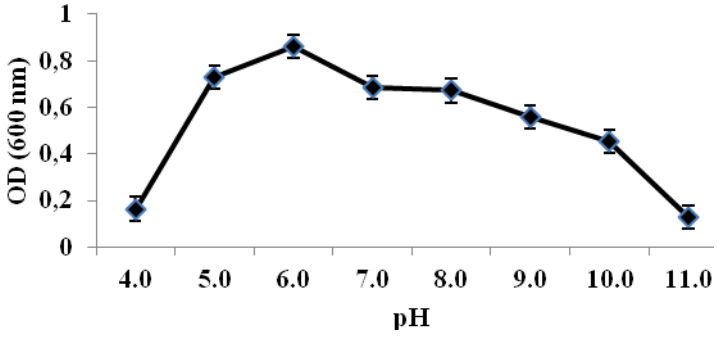
4.3. pH'nın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi

Sıcak su kaynağından alınan su örneğinden izole edilen 4NK ‘nın farklı pH değerlerinde üremelerini incelemek için pH 4’ten pH 11’e kadar uygun besi yerinde (NB) ve 50^{o}C’de optimum üreme zamanı 24 saat inkübe edildi. Şekil 4.5.’te görüldüğü gibi pH 4’ten itibaren üreme başlamış, pH 6’da optimum değere ulaşmış, pH 6’dan itibaren azalma eğilimine girmiştir. pH 10’dan itibaren ise üreme olmadığı gözlenmiştir. 4NK bakterisi için optimum üreme pH’sı 6 olarak belirlenmiştir.



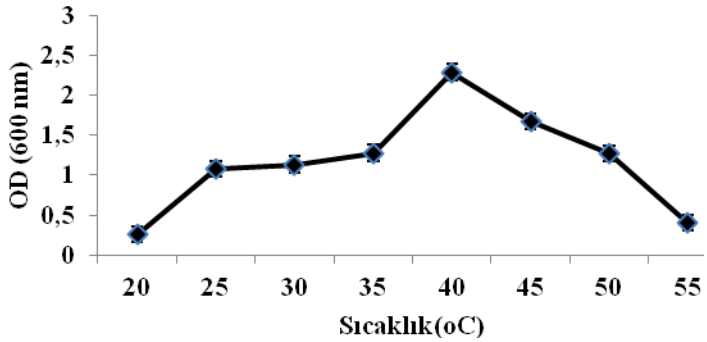
Şekil 4.5. pH’nın 4NK üremesine etkisi

Sıcak su kaynağından alınan su örneğinden izole edilen 5NK ‘nın farklı pH değerlerinde üremelerini incelemek için pH 4’ten pH 11’e kadar uygun besi yerinde (NB) ve 50^{o}C’de optimum üreme zamanı 24 saat inkübe edildi. Şekil 4.6’da görüldüğü gibi pH 4’ten itibaren üreme meydana geldiği pH 6’ da optimum değere ulaştığı, pH 6’dan itibaren azalma olduğu gözlenmiştir. pH 11’den itibaren ise üreme olmadığı gözlenmiştir. Buna göre 5NK bakterisi için optimum pH’nın 6 olduğu belirlenmiştir.



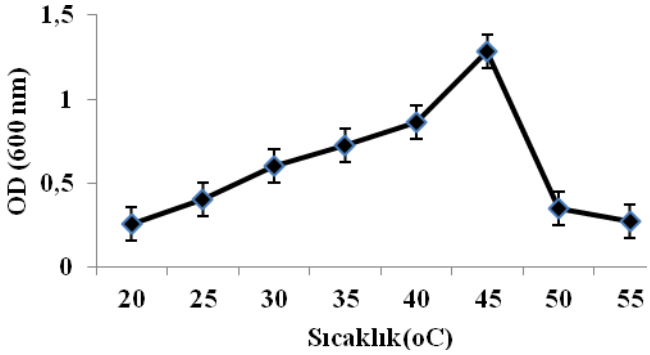
4.4. Sıcaklığın Bakterilerin Üremesine Etkisinin İncelenmesi

İzole edilen 4NK ‘bakterisi için uygun üreme sıcaklığını belirlemek amacıyla 5 ºC’lik artışlarla 20ºC’den başlanarak 55ºC’ye kadar uygun besi yerinde optimum zaman olan 24 saat boyunca inkübe edildi. Şekil 4.7’ da görüldüğü gibi 20ºC’den itibaren hızlı bir üreme meydana gelmiştir. 20ºC’den itibaren üremede bir azalma meydana gelmiş, 45ºC’de ise optimum üreme gözlenmiş bu sıcaklıktan itibaren ise üremede azalma görülmüştür. Buna göre 4NK bakterisi için optimum üreme sıcaklığı 40ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Sıcaklığın 4NK ’nın üremesine etkisi

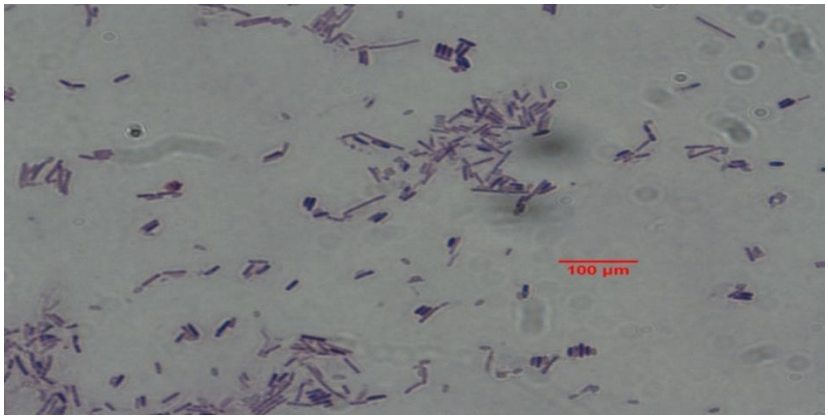
İzole edilen 5NK ‘bakterisi için uygun üreme sıcaklığını belirlemek amacıyla 5 ºC’lik artışlarla 20ºC’den başlanarak 55ºC’ye kadar uygun besi yerinde optimum zaman olan 24 saat boyunca inkübe edildi. Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi 20ºC’den itibaren yavaş yavaş artan bir üreme meydana gelmiştir. 40ºC’den itibaren hızlı bir artış olmuş ve 45ºC’de ise maksimum değere ulaşmış bu sıcaklıktan sonra azalma eğilimine girmiştir. Buna göre 5NK bakterisinin optimum üreme sıcaklığı 45ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Sıcaklığın 5NK’nın üremesine etkisi

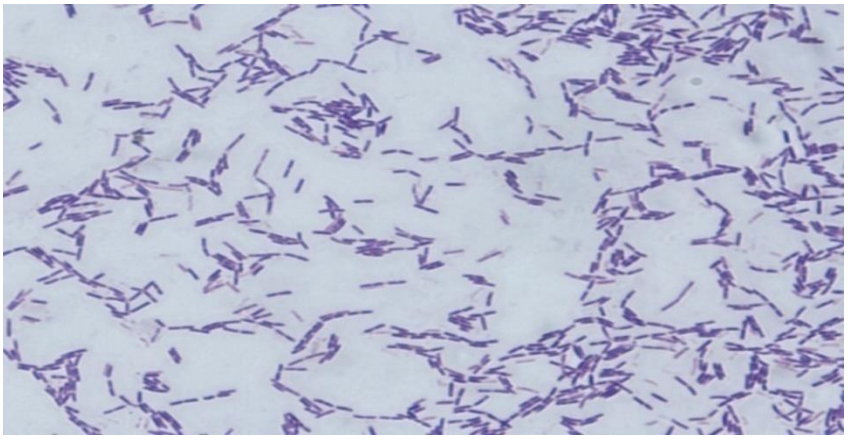
4.5. Bakterilerin Gram Boyaması

Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin gram boyaması ve şeklini belirlemek amacıyla gram boyama işlemi yapıldı. Şekil 4.9' da görüldüğü gibi Binkap sıcak su kaplıcasından izole edilen 4NK bakterisinin gram boyaması yapılmıştır. Buna göre bakterinin gram pozitif (+) olduğu ve çubuk şeklinde olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9. 4NK'nın gram boyaması

Binkap kapılıcasının farklı yerlerinden alınan su örneklerinden izole edilen 5NK bakterisinin gram boyaması yapılmıştır. Buna göre aşağıda şekil 4.10'da görüldüğü gibi 5NK bakterisinin gram (+) ve şeklinin çubuk oluğu gözlenmiştir.



Şekil 4.10. 5NK'nın gram boyaması

4.6. Bakterilerin Fizyolojik, Morfolojik ve Biyokimyasal Testlerinin Genel İncelemesi

Aşağıdaki çizelge 4.1'de 4NK ve 5NK bakterilerinin fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal testlerinin sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. 4NK ve 5NK bakterilerinin test sonuçlarının incelenmesi

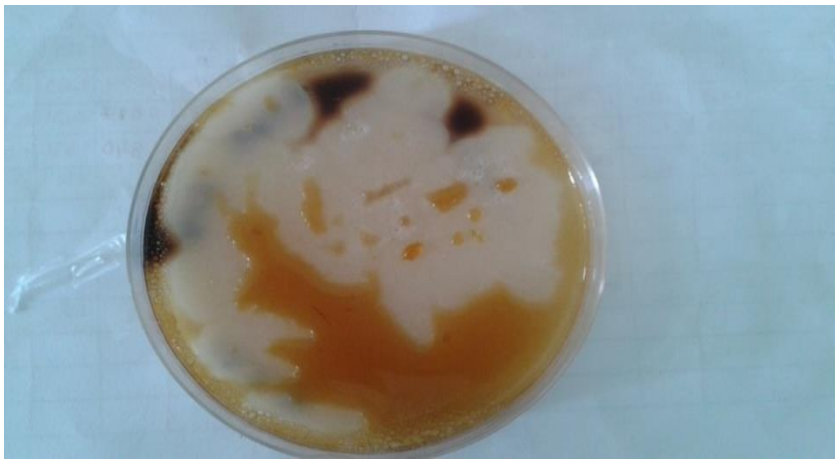
+: pozitif

-: negatif

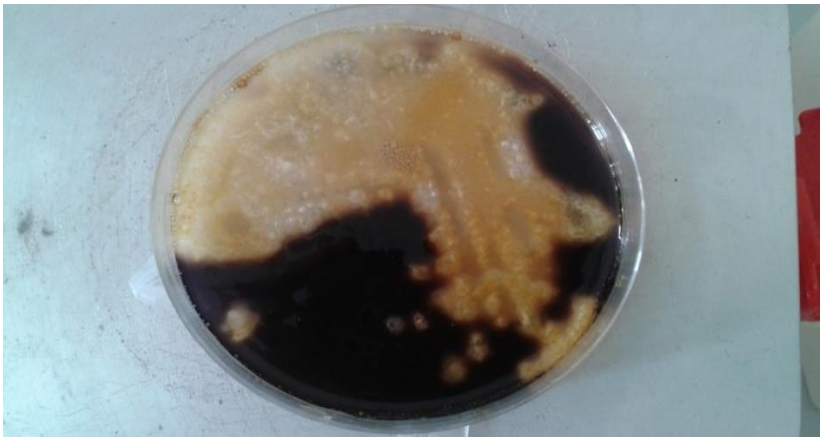
	4NK	**5NK**
Hücre Şekli	Çubuk	Çubuk
Gram Boyama	(+)	(+)
Sıcaklık (°C)	25-55	25-55
pH	5,0-9,0	5,0-10,0
Katalaz Aktivitesi	(+)	(+)
Oksidaz aktivitesi	(+)	(+)
Üreaz Aktivitesi	(+)	(+)
Sitrataz aktivitesi	(+)	(+)
Jelatin Hidrolizi	(+)	(+)
Kazein Hidrolizi	(+)	(+)
Nişasta Hidrolizi	(+)	(+)

4.6.1. Nişasta Hidroliz Testi

Sıcak su kaynağından izole edilen 4NK ve 5NK bakterilerinin, nişastayı parçalayan ekstraselüler amilaz enzimini üretip üretmediğini incelemek amacıyla nişasta ile hazırlanan katı besi yerine ayrı ayrı 4NK ve 5NK bakteri ekimleri yapıldı. 24 saat optimum sıcaklıkta inkübe edilen besi yerleri üzerine iyodür solüsyonu damlatılarak renk değişimi incelendi. Şekil 4.11 ve şekil 4.12'de görüldüğü gibi 4NK ve 5NK bakterilerinin nişasta hidroliz sonuçları gösterilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi nişastanın parçalanmadığı yerler iyodür ile koyu menekşe rengine boyandığı, nişastanın amilaz enzimi ile parçalanan yerlerde kolonilerin etrafında zonlar oluştuğu gözlenmiştir. Buna göre 4NK ve 5NK bakterilerinin sentezlediği amilaz enzimi güçlü bir nişasta parçalayıcı olarak reaksiyon göstermiştir.



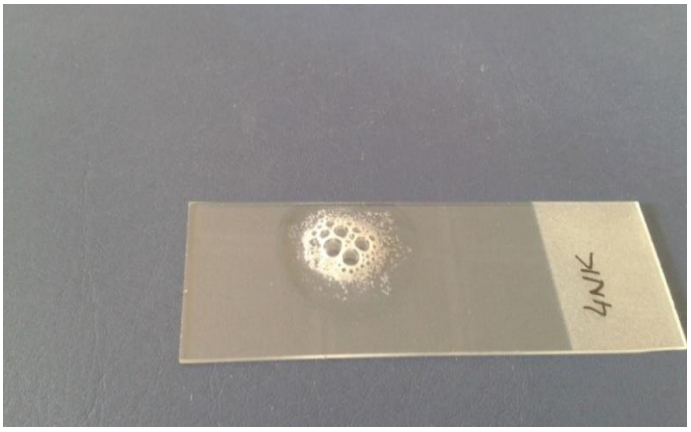
Şekil 4.11. 4NK'nın Nişasta Hidroliz Testi



Şekil 4.12. 5NK'nın Nişasta Hidroliz Testi

4.6.2. Katalaz Hidroliz Testi

İzole edilen 4NK ve 5NK bakterileri katı besi yerine çizgi ekim ile ekim yapıldı. 24 saat süre ile optimum sıcaklığa inkübasyona bırakıldı. 4NK ve 5NK bakterilerinin katalaz enzimini sentezleyip sentezlemediklerini incelemek için ekim yapılan katı besi yerinden birer örnek plastik öze yardımıyla alınarak lam üzerine bırakıldı. Daha sonra hazırlanan %3 'lük hidrojen peroksit üzerine ilave edildi ve gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmayacağı gözlendi. Aşağıdaki şekil 4.13 ve şekil 4.14'te görüldüğü gibi 4NK ve 5NK bakterilerinin bulunduğu yerde gaz kabarcıkları oluşmuştur bu da katalaz enziminin sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.13. 4NK'nın katalaz testi



Şekil 4.14. 5NK'nın katalaz testi

4.6.3. Jelatin Hidroliz Testi

İzole edilen 4NK ve 5NK bakterilerinin jelatini hidroliz eden jelatinaz enzimini sentezleyip sentezlemediğini incelemek amacıyla %10 jelatin içeren besi yeri hazırlandı. Katı besi yerine ekimi yapılan ve inkübe edilen besi yerlerinden ekim yapıldı. 24 saatin sonunda buzdolabında 1-2 saat kontrollerle bırakıldı. Ekim yapılan jelatin içeren besi yerinde erime olup olmadığı incelendi. Buna göre inceleme sonucunda 4NK ve 5NK'nın bulunduğu besi yerlerinde erime olduğu gözlenmiştir. Bu bakterilerin jelatinaz enzimi ürettiği tespit edilmiştir.



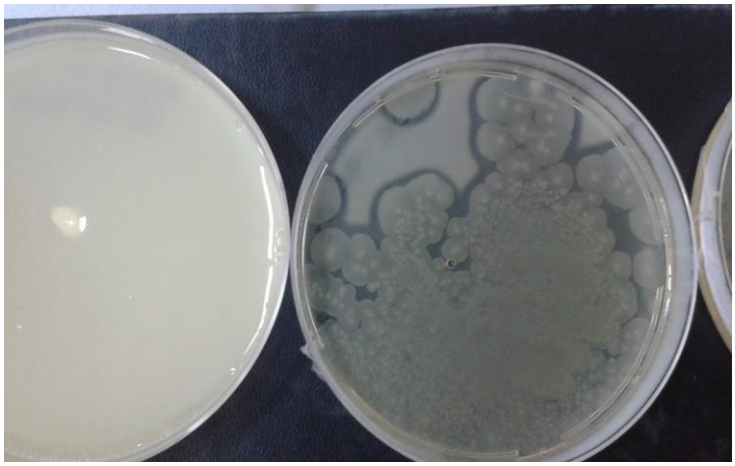
Şekil 4.15. 4NK'nın jelatin hidroliz testi(soldaki kontrol)



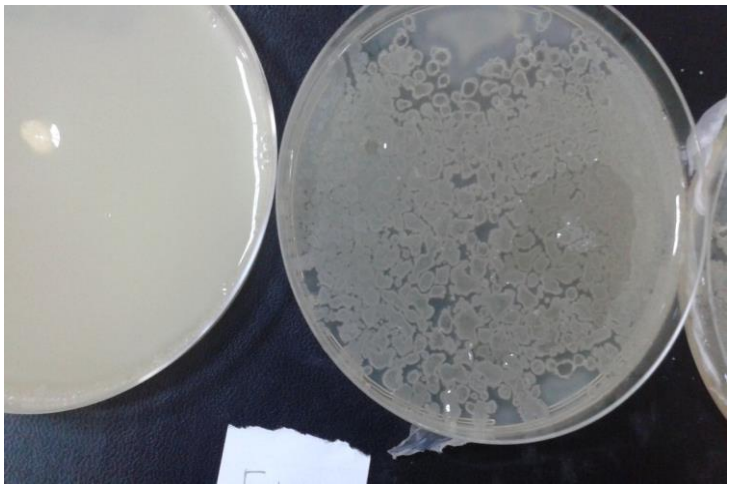
Şekil 4.16. 5NK'nın Jelatin Hidroliz Testi(soldaki kontrol)

4.6.4. Kazein Hidroliz Testi

İzole edilen bakterilerin süt proteini olan kazeini proteaz enzimi ile parçalanıp parçalanmadığını ve bakterilerin bu enzimi üretip üretmediğini incelemek amacıyla bu test yapılmıştır. Bunun için hazırlanan katı –agar besi yerine %10 skim milk eklenerek hazırlandı. 24 saat boyunca optimum üreme sıcaklığına bakteriler bırakıldı. Süre sonunda ekim yapılan besi yerlerin içinde kolonilerin çevresinde şefaf zonlar oluşup oluşmadığı incelendi. Bu zonların tam incelenmesi için üzerine hazırlanan %1'lik HCI damlatılarak inceleme yapıldı. Aşağıdaki şekil 4.17 ve şekil 4.18'de 4NK ve 5NK bakterilerinin bulunduğu besi yerleri gözlenmiştir. Bakteri kolonlarının etrafında zonlar oluşmuş ve böylece proteaz enziminin kazeini parçaladığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.17. 4NK'nın Kazein Hidroliz Testi



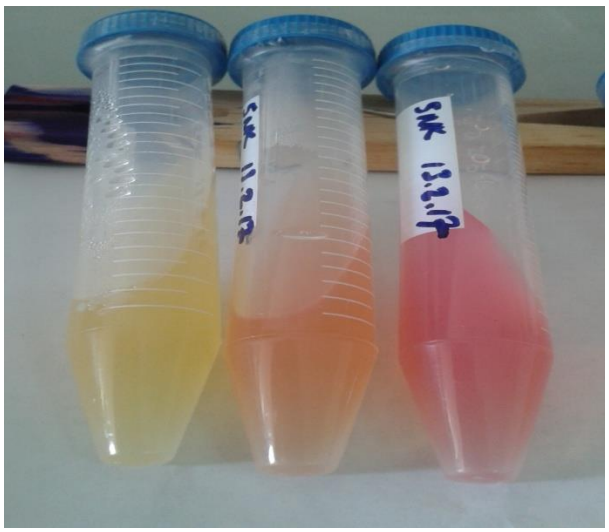
Şekil 4.18. 5NK'nın Kazein Hidroliz Testi

4.6.5. Üreaz Testi

İzole edilen 4NK ve 5NK bakterilerinin üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezleyip sentezlemediklerini incelemek amacıyla bu test yapılmıştır. Bunun için üre içeren agarlı besi yeri hazırlandı. Hazırlanan besi yerlerine bakterilerin çizgi ekimi yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 2-5 gün boyunca optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Aşağıdaki şekil 4.19 ve şekil 4.20'de 4NK bakterisi sarı renkli kontrolle karşılaştırıldığında pembe renk değişimi olduğu görülür. 5NK bakterisinde de açık pembe renk değişimi olduğu tespit edilmiştir. Buna göre her iki bakterinin de üreyi parçaladığını, üreaz enzimini sentezledikleri sonucuna ulaşılır.



Şekil 4.19. 4NK'nın Üreaz Testi(en soldaki kontrol)

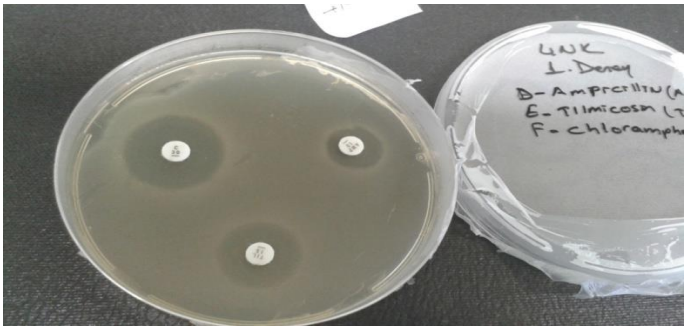


Şekil 4.20. 5NK'nın Üreaz Testi(en soldaki kontrol)

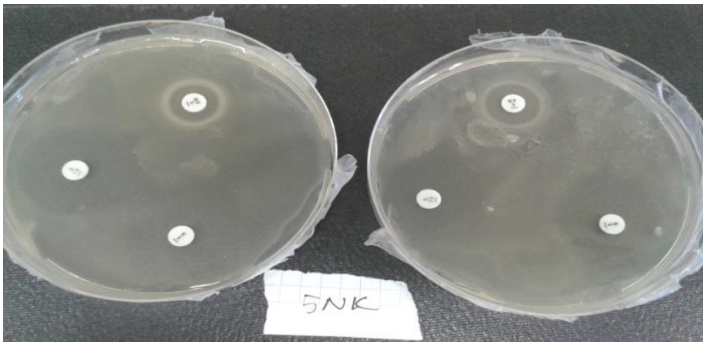
4.6.6. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Duyarlılığı

İzole edilen 4NK ve 5NK bakterilerinin antibiyotiklere karşı duyarlılığını ölçmek için bu test yapıldı. Bunun için hazırlanan katı besi yerine bakterilerin ekimi ayrı ayrı yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 6mm kağıt disklerden oluşan antibiyotikler ekim yapılan yüzeye bırakıldı. Ayrı ayrı konulan disklerden bazıları Lincomycin (My15), Penicilin G(P2), Ampicillin(AMP10), Kanamycin(K5), Neomycin(N10) gibi antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler ekim yapılan yüzeye bırakıldıktan sonra optimum sıcaklık ve süreye bırakıldı. İnkübasyon sonunda antibiyotiklerin bulunduğu yerlerde zonların oluşup oluşmadığı incelendi. Oluşan bu zonların büyüklüğü ölçüldü. Şekil

4.21 ve şekil 4.22'de görüldüğü gibi zon oluşmuşsa bakterilerin antibiyotiklere duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çizelge 4.2'de verilen sonuçlara göre iki bakterininde antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları verilmiştir.



Şekil 4.21. 4NK'nın antibiyotik duyarlılık testi



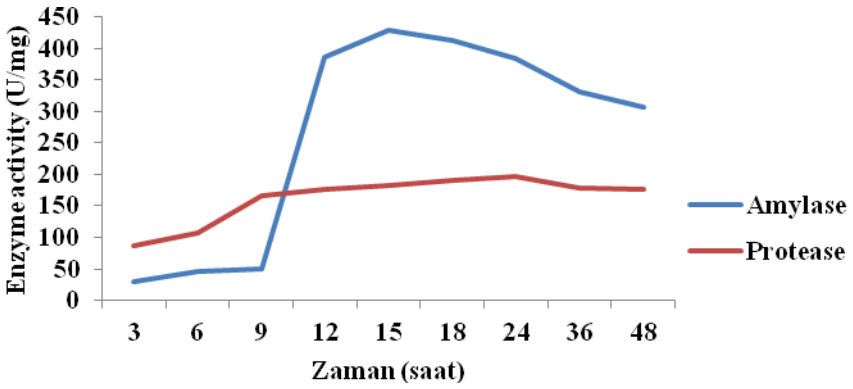
Şekil 4.22. 5NK'nın antibiyotik duyarlılık testi

Çizelge 4.2. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik adı	**4NK zon çapı ortalaması**	**5NK zon çapı ortalaması**
Lincomycin(My15)	19mm	10mm
Penicilin G(P2)	7,5mm	9mm
Bacitracin(B10)	11,5mm	9,5mm
Ampicillin(AMP10)	16mm	13mm
Tılmicosin(TIL15)	20,5mm	14,5mm
Chloramphenico(C30)	22,5mm	12,5mm
Kanamycin(K5)	13,5mm	28mm
Streptomycin(S10)	15,5mm	13,5mm
Novobiocin(NV5)	11,5mm	26mm
Gentamicin(CN10)	14mm	28mm
Fusidic Asid(Fd10)	17mm	31mm
Tetracycline(Te10)	16mm	14mm
Neomycin(N10)	11,5mm	20mm
Penicilin G(P10)	11,5mm	9mm
Nystatin(NS100)	-	11,5mm

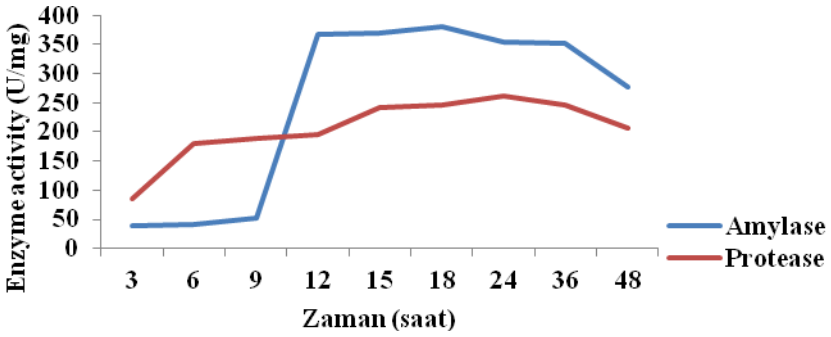
4.6.7. Farklı İnkübasyon Sürelerinde Proteaz ve Amilaz Enzimlerinin Aktivitesi

Hazırlanan sıvı besi yerinde (NB) 4NK bakterisinin ekimi yapılarak 40ºC'de inkübasyona bırakıldı. Her 3 saate bir 1 ml örnek alınarak 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Bu sürenin sonunda üst sıvıda değişik inkübasyon sürelerinde amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı. Şekil 4.23'te görüldüğü gibi 4NK bakterisinin amilaz aktivitesi 9.saatten itibaren hızla artmış 15. saatte optimum değere ulaşmış, daha sonra yavaş yavaş azalmıştır. Proteaz aktivitesi ise 3. saatten itibaren yavaş yavaş artmış 9. saatte kadar artışı devam etmiş 24. saatte maksimum değere ulaşmıştır. Bu saatten itibaren azalmaya başlamıştır. Bu sonuçlara göre optimum amilaz aktivitesi 15. saat, proteaz aktivitesi ise 24. saat olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.23. 4NK'nın Değişik inkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

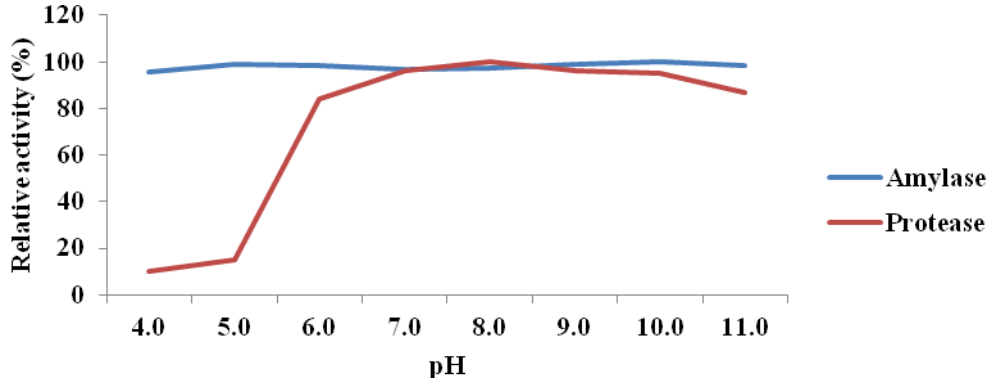
Hazırlanan sıvı besi yerinde (NB) 5NK bakterisinin ekimi yapılarak 45ºC'de inkübasyona bırakıldı. Her 3 saate bir 1 ml örnek alınarak 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Bu sürenin sonunda üst sıvıda değişik inkübasyon sürelerinde amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı. Şekil 4.24'te görüldüğü gibi 5NK bakterisinin amilaz aktivitesi 9. saatten hızla artmış 12. saatte optimum değere ulaşmış bu saatten sonra azalma eğilimine girmiş 36. saatten sonra hızla azalmıştır. Proteaz aktivitesi ise 3. saatten sonra artmaya başlamış 24. saatte optimum değere ulaşmış bu süreden sonra da azalmaya başlamıştır. Bu sonuçlara göre 5NK'nın optimum amilaz aktivitesi 12. saat, proteaz ise 24. saat olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.24. 5NK'nın Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

4.6.8. Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitelerine pH'nın Etkisi

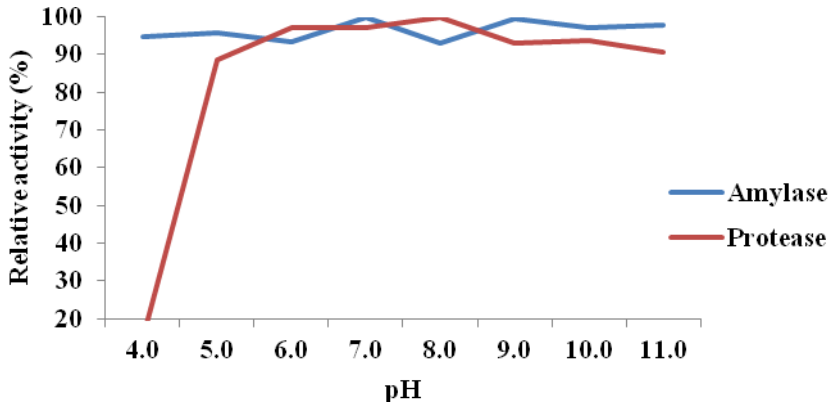
İzole edilen 4NK bakterisi sıvı besi yerinde(NB) 45°C'de 24 saat üretildi. Süre sonunda besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra üst sıvı alınarak pH 4-11 arasında amilaz ve proteaz aktivitesine bakıldı. Şekil 4.25'te görüldüğü gibi 4NK bakterisinin amilaz aktivitesi incelenen tüm pH'larda hemen hemen aynı maksimum değerde kalmıştır. Proteaz aktivitesi ise pH 4'ten itibaren artmaya başlamış pH 8'de optimum değere ulaşmış daha sonra yavaş yavaş azalmaya başlamıştır. Buna göre 4NK bakterisinin optimum amilaz pH aktivitesi 4-11, proteaz aktivitesi ise pH 8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. 4NK'nın pH'ya Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

İzole edilen 5NK bakterisi sıvı besi yerinde(NB) 45°C'de 24 saat üretildi. Süre sonunda besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra üst sıvı alınarak pH 4-11 arasında amilaz ve proteaz aktivitesine bakıldı. Şekil 4.26'da görüldüğü gibi amilaz incelenen tüm pH'larda hemen hemen aynı maksimum değerde kalmıştır.

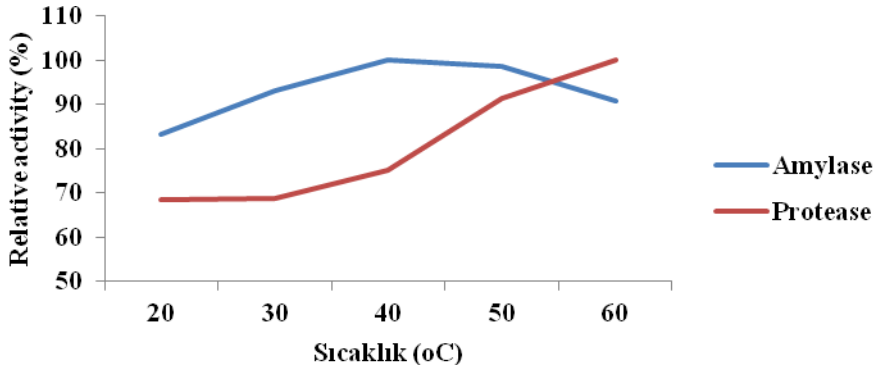
Proteazın pH'ya bağlı aktivitesi ise pH 4'ten itibaren artmaya başlamış pH 8'de optimum değere ulaşmış bundan sonra ise azalma eğilimine girmiştir. Buna göre amilazın pH'ya bağlı aktivitesi optimum değeri pH 4-11 iken, proteazın optimum değeri ise pH 8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. 5NK'nın pH'ya Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

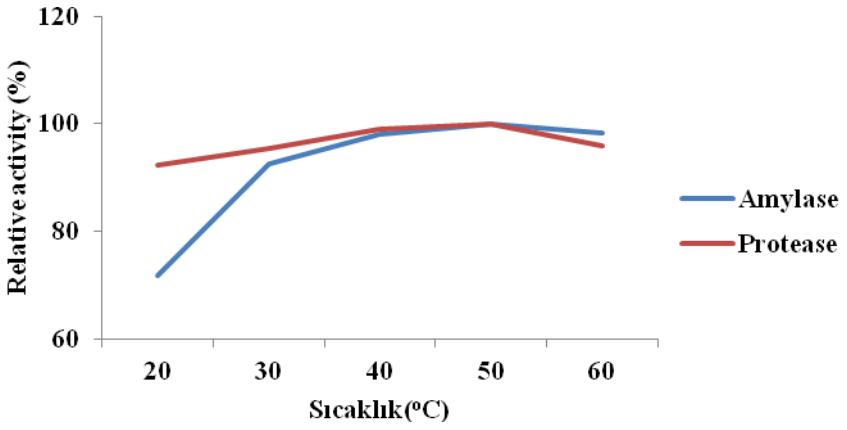
4.6.9. Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

İzole edilen 4NK bakterisi sıvı besi yerinde (NB) ekimi yapılarak optimum pH'da ve sürede inkübasyona bırakıldı. Daha sonra besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı alınarak 20^{o}C ve 60^{o}C arasında amilaz ve proteaz aktivitelerinin optimum sıcaklığına bakıldı. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi 4NK bakterisinin sıcaklığa bağlı amilaz aktivitesi 20^{o}C'de artmaya başlamış 40^{o}C'de optimum değere ulaşmış ve bundan sonra ise azalmaya başlamıştır. Proteaz aktivitesi ise 30^{o}C'den itibaren artmaya başlamış 60^{o}C'de optimum değere ulaşmış bundan sonrada artamaya devam etmiştir. Buna göre 4NK bakterisinin sıcaklığa bağlı amilaz ve proteaz aktiviteleri 40 ve 60 ^{o}C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. 4NK'nın Sıcaklığa Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

İzole edilen 5NK bakterisi sıvı besi yerinde (NB) ekimi yapılarak optimum pH'da ve sürede inkübasyona bırakıldı. Daha sonra besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı alınarak 20°C ve 60°C arasında amilaz ve proteaz aktivitelerinin optimum sıcaklığına bakıldı. Şekil 4.28'de görüldüğü gibi 5NK bakterisinin sıcaklığa bağlı amilaz aktivitesi 20°C'de artmaya başlamış 50°C'de optimum değere ulaşmış ve bundan sonra ise azalmaya başlamıştır. Proteaz aktivitesi ise 30°C'den itibaren artmaya başlamış 50°C'de optimum değere ulaşmış bundan sonrada artamaya devam etmiştir. Buna göre 4NK bakterisinin sıcaklığa bağlı amilaz ve proteaz aktiviteleri 50°C olarak tespit edilmiştir.

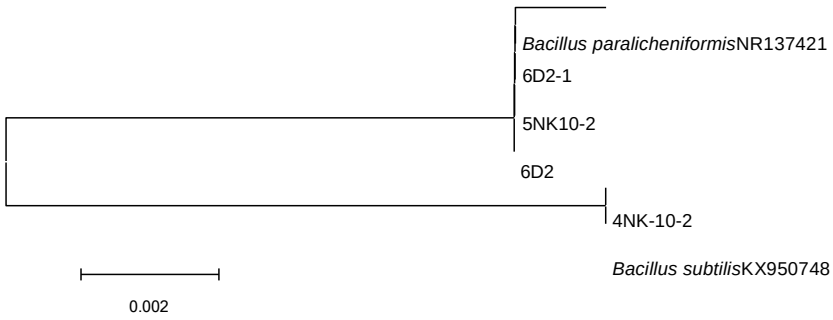


Şekil 4.28. 5NK'nın Sıcaklığa Bağlı Amilaz ve Proteaz Aktivitesi

4.6.10. 16S rRNA Gen Dizi Analizine Göre İzolatların Filogenetik Durumlarının Belirlenmesi:

16S rRNA dizi analizi yapılan 4NK ve 5NK bakterilerinin sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.3' de gösterilmiştir. Buna göre 4NK bakterisinin *Bacillus subtilis* türene yakın olduğu, 5NK bakterisinin ise *Bacillus paralicheniformis* türene yakın olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Çizelge 4.3. 16S rRNA dizi analizi



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin endüstri alanında oldukça önemli olmasından dolayı bu araştırmada Bingöl'ün binkap sıcak su kaynaklarından alınan su ve çamur örneklerinden bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizleri yapılmıştır. İzole edilen bu bakterilerin çeşitli analizleri yapıldıktan sonra amilaz ve proteaz enzimlerinin üretimi ve bu enzimlerin bazı özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmamızda izole edilen bakteriler uygun besi yerlerinde üremeleri sağlandı. Daha sonra elde edilen bakteri kolonilerinden 4NK bakterisinin optimum üreme sıcaklığının 40^{o}C olduğu, üreme süresinin 18.saat olduğu, optimum pH'nın ise 6.0 olduğu sonucuna varılmıştır. 5NK bakterisinin ise; optimum üreme sıcaklığı 45^{o}C, üreme süresinin 24.saat ve optimum pH'sının 6.0 olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalarımızda ile izole edilen 4NK bakterisinin çubuk şeklinde, gram pozitif, ılımlı termofil olduğu belirlendi. 5NK bakterisinin de çubuk şeklinde, gram pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu iki bakterinin pH ve sıcaklık değerlerinin birbirine yakın çıktığı gözlemlenmiştir. Yapılan biyokimyasal, morfolojik ve filogenetik analizler sonucunda 4NK bakterisinin *Bacillus subtilis'*a, 5NK bakterisinin ise, *Bacillus paralicheniformies* türünün özelliklerine benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Yapılan bu araştırmalarda sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin spor oluşturduğu, gram pozitif, termofil gbi pek çok yönden benzerlik gösterdikleri tespit edilmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen 4NK ve 5NK bakterilerin üremesi, üreme zamanı ve pH değerleri bakımından *Bacillus subtilis* ve *Bacillus paralicheniformis* türlerine benzediklerini destekler niteliktedir.

Dunlap ve ark. 2015, Lee ve jeong 2017, *Bacillus paralicheniformis* 14DA11, fermente soya fasulyesi hamurundan Gram (+), fakültatif anaerob, hareketli ve endospor oluşturan bir tür olarak izole edilmiştir. Bu bakterinin klindamisin direnci gösteriği, 15-60 ˚C ve pH 6-11 aralıklarında ürediği ve % 10 NaCl toleransına sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda genomik analizler sonucunda *Bacillus paralicheniformis*'in *B. licheniformis*'ten dört gen farkıyla ayrıldığını belirlemişlerdir. Filogenetik ve fenotipik analizler sonucunda *Bacillus paralicheniformis* sp.'nin yeni bir tür olduğunu tespit etmişlerdir.

Derekova ve ark.(2007), Rupi Basin(Bulgaristan)'deki sıcak su kaynaklarından izole edilen *Bacillus* üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda bu bakterinin gram pozitif, termofilik bakteri olduğunu tespit etmişlerdir. Kevbrin ve ark.(2005), jeotermal kaynaklardan termofil bakteri izole etmişleridir. İzole ettikleri bakterinin gram pozitif ve çubuk şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Logan ve ark. (2000), Rittmann dağı ve Melborne dağı topraklarından bakteri izole etmişlerdir. Bu izolasyon sonunda bakterilerin spor oluşturan termofilik bakteriler olduğu sonucuna varmışlardır. Saxena ve ark. (2007) maksimum amilaz aktivitesinin pH 10. 0 olduğunu çalışmaları ile tespit etmişlerdir. Poli ve ark.(2006), Rittmann dağından bakteri izolasyonu yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda bakterinin aerobik, termofilik *Anoxybacillus* cinsi bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen bakterilerin amilaz enzimi üretme yeteneği araştırıldı. Buna göre 4NK bakterisinin amilaz aktivitesinin optimum süresinin 15.saat, optimum sıcaklık aktivitesinin 40^{o}C, pH'sının ise 5.0 olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. 5NK bakterisinin ise amilaz aktivitesinin optimum süresi 12.saat, optimum amilaz aktivite sıcaklığının 50 ^{o}C ve pH 7.0 olduğu gözlenmiştir.

Burhan ve ark.(2003) α-amilazın alkalin pH değerinde (9.5-13.0) oldukça stabil olduğunu ve 100 ^{o}C'de aktivitesinin %85.5 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir.

Bozic ve ark.(2011) *Bacillus licheniformis* ATCC 9945"ten izole ettikleri α-amilaz enzimini saflaştırmışlar ve saf enzimin SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığını 31 kDa olarak belirlemişlerdir. Kıran ve ark. (2005), termofilik *Bacillus* sp. K-12'nin amilaz üretimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada izole edilen bakteri Kahramanmaraş'ta bulunan Zeytinli Ilıcası'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilmiş ve bu çalışmada enzimin optimum sıcaklığının 42 ^{o}C olarak bulunmuştur.

Raul 2014, amilaz nişastanın şekerlere parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Deterjanlar, tekstil, yağ hidrolizi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu çalışmada daha iyi ürün geri kazanımından dolayı amilaz üretimi için katı hal fermantasyonu(SSF) su altında fermantasyon da (SmF) kullanılmıştır. *Bacillus subtilis* alfa amilaz üreticisi olarak bilinir. Bu çalışmada substrat olarak buğday kepeği kullanılmış, 37 ^{o}C'de 48 saat süreyle katı fermantasyonu kullanılarak testler yapılmıştır. Farklı fermantasyon sürelerine bakılarak 48 saat sonra yüksek alfa amilaz üretimi

olduğu tespit edilmiştir. Bu alfa amilazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7.1 ve 40 ^{o}C olduğu bulunmuştur. Alfa amilazı saflaştırma amacı ile %30-70 $(NH_4)_2SO_4$ kullanılmış ve etkinliğinin üç kat arttığı tespit edilmiştir. Amilazın tam moleküler ağırlığı, diğer protein saflaştırma teknikleriyle belirlenmeye çalışılmıştır.

Mamo ve Gessesse (1999) saflaştırdıkları termostabil α-amilazların üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bunun sonucunda 80 ^{o}C' de 4 saat inkübasyon sonunda %50 aktivitelerini koruduğunu ve pH 5.5 ile 9.0'da stabil olduklarını göstermişlerdir. Cordeiro ve ark. (2002) α-amilazın aktivasyon süresi ve sıcaklığı hakkında çalışmalar yapmışlardır. Buna göre 50^{o}C'de 2 saat sonunda enzimin stabil kaldığını ve 60^{o}C, 70^{o}C ve 90^{o}C'de sırasıyla %4, %13, %38"ini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Burhan ve ark. (2003) α-amilazın pH değeri ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışma sonunda alkalin pH değerinde (9.5-13.0) oldukça stabil olduğunu ve 100 ^{o}C'de aktivitesinin %85.5 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir. Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04"ten elde ettikleri alkali α-amilaz enziminin sıcaklılk ve pH değerleri ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda 50 ^{o}C ile 80 ^{o}C, pH 7.0 ile 10.0 arasında stabil olduğu tespit etmişlerdir. Liu ve ark.(2008) *Bacillus sp*. YX-1'den saflaştırdıkları α-amilaz enzimin pH 4.5 ile 11.0 arasında stabil kaldığı bulmuşlardır. Conderion ve ark. (2002), termofilik *Bacillus* sp'den amilaz üretiminin 48.saatte sıcaklığın 70 ^{o}C ve pH 7. 5 olduğu tespitini yapmışlardır. İzole edilen bakteriler ile yapılan çalışmalarda termofilik bakterilerden izole edilen amilaz enziminin aktivite tayini ve optimum koşulları incelenmiştir.

Çalışmalarımızda amilaz enziminin optimum sıcaklığının 45-50 ^{o}C civarı olduğu tespiti yapılmıştır. İzolasyonunu yaptığımız bakterilerden 4NK bakterisinin amilaz enziminin optimum sıcaklığı 40 ^{o}C olması ve 5NK bakterisinin optimum sıcaklığının 50 ^{o}C olması amilaz enziminin termo stabil olduğunu desteklemektedir. Yukarıda yapılan çalışmalar bu sonucu desteklemektedir.

Proteaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda izole edilen bakterilerden 4NK bakterisi için yapılan çalışmalarda proteazın optimum aktivite tayini yapıldı. Buna göre 4NK bakterisinin proteaz enziminin optimum sıcaklığı 50 ^{o}C aktivite süresi 24.saat pH ise 8.0 olduğu sonucuna varılmıştır. İzole edilen 5NK bakterisinin ise proteaz enziminin optimum sıcaklığı 50 ^{o}C, aktivite süresi 24.saat, pH'sı ise 8.0 olduğu tespit edilmiştir.

Arulmani ve ark.(2007*), Bacillus laterosporus'*dan serin proteaz enziminin saflaştırma işlemi yapmışlardır. Proteaz enziminin optimum sıcaklığını 75 ^{o}C ve pH'sını 9 olarak tespit etmişlerdir. Ghorbel ve ark.(2002), *Bacillus* tarafından sebtezlenen proteaz enziminin stabilitesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Buna göre proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığını 60 ^{o}C, pH'sını ise 8 olarak tespit etmişlerdir. Gupta (2002), *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalen proteaz enziminin saflaştırma işlemini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaya göre proteazın aktivite sıcaklığını 60 ^{o}C, pH'sını ise 8 olarak belirlemişlerdir. Sookkheo ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus* tarafından proteaz enziminin aktivite sıcaklığı 70-85-90 ^{o}C olarak pH'sını ise 7 olarak yaptıkları çalışmalar ile gözlemlemişlerdir. Park (2004), *Bacillus* cinsi (*B.subtillis, B.aeromonas, B.hyrophila, B.amyloliquefaciens*) bakterilerini izole ederek proteaz aktivitesinin sıcaklık ve pH 'larını incelemişlerdir. Buna göre sıcaklık 40-70 ^{o}C, pH ise 8.0-8.5 civarı olduğu tespit edilmiştir.

Pant 2015, *Bacillus* türü bakterilerin karakterizasyonu yapılmış ve bu bakteri cinsinin salgıladığı proteaz enzimi ile çalışılmıştır. İzole edilen *Bacillus subtillis* bakterisi proteaz eldesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İzole edilen bakteriler agar ortamın da bir gece inkübasyonda bırakılmıştır. Bakterilerin eklenmesinden sonra maksimum aktivite bölgesi 22 mm olduğu tespit edilmiştir. Uygun koşullar altında 45 ^{o}C'de, pH 10'da 36 saat boyunca 180 rpm'de bırakılan bakterilerin proteaz üretimi incelenmiştir. Ortamda galaktoz ve pepton varlığı diğer karbon ve azot kaynakları ile karşılaştırıldığında enzim üretimi %0.5 oranında arttığı gözlenmiştir. Bu kaynakların eklenmesi proteaz üretimini ve çeşitli endüstri uygulamalarını artırabileceği belirlenmiştir.

Çalışmamızda proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği ve termostabil bir enzim olduğu belirlenmiştir. Proteaz enziminin optimum sıcaklık aktivitesinin 60 ^{o}C olduğu sonucuna varılabilir. Proteaz enziminin pH 'sı ise 9-10 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak biyoteknolojik açıdan önemli olan enzimler üzerine incelemeler yapılmış bunun sonucunda enzimlerin optimum koşulları belirlenmiştir. Endüstrinin birçok alanında kullanılan amilaz ve proteaz enzimleri üzerine yapılan bu araştırmanın biyoteknoloji alanında uygulanabilirliği ileri seviyede karakterize edilerek test edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

Matpan Bekler F., Acer Ö., Güven K. 2015. Co Productıon Of Thermostable Calcium Independent Amylase And Alkali Metallo Protease From Newly Isolated *Bacillus licheniformis* Dv3. Innovative Romanian Food Biotechnology , 16: 21–30.

Adiguzel, A., Baris, O., Inan, K., Güllüce, M., Şahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. ***Journal of Microbiological Methods***,79: 321–328.

Agüloğlu, S.1996.Değişik amino asit ve antibiyotiklerin *Bacillus subtilis* α-amilazın membrandaki sentezi ve salgılanması üzerine etkileri ve tripsinin α-amilaz üzerine olan proteolitik etkisinin incelenmesi.Doktora Tezi ,D.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Agüloğlu, S. 2008. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* α-amylase isolated from Çermik hot water springs. 11th&-33rd FEBS Congress IUBMB Conference p.275. 28June-3 July 2008, Athens, GREECE.

Aguilar, G., Guyot, J.M., Aguilar, B.T., Guyot, J.P., 2000. Purification and characterization of an extracellular α-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. Enzyme and Microbial Technology, 27: 406–413.

Ahmetoglu, N., Matpan Bekler F., Acer Ö., Gül Güven R.,Güven K. 2015. Production purification and characterisation of thermostable metallo protease from newly isolated *Bacillus* sp KG5. **EurAsian Journal of BioSciences**, 9:1–11.

Akkaya, S., Kivanç, M. 2009. Thermophilic bacteria; methods of isolation and identification of gram negative bacilli in hot springs. ***Electronic Microbiology Journal*** TR 07(1):01–23.

Aljohani, N.B. 2017. Optimization of alkaline α-amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. Afr J Tradit complement Altern Med. 2017. 14(1):288-301.

Arda, M.2000.Temel Mikrobiyoloji Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.

Arikan, B., Unaldi, N., Çoral, G., Çolak, Ö., Aygan, A., Gülnaz, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from analkaliphilic *Bacillus sp*. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38: 1397-1403.

Atlas, M.R. 1995.Microorganisms in our world.mosby-year book.Missouri.Chapter 1.p 20-23.

Aygan, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus sp*. izolasyonu, amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.7-8.

Bahçeci, H. 2004.Tuz Gölü bakteri izolatlarının yağ asidi metil ester analizi ve hücre dışı enzimlerinin karakterizasyonu. Master Tezi. ODTÜ Fen Bilimler Enstitüsü, Ankara.

Barnett, C.C., Mitshinson, C., Power, S.D., and Roquadt, C.A.,1998. Oxidatively stable alpha-amylase. Patent Aplication US. 5:824-832.

Becker, P; Abu-Reesh, I.M.; Markossian, S.; Antranikian, G.; Markl, H. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile Bacillus sp. IHI-91 on olive oil. Applied Microbiology and Biotechnology, 48:2(184 - 190).

Beldüz, A.O., Dulger, S., Demirbag, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis sp*.nov., Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium. ***International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*** vol 53, p. 1315-1320.

Bernfeld, P. 1955. Enzymes carbohydrate metabolism, ln Methods ln Enzymology, Academic Press, 17: 149-158.

Bilgehan, H. 2002. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Meta Basım. Fakülteler Kitabevi, Barış yayınları. P. 4-10.

Black, J.G. 1996. Microbiology Principles and Applications. Prentice- Hall.New Jersey, USA.Chapter 10,p. 247-264.

Bozic, N., Ruiz, J., Santín, J.L., Vujcic, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. ***Biochemical Engineering Journal,*** 53: 203–209.

Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L. 1972. Sulfolobus: a new genus ofsulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Archives of Microbiology, 84:54-68.

Brooks, G.F., Butel, J.S, Ornston, L.N. 1991. Medcal Microbiology. Middle East Edition Appleton and Longa.USA.Chapter 12.p.180-189.

Bruins, M.E., Janssen, A.E.M., Boom, R.M. 2001. Thermozymes and their applications. Biochem. Biotechnol. 90:155-186.

Busse, H.J., Denner, B.M.E., Lubitz, W. 1996. Classification and İdentification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. ***Journal of Biotechnology***, 47:3-38.

Carpenter, P. 1972. Microbiology. W.B. Saunders Company. Canada, Chapter 4, p. 64-77.

Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. 2008.propertıes of an amylase from thermophilic *Bacillus sp*. ***Brazilian Journal of Microbiology*** 39:102-107.

Castro, G.R. 1999. Enzymatic activities of Proteases Dissolved in Organic Solvent. Enzyme and Microbial Technology. vol. 25, p. 689-694

Christopher, A. Dunlap, Soon-Wo Kwon, Alejandro P. Rooney and Soo-Jin Kim.2015. *Bacillus paralicheniformis sp*. nov., isolated from fermented soybean paste. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***,2015. 65, 3487–3492.

Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews**.** 17:840-862.

Contesini, F.J. 2017. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application.

Derekova, A., Sjoholm, C., Mandeva, R., Kambourova. 2007. *Anoxybacillus rupiensis sp.*Nov.,a Novel Thermophilic Bacterium Isolated from Rupi Basin (Bulgaria). Extremophiles.vol.10,p.1-4.

Demirjian, D.C., Moris, F.V., Cassidy, C.S. 2001. Enzymes from extremophiles.Current Opinion in Chemical Biology. 5: 144-151.

Dilara A. Bukari and A.Rehman.2015. Purification and Characterization of α-Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Local Environment. *Pakistan J. Zool., vol. 47(4), pp. 905-911.*

Dönmez, S. 1987. Ekstrem termofil mikroorganizmalar ve biyoteknoloji de uygulama olanakları. ***Gıda Dergisi***, 6: 401-405.

Femi-Ola, T.O., Azeez, I.I. "Purification and Characterization of Beta-Amylase of *Bacillus subtilis* Isolated from Kolanut Weevil", ***Journal of Biology and Life Science***, sayı 4, pp. 68-78,2013.rocess Biochemistry., vol 41, p. 659-665.

Firitze, D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. The American Phytopathological Society Publication vol. 94, p.11.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 1-18.

Güven, R.G. 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. ***Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*** TR. Cilt: 09 Sayı: 1 Sayfa: 1-10.

Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostableenzymes: a review Bioresource Technology, 89:17–34.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999. Production and properties of the rawstarch-digesting a-amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochemistry, 35: 27–31. John, F.K. 1987. Enzyme Technology, H.J.Rehm ve G.Reed editor. Biotechnology.New York. 7: 37-62.

Hassan, H., Abd.Karim, K. 2012. Utilization of agricultural by-products for alpha-amylase production under solid state fermentation by *Bacillus subtilis*. ***Engineering Journal***.16 (5) :177-186.

Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. 2008.Purification and biochemical characterization of a novel α-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. Process Biochemistry, 43: 499–510.

http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010701.pdf

Imhoff, J.F. 2003. Phylogenetic Taxonumy of The Family Chlorobiaceae on The Basis of 16S rRNA and Fmo(Fenna- Matthews-Olson Protein) Gene Sequences. Int J Syst Evol Microbiol. Vol.53,p.941-51.

Katı, H., Karaca, B., Gülşen, Ş.H. 2016. Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. ***SAÜ Fen Bil Der.*** 20. Cilt, 2. sayı, s. 281-290.

Kandra, L. 2003. α-Amylases of Medical and Industrial Importance; ***Journal of Moleculer Structure(Teochem)***.vol.666,p.487-498

Kevbrın, V.V., Lysenko, K.Z.A.M., Wıegel, J. 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* .nov.,a Noval Thermopilic Facultative Aerobic Bacterium with a Broad pH Optimum from The Geyser Valley, Kamchatka. Extremophiles.vol.9, p.391-398.

Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U. 2003.Zeytin Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp*. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. ***KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi***, 6(2): 41-48

Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. ***KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi***, 9(1).

Kingsbury, D.T., Wagner, G.I. 2000. Microbiology. Middle East Edition Harwall Publishing Company, Pennsylavia,USA., Chapter 10,p. 109-117.

Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2004. Thermostable α-amylase productionby *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology, 39: 690–696.

Lee, S., Morikava, M., Takagı, M., Imanaka, T. 1994. Cloning Gene and Characterization its Product, α-amylase, Pullulunase(appt), From Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp*. Strain XAL601. Application Environment Microbiology. vol. 60.p, 3761-3773.

Lee, J.H, Jeong, D.W. 2017. Complete genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* 14DA11, exhibiting resistance to clindamycin and erythromycin. Genome Announc 5: e01216-17.

Leighton, T.J., Doi, R.H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. ***Journal of Molecular Biology*** 76(1): 103-122.

Lin, S. 1997. Identification of Contamination Sources of *Bacillus cereus* 'in Pasteurized Milk. A Thesis Presented to Faculty of Graduate Studies of University of Guelph. 109 p. Canada.

Lowry, O.H., Rosebrough. N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent***, Journal of Biological Chemistry***, 193: 265- 275.

Ludwig, W.2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. ***International Journal of Food Microbiology***, 120: 225-236.

Ludwig, W., Strunkb, O., Klugbauer, S., Klugbaueri, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Eiectrophoresis, 19:554-568.

Madigan, M.T., Martinco, J.M., Parker, J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall.USA.P.404-406.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Sayfa: 992, Ankara.

Madika, A., Ameh, J.B. and Machido, D.A. 2017. Production of Alpha Amylase by *Bacillus subtilis* Using Maize Husk as Substrate.

Matpan, F. 2007. Diyadin (Ağrı) sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu ve bazı enzimleri üzerinde çalışmalar. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. 2001.Polyphasic Taxonomic Study of Thermophilic *Bacilli* from Shallow, Marine Vents System. Appl. Microbiol.vol.24,p.572-587.

Mckane, L., Kandel, J. 1996. Microbiology Essentials and Applications, Mc Graw-Hill.USA, Chapter 10, p.238-250.

Najafi, M.F., Sariri, R.2006. Extraction and Identification of Alkaline Protease Producing Thermophilic Bacteria from Soil. Master Thesis. Ministry of Science and Technology, Faculty of Science,Iran.

Nanganuru , H.Y., Korrapatı, N., Mutyala, S. 2012. Studies On The Productıon Of α- Amylase by *Bacillus subtilis.* Vol. 2(5) pp: 1053-1055.

Obeidat, M. 2017. Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus species* from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities. Vol. 11(32), pp. 1303-1314.

Özata, A., Türe, C. 2001. Enzimler ve Enzim Aktivitelerinin Gösterilmesi. AÖF Yayınları, Eskişehir.

Özdemir, S. 2004. Musa textilis Kabuğu Kullanılarak Katı- Fazı Fermantasyon Tekniği ile (SSF) *Bacillus sp*'de α-Amilaz Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi. D.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Özşahin, A.D. 2006. Kahramanmaraş ili Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus sp*. Suşlarından Elde Edilen Selülaz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

Pant , G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Devirama, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. 50-55.

Poli,A.,Esposito,E.,Lama,L.,Orlando,P.,Nıccolaus.,Appolonıa,F.,Gambacorta,A.,Nıcolau sa.B.,2006. *Anoxybacillus amylolyticus sp*. nov.,a Thermophilic Amylase Producing Bacterium Isolated from Mount Rittmann (Antarctica) Systematic and Applied Microbiology.vol.29,p.300-307.

Rahman, T.J., Marchant, R., Banat, I.M. 2004. Distribution and molecular investigationof highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. Biochemical Society Transactions, 32: 209–213.

Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Das, S.K. and Gupta, S. 2014. Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation.Biochemistry Research International Volume 2014 , Article ID 568141.

Redy, N.S., Nimmagadda, A., Rao, K.R.S.S. 2003. Anoverview of the microbial α-amylase family. ***African Journal of Biotechnology***. 2 (12):645-648.

Sarıkaya, E., Gürgün, V. 2000. Increase of the α-amylase yield by some *Bacillus* strains.***Turkish Journal of Biology***, 24: 299–308.

Sathiya, G.2013. Production Of Protease From *Bacillus subtilis* and Its Application In Leather Making Process. Issn: 2277-3827.

Schleifer, K.H. 2009. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. Systematic and Applied Microbiology, 32: 533-542.

Selen, V. 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* ile α-amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Elazığ.16.

Srivastava, R.A.K. 1987. Prufication and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilu*. Enzyme and Microbial Technology, 9: 749-755.

Tari, C., Genckal, H.,Tokatlı, F. 2006. Optimization of a Growth Medium Using a Statistical Approach fort he Production of an Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus sp*.L21 Process Biochemistry., vol 41, p. 659-665.

Temizkan, G., Arda, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Truper, H.G. 2005. International Perspectives on Taxonomy from the Past to the Future, vol.71, p.273.

Uhlig, H. 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wıley&Sons, INC. New York.
Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J.1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews, 60 (2): 407-438.

Venugopal, M., Saramma, A. V. 2006. Characterization of Alkaline Protease from Vibrio Fluvialis Strain VM10 Isolated from a Mangrove Sediment Sample and Its Application as a Laundry Detergent Additive. Process Biochemistry. Vol.41, p. 1239-1243.

Wiseman, A. 1987. The Aplication of Enzyme in Industry. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3: 275-373.

Woodley, J. M. 2000. Advances in Enzyme Technology-UK Contributions Th.scheperi editor.Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 94.

Yılmaz, F. 2002.*Bacillus* Türleri. Bitirme Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Rize.

Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus sp*.strains isolated from the soil. Microbiological Research. Vol.161, p. 127-131.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	**:** Zindar ASLAN
Doğum Yeri	**:** Mardin/Nusaybin
Doğum Tarihi	**:** 09.09.1992
Yabancı Dili	**:** İngilizce
Lise	**:** Nusaybin Emire Gözü Lisesi
Lisans	**:**Süleyman Demirel Üniversitesi (Isparta)
Yüksek Lisans	**:** Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı 2015-2018

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Zindar ASLAN
ÖĞRENCİ NO	15801008
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017-2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Termal Kaynaklardan İzole Edilen Bakterilerin Enzimleri Üzerine Çalışmalar
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	73
BENZERLİK ORANI	% 24
RAPORLAMA TARİHİ	01/03/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 73 sayfalık kısmına ilişkin, 01/03/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 24'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☐ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Zindar ASLAN

(İmza) 01/03/2018 Prof.Dr. Kemal GÜVEN **Tez Danışmanı**	(İmza) 01/03/2018 Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN **Anabilim Dalı Başkanı**