

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**TABAKLAMA ÖNCESİ İŞLEM**  
**BASAMAKLARINDAN BAZI ALKALİFİLİK**  
**MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE**  
**MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İDENTİFİKASYONU**

**Derya DOĞANAY**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**  
Tezin Sunulduğu Tarih: **15.01.2014**

**Tez Danışmanı:**  
**Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI**

**ÇANAKKALE**

## DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**DERYA DOĞANAY** tarafından **DOÇ. DR. BİNNUR MERİÇLİ YAPICI** yönetiminde hazırlanan “**TABAKLAMA ÖNCESİ İŞLEM BASAMAKLARINDAN BAZI ALKALİFİLİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İDENTİFİKASYONU**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI  
Danışman

Prof. Dr. Cüneyt AKI  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. İhsan YAŞA  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT  
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR  
Jüri Üyesi

Sıra No:  
Tez Savunma Tarihi: 15/ 01 / 2014

Hazırlanan bu doktora tezi **BAP** tarafından **2011/115** nolu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Derya DOĞANAY

## TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar, bilgi ve tecrübesiyle her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI'ya,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak, yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. A. Nail YAPICI'ya, Ege Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya, İstanbul Teknik Üniversitesi Arş. Görevlisi Dr. Mustafa KOLUKIRIK'a,

Tezimin hazırlanması aşamasında yardım ve dayanışmalarından dolayı çalışma arkadaşım Dr. Sadi Turgut BİLGİ'ye, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Fevziye Işıl MEYDANI ve Gülçin ÖZCAN'a, çalışmam boyunca manevi desteğini esirgemeyen Arş. Görevlisi Dr. Nurcihan HACIOĞLU'na,

Doktora eğitimimi yaptığım Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne ve tez çalışmasını destekleyen (2011/115 nolu proje) Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama,

Hayatıma girdikleri andan itibaren sevgilerini, doktora çalışmam boyunca sabırlarını ve desteklerini benden esirgemeyen eşim Ahmet DOĞANAY'a ve biricik kızım Dila DOĞANAY'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Derya DOĞANAY

## SİMGELER VE KISALTMALAR

N	:	Normalite
V	:	Volt
mA	:	Miliamper
dH <sub>2</sub> O	:	Distile su
µg	:	Mikrogram
mg	:	Miligram
g	:	Gram
µl	:	Mikrolitre
L	:	Litre
nm	:	Nanometre
mL	:	Mililitre
µM	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
M	:	Molar (Molarite)
%	:	Yüzde oranı
xg	:	Yerçekimi kuvvetinin katı
rpm	:	Dakikadaki dönüş sayısı
U.V	:	Ultra Viyole
kob	:	Koloni oluşturan birim
U	:	Unit (Birim)
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik asit
dNTP	:	Deoksi Nükleotit Trifosfat
bp	:	Baz çifti
w/v	:	Ağırlıkça Yüzde
g	:	Gram
°C	:	Santigrat Derece
dk	:	Dakika
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum Dihidrojen Fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	Di Potasyum Hidrojen Fosfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	:	Sodyum Karbonat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Magnezyum Sülfat 7 sulu
H <sub>2</sub> S	:	Hidrojen Sülfür
NaCl	:	Sodyum Klorür
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	:	Kalsiyum Klorür Dihidrat
KI	:	Potasyum İyodür
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen Peroksit
TCA	:	Trikloro Asetik Asit
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TAE	:	Tris Asetik Asit Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DNS	:	Dinitro Salisilik Asit
∞	:	Sonsuz
spor/ mL	:	Mililitre başına spor miktarı
α	:	Alfa
DMSO	:	Dimetil sülfoksit

## ÖZET

# TABAKLAMA ÖNCESİ İŞLEM BASAMAKLARINDAN BAZI ALKALİFİLİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İDENTİFİKASYONU

Derya DOĞANAY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI

15 / 01 / 2014, 116

Çalışmada tabaklama öncesi işlem basamaklarından ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-samadan proteaz,  $\alpha$ -amilaz ve lipaz enzim aktivitesi gösteren alkalifilik bakterilerin izolasyonu, elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi, fenotipik özelliklerine göre seçilen birbirinden farklı izolatların nicel enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve moleküler tanımlamalarının yapılması amaçlanmıştır.

Araştırma bulgularına göre söz konusu işlem basamaklarından 50 adet proteaz, 52 adet  $\alpha$ -amilaz ve 15 adet lipaz aktivitesine sahip toplam 117 adet bakteri izole edilmiştir. Ancak lipaz aktivitesine sahip izolatların lipaz aktivitesi yerine esteraz aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir.

İzolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için Gram boyama, bazı biyokimyasal testler, pH, NaCl ve sıcaklık tolerans testleri uygulanmıştır.

Çalışmada fenotipik özellikleri belirlenmiş 117 izolatdan moleküler tanılama için birbirinden farklı 29 izolat seçilmiştir. Ayrıca bu izolatlardan nitel enzim aktivitesine göre yüksek aktiviteye sahip 12 adet proteolitik, 10 adet amilolitik toplam 22 adet izolat seçilerek nicel enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Nicel enzim aktivitesi belirlenen proteolitik özellikteki 12 izolattan PS6 izolatının  $4,40 \pm 0,10$  U/mL ve amilolitik özellikteki 10 izolattan AS6 izolatının  $0,76 \pm 0,01$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile diğer izolatlardan daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Araştırmamızda 29 izolatın moleküler tanımlaması 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. Bu sonuçlara göre filogenetik olarak izolatların *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

*pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus majovensis*, *Bacillus sp. LCP66*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus polygona*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus sp. 2b-2*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Uncultured organism clone ELU 0110*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sp. LCP65* türlerine ait strainlere benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak araştırmamızda moleküler olarak tanımlanan 17 farklı *Bacillus* türünün 8'inin alkalifilik ve 9'unun ise alkalitolerant olduğu belirlenmiştir. Böylece deri proseslerinden daha önceden klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan ve bilinen türler haricinde 11 yeni *Bacillus* türü bu çalışmada ilk kez tanımlanmıştır. Araştırma sonuçlarının bu konu kapsamında yürütülecek olan diğer araştırmalara ve hem ülkemiz hem de yurtdışındaki deri sektörüne oldukça önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Alkalifilik bakteri, Proteaz, Lipaz, Amilaz, Tabaklama Öncesi İşlemler, 16S rRNA dizi analizi.



## ABSTRACT

### ISOLATION OF SOME ALKALIPHILIC MICROORGANISMS FROM PRE-TANNING PROCESSES AND THEIR IDENTIFICATION VIA MOLECULAR TECHNIQUES

Derya DOĞANAY

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair for Biology Thesis of Doctor of Philosophy

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI

15 / 01 / 2014, 116

The current study aims to isolate alkaliphilic bacteria with protease,  $\alpha$ -amylase and lipase (enzyme) activities from such pre-tanning processes as first and main soaking, liming, deliming-bating steps, to phenotypically characterize the isolates, to determine the quantitative enzyme activities of various isolated selected by their phenotypic properties, and to carry out their molecular identification.

According to the findings, total 117 bacteria with 50 protease, 52  $\alpha$ -amylase and 15 lipase activities were isolated from mentioned process step. However, isolates with lipase activity displayed esterase activity instead of lipase activity.

Gram's staining, some biochemical tests, pH, NaCl and temperature tolerance tests were carried out for the phenotypic characterization of the isolates.

117 isolates phenotypic properties of which were characterized, 29 different isolates were chosen for the molecular identification. Moreover, 22 isolates - 12 proteolytic and 10 amilolitic - with high qualitative enzyme activity were chosen to determine their quantitative enzyme activities.

It was revealed that out of 12 proteolytic isolates, the isolate PS6 was determined to have an enzyme activity of  $4,40 \pm 0,10$  U/mL, while the isolate AS6 of 10 amilolitic isolates had an enzyme activity of  $0,76 \pm 0,01$  U/mL, which were higher than those of the other isolates.

Molecular identifications of 29 isolates were performed via 16S rRNA sequence analysis. The analyses showed that the isolates phylogenetically shared similarities with strains *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus majovensis*, *Bacillus sp. LCP66*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus polygoni*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus sp. 2b-2*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Uncultured organism clone ELU 0110*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sp. LCP65*.

It was concluded from the results that 8 of 17 molecularly-identified *Bacillus* species were alkaliphilic and 9 were alkalitolerant. Thus, 11 new *Bacillus* species were identified for the first time apart from the ones which were already known or identified in tanning processes via regular or molecular methods. It is considered that the results obtained in the present study will greatly contribute to other relevant studies and to the national and international leather production industry.

**Keywords:** Alkaliphilic bacteria, Protease, Lipase, Amylase, Pre-tanning processes, 16S rRNA sequence analysis

<b>İÇERİK</b>	<b>Sayfa</b>
DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Deri Yaş İşlem Basamakları .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Ham Deri ve Konservasyon Mikrobiyolojisi.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Islatma Yumuşatma Mikrobiyolojisi.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Kireçlik Mikrobiyolojisi.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. Kireç Giderme-Sama Mikrobiyolojisi .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6. Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları .....</b>	<b>19</b>
<b>2.7. Alkalifilik Mikroorganizmalar ve Fizyolojik Özellikleri .....</b>	<b>20</b>
<b>2.8. Alkalifilik Enzimler ve Kullanım Alanları .....</b>	<b>21</b>
<b>2.8.1. Proteazlar .....</b>	<b>22</b>
<b>2.8.2. Amilazlar .....</b>	<b>24</b>
<b>2.8.3. Lipazlar .....</b>	<b>26</b>
<b>2.9. Deri Endüstrisinde Kullanılan Enzimler .....</b>	<b>27</b>
<b>2.10. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Özellikleri ve Enzimleri.....</b>	<b>29</b>
<b>BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Materyal.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1. Deri örneği .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2.1. Horikoshi-I agar .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2.2. Horikoshi-II agar.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.2.3. Rodamin-B agar.....</b>	<b>34</b>

3.1.2.4. Tributyrin agar .....	35
3.1.2.5. Tween 80 agar .....	35
3.1.2.6. SIM besiyeri .....	35
3.1.2.7. Karbonhidrat fermentasyon besiyerleri .....	36
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler .....	36
3.1.3.1. Besiyeri ve izolasyonda kullanılan çözeltiler .....	36
3.1.3.1.1. % 20' lik Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> çözeltisi .....	36
3.1.3.1.2. % 0.04'lük (w/v) brom timol blue çözeltisi .....	36
3.1.3.1.3. Peptonlu su çözeltisi .....	37
3.1.3.1.4. % 20'lik gliserol çözeltisi .....	37
3.1.3.2. Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler .....	37
3.1.3.2.1. Kristal viole boyası .....	37
3.1.3.2.2. Gram iyodür (Lugol) .....	37
3.1.3.2.3. Safranin boyası .....	38
3.1.3.2.4. Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi .....	38
3.1.3.2.5. % 3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi .....	38
3.1.3.2.6. Kovaks ayırıcı .....	38
3.1.3.3. Nicel enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler .....	39
3.1.3.3.1. Potasyum-fosfat tamponu .....	39
3.1.3.3.2. Glisin-NaOH tamponu .....	39
3.1.3.3.3. Dinitro salisilik asit (DNS) çözeltisi .....	39
3.1.3.3.4. Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi .....	39
3.1.3.3.5. 0.5 M Sodyum karbonat çözeltisi .....	40
3.1.3.3.6. 1N folin çözeltisi .....	40
3.1.3.4. Moleküler tanılamada kullanılan çözeltiler .....	40
3.1.3.4.1. 10X TAE tamponu .....	40
3.1.3.4.2. 1X TAE tamponu .....	40
3.1.3.4.3. 0.5 M EDTA pH 8 .....	40
3.1.3.4.4. Agaroz jel .....	40

3.1.3.4.5. 6x jel yükleme boyası .....	41
3.1.3.4.6. Syber green jel boya çözeltisi .....	41
3.1.3.5. Kullanılan başlıca cihaz ve ekipmanlar .....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Deri işleme yöntemi.....	42
3.2.2. Bakterilerin izolasyonu .....	43
3.2.2.1. Proteaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi.....	43
3.2.2.2. $\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi.....	43
3.2.2.3. Lipaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi.....	44
3.2.3. İzolatların stoklanması .....	44
3.2.4. Gram boyama.....	44
3.2.5. Endospor varlığı.....	45
3.2.6. Oksidaz testi .....	45
3.2.7. Katalaz testi.....	45
3.2.8. Hareketlilik testi.....	45
3.2.9. İndol oluşum testi.....	46
3.2.10. Hidrojensülfür (H <sub>2</sub> S) oluşum testi.....	46
3.2.11. Karbonhidrat kullanım testleri .....	46
3.2.12. İzolatların tuz toleransı.....	46
3.2.13. İzolatların pH toleransı.....	46
3.2.14. İzolatların sıcaklık toleransı .....	47
3.2.15. Nicel enzim kapasitelerinin belirlenmesi.....	47
3.2.15.1. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi .....	47
3.2.15.1.1. Proteaz enzim üretimi .....	47
3.2.15.1.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü.....	47
3.2.15.1.3. Proteaz enzim ünitesinin tanımı .....	48
3.2.15.1.4. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması .....	48
3.2.15.2. $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	48
3.2.15.2.1. $\alpha$ -Amilaz enzim üretimi.....	49
3.2.15.2.2. $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin ölçümü .....	49
3.2.15.2.3. $\alpha$ -Amilaz enzim ünitesinin tanımı.....	49

3.2.15.2.4. Maltoz standart grafiğinin hazırlanması.....	49
3.2.15.3. Büyüme eğrisinin belirlenmesi .....	50
3.2.15.4. İstatistiksel analizler .....	50
3.2.16. Moleküler tanımlama.....	50
3.2.16.1. DNA izolasyonu .....	50
3.2.16.2. Primerlerin saptanması .....	51
3.2.16.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	51
3.2.16.4. PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü ve dizi analizi.....	52
<b>BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
4.1. Araştırma Bulguları .....	53
4.1.1. Proteaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları .....	53
4.1.1.1. İzolatların elde edilmesi.....	53
4.1.1.2. İzolatların mikroskopik özellikleri.....	54
4.1.1.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri.....	56
4.1.1.4. İzolatların fizyolojik büyüme gereksinimi.....	61
4.1.1.4.1. İzolatların tuz toleransları .....	61
4.1.1.4.2. İzolatların pH toleransları .....	61
4.1.1.4.3. İzolatların sıcaklık toleransları.....	61
4.1.1.5. Nicel proteaz enzim aktivitesi sonuçları.....	65
4.1.2. Amilaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları .....	67
4.1.2.1. İzolatların elde edilmesi.....	67
4.1.2.2. İzolatların mikroskopik özellikleri.....	68
4.1.2.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri.....	70
4.1.2.4. İzolatların fizyolojik büyüme gereksinimi.....	73
4.1.2.4.1. İzolatların tuz toleransları .....	73
4.1.2.4.2. İzolatların pH toleransları .....	73
4.1.2.4.3. İzolatların sıcaklık toleransları.....	73
4.1.2.5. Nicel amilaz enzim aktivitesi sonuçları .....	77
4.1.3. Lipaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları.....	79
4.1.4. Moleküler tanımlama sonuçları .....	79
4.2. Tartışma .....	87

<b>4.2.1. Proteolitik ve amilolitik izolatların fenotipik bulguları üzerine tartışma.....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.2. İzolatların nicel enzim aktivite bulgularının tartışılması .....</b>	<b>90</b>
<b>4.2.3. İzolatların moleküler tanımlama bulgularının tartışılması.....</b>	<b>94</b>
<b>BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>100</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>103</b>
<b>Ekler.....</b>	<b>I</b>
<b>Çizelgeler.....</b>	<b>XXXII</b>
<b>Şekiller.....</b>	<b>XXXIV</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>XXXV</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Deri endüstrisi üretim bakımından dünyanın en geniş endüstrileri arasındadır. Deri mikroorganizmalar tarafından kolayca bozulabilen materyallerden biridir ve birçok endüstriyel üretimde olduğu gibi deri üretiminde de hidrolitik enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar deride ve işlem sıvılarında gelişim göstererek ürünün zarar görmesine, bozulmasına, kalite düşüklüğüne ve dolayısıyla ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Linder ve Neuber, 1990; Karaboz ve ark., 2003).

Mikrobiyal gelişimi etkileyen önemli faktörlerden birisi pH'dır. Nötral pH değerlerinde ve hafif alkali ortamlarda (pH 7-8) maksimum gelişim hızına sahip pek çok mikroorganizma vardır. Bu mikroorganizmalar geliştikleri pH aralığına göre dört grup içinde toplanırlar. Optimum gelişimleri pH 1-5,5 arasında olanlar asidofiller, pH 5,5-8 arasında olanlar nötrofiller olarak adlandırılırken, gelişimleri için yüksek pH derecelerini (pH 8,5-10) tercih edenler alkalifiller, daha yüksek pH derecelerini (pH 10-11,5) tercih edenler ise ekstrem alkalifiller olarak tanımlanır (Madigan ve Martinko, 2009).

Alkalifilik mikroorganizmalar yüksek alkali çevrelerde yaşayan farklı bir gruptur. Kendi aralarında alkalifilik ve alkalitolerant olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar. Alkalifil mikroorganizmalar pH 10 üzerinde büyüeyebilen optimal büyüme pH'sı 9 olan pH 7 ve daha düşük pH değerlerinde büyümeleri imkansız olan mikroorganizmalardır. Diğer yandan pH 10 civarında büyüme yeteneğine sahip buna karşılık optimal büyüme pH'sı nötral pH civarında olan mikroorganizmalarda alkalitolerant mikroorganizmalar olarak adlandırılmıştır. Ekstrem alkalifiller ise kendi aralarında fakültatif ve zorunlu alkalifiller olmak üzere iki alt gruba ayrılmışlardır. Fakültatif alkalifiller pH 10 ve üzeri pH değerlerinde optimal büyüme gösterirken nötral pH'da da iyi bir şekilde gelişebilmektedirler, zorunlu alkalifiller ise nötral pH değerlerinde büyüme yeteneğine sahip değildirler (Kumar ve Takagi, 1999). Deri üretimi pH koşulları birbirinden farklılık gösteren ve ardı ardına uygulanan proseslerde gerçekleştirilmektedir. Nitekim pH koşulları birbirlerinden oldukça farklı olmasına karşın söz konusu prosesler de farklı pH koşullarında gelişim gösterebilen ve çeşitli hidrolitik enzim aktivitesine sahip daha önce tanımlanmamış mikroorganizmalar bulunabilir.

Deri işletmesine ham deri girişinden mamul ürün çıkışına kadar geçen süreçte; deriye uygulanan işlemler birbirini büyük ölçüde etkilemektedir (Ulusoy ve ark., 2004). Böylece



ardı ardına devam eden proseslerde aynı türün farklı bireylerine (strain) rastlamak mümkün olmaktadır. Bu nedenle birbirlerinden farklı pH değerlerine sahip bu işlem sıvılarına adapte olmuş, daha önce tanımlanmamış hidrolitik enzim aktivitesine sahip alkalifilik ve alkalitolerant bakterilerin tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bunun için deri işlem basamaklarında probleme neden olan bu bakteriler moleküler yöntemlerle doğru bir şekilde tanımlanmalı ve direk hedefe yönelik önlemler alınmalıdır.

Diğer yandan deri ve işlem sıvıları muhteşem bir mikrobiyal çeşitliliğe ev sahipliği yapmaktadır. Bu mikroorganizmaların potansiyel enzim aktivitelerinin belirlenip endüstriyel mikroorganizma olarak değerlendirilmesi önemli sonuçlar doğurabilir. Nitekim deri teknolojisinde mikroorganizmaların olumsuz etkilerinin yanı sıra, mikroorganizma ve enzimlerinden (proteaz, kollegenaz, keratinazlar, amilazlar ve lipazlar) yumuşatma, kıl giderme ve sama gibi deri işlem basamaklarında olumlu yönde de yararlanılmaktadır.

Bazı alkalifiller selülaz, amilaz, proteaz ve lipaz gibi hidrolitik enzimler üretmektedir. Nitekim alkali çevreler, sodalı göller ve çöller gibi alkalifilik ortamlardan izole edilip tanımlanan alkalifilik ve alkalitolerant bakterilerin enzimleri endüstrinin çeşitli alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle deterjan sanayisinde kullanılan amilaz ve proteaz enzimleri yüksek pH aralığında aktivite göstermekte olup, çoğunluğu alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedir. Bu enzimler atıkların giderilmesi, tekstil, deri, gıda ve deterjan endüstrisi gibi değişik endüstri kollarında kullanılmaktadır. Bu nedenle alkalifilik mikroorganizmalar tarafından üretilen alkali amilaz ve alkali proteaz üreticisi olan *Bacillus* türlerinin taranmasına, izolasyonuna ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Nitekim son zamanlarda alkalifilik *Bacillus* soyları hem akademik hem de endüstriyel açıdan oldukça önem kazanmıştır (Igarashi ve ark., 1998; Bal, 2005; Tatar, 2007; Tekin, 2008).

Daha önce deri mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda deri işlem proseslerinden alkalifilik bakteri izolasyonu, tanımlanması veya izole edilen bakterilerin pH toleranslarının belirlenmesi ile ilgili bir araştırmaya yer verilmemiştir. Bu nedenle araştırmamızda farklı pH koşullarında gerçekleştirilen tabaklama öncesi işlem basamaklarından (ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama) hidrolitik enzim aktivitesine sahip alkalifilik bakterilerin izolasyonu, elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi, fenotipik özelliklerine göre seçilen birbirinden farklı izolatların nicel enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve moleküler tanımlamalarının yapılması amaçlanmıştır.

## **BÖLÜM 2**

### **ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

#### **2.1. Deri Yaş İşlem Basamakları**

Deri sektörünün temel ham maddesini oluşturan ham deri, kesilen yada başka bir şekilde öldürülen hayvanın yüzülmesiyle elde edilen organik bir maddedir. Deri sektörü gerek et endüstrisinin bir yan ürününü değerlendirmesi ve gerekse yarattığı istihdam nedeniyle pek çok gelişmekte olan ülke için önemli bir ekonomik faaliyettir. Ham deri teknik yöntemlerle uygun şekilde işlendiği takdirde, birçok alanda kullanılmaya elverişli değerli madde niteliği kazanır. Deri üretiminde kullanılan ham maddenin en önemli ve ana grubunu memeli hayvan derileri oluşturmaktadır (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Deri üretimi dünyada ağırlıklı olarak sığır, koyun giysilik, koyun kürk ve keçi derileri kullanılarak yapılmaktadır. Normal şartlar altında kokuşabilen ve kurutulduğunda kırılganlaşan ham deri, bir dizi kimyasal ve mekanik işleme tabi tutulduktan sonra kullanmakta olduğumuz derinin fiziksel özelliklerine ulaşır. Ara ürün olan bu deriler işlenerek ayakkabı ve giysi gibi deri mamulleri, mobilya gibi günlük hayatta kullanılan eşyalara dönüştürülürler (Denz, 2009).

Deri fabrikalarında ister küçükbaş isterse büyükbaş hayvan derisi olsun mamul deri haline gelinceye kadar bir seri işleme tabi tutulmaktadır (Ulusoy ve ark., 2004). Genel olarak, sığır derisinden ayakkabılık, giysilik ve astarlık deri; koyun derisinden ise giysilik deri üretiminde yararlanır. Bu derilerin işleme prosesleri, kullanılan kimyasallar ve atık çıktıları büyük oranda birbirine benzerlik göstermektedir. Bu neden ile aynı kapsamda incelenmektedirler (Thorstensen, 1993; Denz, 2009).

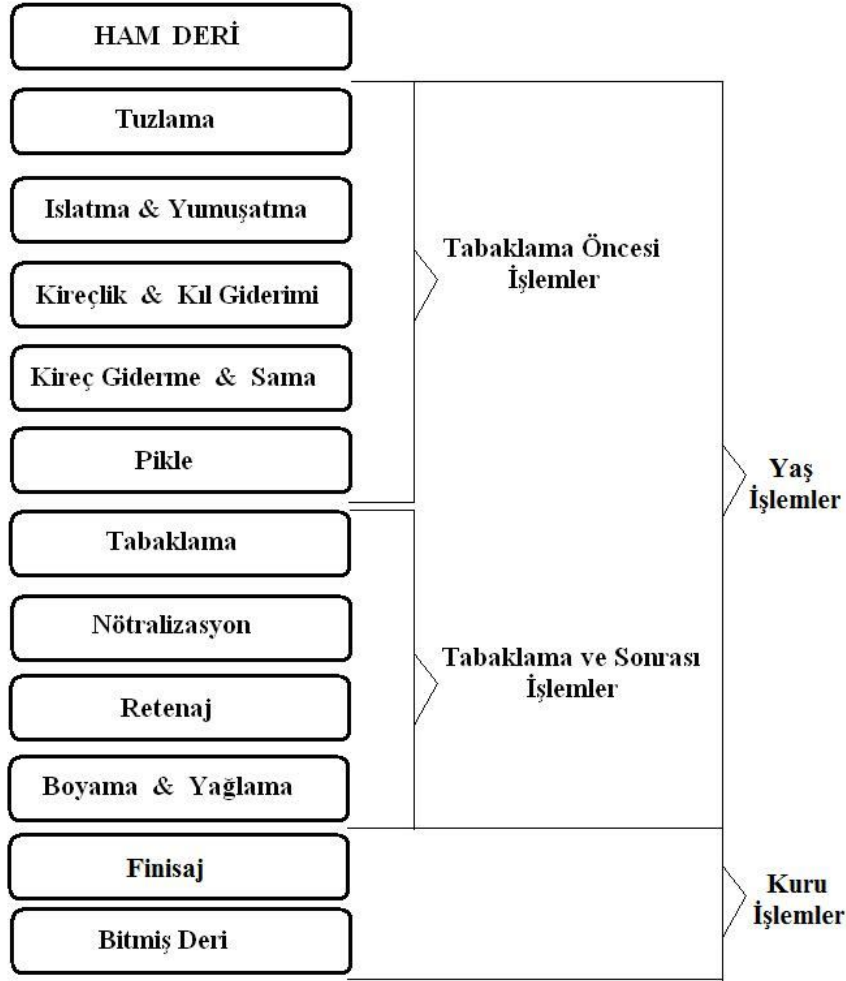
Deri üretim süreci çok çeşitli aşamaları içermekle birlikte yaş işlemler bölümü üç basamakta gerçekleşmektedir.

a) Tabaklama öncesi işlemler: İstenmeyen bileşenlerin, kıl, yağ vb., deri protein fibrilleri ağının birbirinden ayrılarak uzaklaştırılmasıdır.

b) Tabaklama işlemleri: Dayanıklı bir yapı özelliğini elde etmek için tabaklama materyalleri ile bu lif ağının reaksiyona girmesidir.

c) Tabaklama sonrası bitirme işlemleri: Dolgun, boyalı, yumuşak, yağlı tabaklanmış lif karakterlerini oluşturmak ve lif yüzeyinin kullanışlı bir ürün üretmek için işlemin bitirilmesidir. Derilere estetik değer kazandırılır. (Thorstensen, 1993; Shede ve ark., 2008).

Dünyada uygulanmakta olan deri işlem prosesleri sırasıyla ıslatma ve yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama, yağ giderme, pikle, tabaklama, tabaklama sonrası yaş işlemler (nötralizasyon, retenaj, boyama, yağlama) ve finisaj basamaklarından oluşmaktadır (Thorstensen, 1993; Denz, 2009). Tabakhanelerde küçükbaş ve büyükbaş hayvan derisinden giysilik deri eldesi için uygulanan işlemlerin genel akım şeması Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Küçükbaş ve büyükbaş hayvan giysilik deri işlentisi genel akım şeması.

Taze yüzülmüş küçük veya büyük baş hayvan derisinin bitmiş deriye dönüştürülmesindeki ana basamaklar aşağıda listelenmiştir.

- 1. Konservasyon:** Derinin tabakhaneye gelene kadar korunması.
- 2. Islatma ve Yumuşatma:** Konservasyon işlemi sonunda deriye kaybetmiş olduğu suyu geri kazandırma, çözünür proteinleri giderme, lif paketlerinin mekaniksel olarak zarar görmelerini önleme ve deriyi yabancı kirliliklerden arındırma işlemidir.

3. **Kireçlik:** Ham deri üzerindeki kıl, yağ ile etin yumuşatılması ve epidermis tabakasının uzaklaştırılması işlemidir.
4. **Kireç giderme-sama:** Kireçleme esnasında kullanılan ve alkali özelliklere sahip olan maddelerin nötralizasyonu ve enzimler yardımı ile derilerin yumuşatılması işlemleridir.
5. **Yağ giderme:** Ham derinin içerdiği ve depolama esnasında oksidasyona ve kokuşmaya neden olan doğal yağların giderilmesi işlemidir.
6. **Pikle:** Deride mikrobiyal faaliyetleri durduran tabaklamaya hazırlık safhasıdır.
7. **Tabaklama:** Bozulabilir durumdaki ham derinin tabaklayıcı maddelerle uzun süre dayanan, kullanışlı, dış etkilerle bozulmayan, kokuşma ve çürüme yapmayan, esnek bir forma dönüştürülmesi işlemidir.
8. **Nötralizasyon:** Nötralizasyon kromlu derinin katyonik karakterini değiştirerek anyonik dolgu maddelerini, boyar maddeleri ve yağları sadece yüzeye değil derinin ortalarına kadar nüfuz etmesini sağlamaktadır.
9. **Retenaj:** Retenaj kromlu deriye daha üstün özellikler kazandırmak amacıyla yapılır.
10. **Boyama ve Yağlama:** Ham deriden yumuşatma, kireçleme gibi ön işlemlerle uzaklaştırılmış doğal yağların deri yumuşaklığı için deriye geri kazandırılması işlemidir (Dahl, 1956; Yakalı ve Dikmelik, 1994; Sarı, 2005).

Mikroorganizmalar her yerde bulunurlar ve birçok endüstriyel ürünün üretiminde ve sonrasında gelişerek ürünün zarar görmesine, ürünün bozulmasına kalite düşüklüğüne ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar (Lindner,1998; Karaboz ve ark., 2003). Deri Endüstrisinde mikroorganizma zararı ile her an karşılaşabilecek bir sanayi dalıdır (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993; Özgünay ve ark., 2004).

Mikroorganizmalar ham deride ve daha sonraki deri işleme basamaklarında bulunmalarından dolayı çeşitli zararlara neden olmaktadır. Deri sektöründe karşılaşılan önemli problemlerden birisi bakteri, maya ve küf gibi mikroorganizmaların faaliyeti sonucunda oluşan zararlardır. Derinin tabaklama öncesi işlemlerinde daha çok bakteriler, tabaklama ve sonrası işlemlerde de funguslar sorun teşkil etmektedir (Pfleiderer ve Reiner, 1988).

Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar derinin ilk işlem basamağından itibaren iyi korunmadığı takdirde tabaklama öncesi ve sonrası yaş işlemlerin her ikisinde birden proteolitik ve lipolitik özellikteki bakterilere ve funguslara rastlanabileceği ifade edilmiştir (Bilgi ve ark., 2009; Doğanay ve ark., 2013).

Gerek tabaklama öncesi gerekse tabaklama ve sonrası yaş işlemlerde deriler mikrobiyal enfeksiyonlara son derece açıktır. Tabakhane ortamında geniş bir mikroorganizma grubunun bulunması, derilerin mikroorganizma faaliyetleri bakımından iyi bir ortam oluşturması ve elde edilen derilerin çoğu zaman birkaç aydan daha fazla bir süre değişik koşullarda beklemesi gibi birçok faktör buna neden olarak gösterilebilir. Bu sebeple hem prosesler hem de bekleme esnasında karşılaşılan enfeksiyonlardan korunabilmek için ilk işlem basamağından itibaren gereken önlemler alınmalıdır (Doğanay ve Meriçli Yapıcı, 2008). Bu nedenlerden dolayı dericilikte, yeterli verimin alınabilmesi için derilerde ve işlem basamaklarında karşılaşılabilecek mikroorganizmaların neler olabileceği, bunların beslenme istekleri, kontrol önlemlerinin neler olabileceği gibi bilgilere gereksinim vardır (Karaboz, 1994).

## **2.2. Ham Deri ve Konservasyon Mikrobiyolojisi**

Ham deri, yapısal, kimyasal bileşim olarak ve diğer birçok özelliği ile kendine özgü doğal bir üründür. Hayvan derilerinin doğal yapısı ve kimyasal özellikleri, işlenmiş derinin kalitesini doğrudan etkilediği için oldukça önemlidir (Toptaş,1993; Aslan, 2009).

Ham deri ve kalitesi; hayvanın ırkı, yaşı ve cinsiyeti, bakım ve besleme, iklim, hastalıklar ve parazitler, hayvanın kesimi sırasında kan bulaşması, kanın iyi akıtılmaması, derinin çıkarılması sırasındaki kusurlar, maddi deri kaybı, kesimden sonraki konservasyon hataları, depolama ve taşıma esnasındaki fiziksel etkenler, depo parazitleri ve işleme hataları tarafından etkilenmektedir (Artan ve ark., 1981; Artan, 1982; Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Hayvan derisi, havadan, sudan, topraktan, gübreden ve dış kaynaklı pislikten türeyen büyük bir mikroorganizma çeşitliliğini içermektedir. Hayvan henüz canlıyken bu mikroorganizmaların çoğu deri üzerine az bir etkiye sahipken, deri yüzüldükten sonra öncelikle derinin et yüzüne bulaşmaya başlayan mikroorganizmalar gelişim için kendilerine uygun bir ortamda bulduklarından hızla çoğalırlar (Dahl, 1956).

Taze yüzülmüş yaş bir sığır derisinin bileşenleri incelendiğinde; derinin % 64'ünün su, % 30'unun protein, % 2,5-3,5'unun karbonhidrat, % 2,0-2,5'unun yağ, % 0,3-0,5'unun mineral madde ve % 0,2-0,5'inin pigment gibi diğer maddelerden oluştuğu gözlenmiştir

(Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993). Ham derilerdeki proteinler ve yağlar, bakteriler ve küfler için ideal bir besin deposudur (Bitlisli, 1992). Bu nedenle ham deriler mikroorganizmalar için oldukça konforlu bir ortam oluşturmaktadır (Karaboz, 1994).

Taze deriler mikroorganizmaların gelişimi için uygun pH'ya sahip olmakla beraber yüksek nem ve besin içeriğine sahiptir. Bu durum derilerdeki mikroorganizmaların hızlı gelişimine neden olur (Muthusubramanian ve Mitra, 2006; Polkade, 2007; Aslan, 2009).

Derilerin yapısını bozan ve kokuşturan aerobik ve anaerobik 80'den fazla mikroorganizma türü olduğu bilinmektedir. Bu mikroorganizmaları 2 grup altında toplamak mümkündür. Birinci grup, nötral ya da alkali pH da etkin olan proteolitik (kokuşma yapan) bakterilerdir. Sayıları oldukça fazla olup, deri üzerinde ve işlentilerde daha çok bu bakterilere rastlanır. Örnek olarak *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Esherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Sarcina* türleri verilebilir. Bu bakterilere; henüz işlem görmemiş taze ve yaş derilerde, konserve edilerek depolanmış derilerde, yumuşatma, kıl giderme, samalama gibi alt ve üst işlentilerden geçmiş derilerde rastlanmaktadır (Karaboz, 1994).

Bakteriyal saldırı sonucunda yünlü deriler üzerinde kızartı, kıl dökülmesi ve kollajen dokusunda bir bozulma meydana gelmektedir. Mamul deride ise bu durumlar sırça tabakasının kaybı, "pinhole" olarak bilinen iğne deliğine benzer çukurlar, epidermis kaybı, kabarma ve soyulma, boşluk hissi ve delikler olarak görülür (Mitchel, 1987).

Hayvanın kesim işleminden tabakhanedeki işlemlerin başlamasına kadar geçen sürede taze deri hücrelerinde var olan enzimler veya deriler yüzüldükten sonra deriye bulaşan bakterilerin enzimlerinden dolayı kolaylıkla bozulabilir (Hien, 2006). Derilerde bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilen proteolitik, lipolitik ve keratinolitik enzimler derilerde kötü koku oluşumu, önemli ölçüde sırça zararı, pürüzlü sırça tabakası, sırça soyulması, sırça tabakasında boşluklar, kıl gevşemesi, kıl kaybı ve derilerde delikler gibi zararlara neden olmaktadır (Bailey ve Birbir, 1993; Bailey ve Birbir, 1996).

Mikrobiyal gelişme ve aktiviteye bağlı olarak taze derilerin bozulması deri ve tabaklama endüstrisinde önemli bir problemdir ve ekonomik kayıpların da önemli bir sebebidir (Orlita, 2004; Oppong ve ark., 2006; Polkade, 2007). Deriler kimyasal ya da fiziksel herhangi bir metot ile korunmadığı takdirde kokuşmakta ve kokuşmanın nedenini de bakteriler oluşturmaktadır (Shede ve ark., 2008). Bundan dolayı hayvanlardan yüzülerek elde edilen ham derilerin işleme girmeden önce uygun koşullar altında saklanması gerekmektedir. Büyükbaş hayvan derisi ve küçükbaş hayvan derilerinin

konservasyon ve depolanması deri endüstrisinin önem arz eden konularından biridir (Bitlisli ve ark., 2004).

Genellikle iki konservasyon tipi kullanılmaktadır; havayla kurutma ve tuzla kurutma. Her iki koruma biçimi de derinin dehidrasyonuna dayanmaktadır, böylece bakteriler gelişimleri için gerekli sudan yoksun bırakılır (Dahl, 1956).

Avrupa, Kuzey Amerika ve diğer ılıman iklimlerde ham derilerinin korunmasında kurutma, tuz ve salamura gibi konservasyon çeşitleri arasında en yaygın yöntem geleneksel olarak tuzla konserveleme yöntemidir (Thorstensen, 1993).

Tuzlama ile derilerin içerdiği su miktarı yaklaşık olarak % 60-65 seviyesinden % 35-40 seviyelerine düşmektedir. Ancak bu durum tam bir koruma için yeterli değildir. Bununla birlikte böyle derilerin depolanması sırasında istiflerin fazla olması ısıyı yükseltmekte ve bakteri gelişimine olanak tanımaktadır. İstiflerin yerinin sıklıkla değiştirilmesinin ise söz konusu derilerin havalanması sağlayarak, dinlenen sporların faaliyete geçmesine ve vejetatif forma dönüşmesine neden olmaktadır (Karaboz, 1994).

Ülkemizde üretilen mamul derilerin kalitesini özellikle ham derilerin konservasyonunda kullanılan tuzun kalitesi belirlemektedir. Ham derilerde rastlanan konservasyon hataları deri kalitesini büyük ölçüde düşürerek önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Birbir, 2004). Yine Birbir (2004), deri konservasyonunda kullanılan tuzlarda, proteolitik ve lipolitik bakteri etkinliğini araştırmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde oldukça yoğun proteolitik ve lipolitik etki olduğunu gözlemlemiştir.

Nitekim araştırmacılar deniz ve göl sularının halofil bakteri içermesi nedeniyle buralardan elde edilen tuzların derileri koruma işlemini tam olarak yapamadıklarını saptamışlardır (Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir ve ark., 2002).

Deri ve tuzda bulunan halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar tuzlama yöntemiyle ortaya çıkabilmekte ve bu mikroorganizmalar uygun olmayan taşıma ve depolama koşullarında deriler üzerinde gelişerek deriye zarar verebilmektedirler (Birbir ve Ilgaz, 1996). Tuzlu küçükbaş ve büyükbaş hayvan derilerinden izole edilen halofilik bakteri ve küflerin çoğunluğu lipolitik ve proteolitik enzimlere sahiptir. Tuzla konserveleşmiş derilerden elde edilen halofil bakterilerin % 70'inin proteolitik olduğu ve deri materyaline zarar verdiğini bildirilmiştir (Birbir ve ark., 1996). Deri üzerinde gelişen halofilik bakteriler deri yüzeyine hidrolitik enzimler salgırlar, bu bakterilerin hücre dışı proteolitik enzimleri deriye zarar vererek protein materyallerini azaltırlar (Bailey ve Birbir, 1993; Bitlisli ve ark., 2004).

Ham derilerde, kesim sırasında alınan bıçak yaraları ve lezyonlarda, düşük kapasiteli, havasız ve altyapı tesisi olmayan ilkel depo koşullarında bekleme süresine bağlı olarak, tuzlu ortamda halofilik mikroorganizmaların önce derilerin kesiklerinde, daha sonra da tamamında hızlı üreme özelliklerine sahip oldukları belirlenmiştir (Kırk ve Dostbil, 2004). Genellikle tuz ile koruma altına alınan konserve derilerde, halofilik veya halotolerant bakteriler gelişebilmektedir. Söz konusu bu bakteriler derilerde kırmızı ve mor kızıllaşmaya neden olmaktadır (Anonim, 2000).

Tuzlarda, tuzlanmış ve ıslatılmış ham derilerdeki bakteriyel popülasyonun incelendiği bir araştırmada tuz ve tuzlanmış ham deri örneklerinin çoğunda, proteolitik ve lipolitik aşırı halofil bakteriye rastladığı ve tuzlarda bu bakterilerin sayısının düşük olduğu ancak tuzlanmış ham derilerde ise sayının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada tuzlama işleminin yetersiz olduğu, bu nedenle tuzlanmış ve ıslatılmış derilerde bakteri faaliyetinin oldukça yoğun olduğu ve ıslatma işleminde kullanılan antimikrobiyal madde konsantrasyonunun yetersiz kaldığını ifade edilmiştir (Berber, 2009).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında tuzlanmış ham derilerin zarar görme nedeninin halofilik mikroorganizmalar ve onların hidrolitik enzimleri olduğu dikkat çekmektedir (Bilgi, 2012). Büyükbaş ve küçükbaş ham derilerdeki bakteriyel gelişim ve bozulmanın deri endüstrisinde önemli bir ekonomik probleme neden olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir. Ancak deride zarara neden olan mikroorganizmalar hakkındaki bilgiler yetersiz kalmaktadır. Deriden izole edilen bu mikroorganizmaların tanılanması geleneksel yöntemler olarak bilinen morfolojik, kültürel, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler dikkate alınarak yapılmaktadır. Son dönemlerde bu yöntemler önemli ölçüde nükleik asit teknolojisine dayanan daha yeni ve daha iyi tespit ve tanımlama yöntemleri ile yer değiştirmektedir. Bununla birlikte genetik yöntemlerle tanımlama daha hızlı ve daha doğru sonuçlar vermektedir (Oppong ve ark., 2006).

Birbir (1991), araştırmasında kesimden hemen sonra aldığı 10 adet taze deri örneğinde *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus roseus* ve *Kurthia variabilis* türlerini izole edip tanımladığını belirtmiştir. Araştırmacı 1 haftalık tuzlu salamura derilerden *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *Kurthia variabilis*, *Micrococcus candidus*, *M. luteus*, *M. rubens*, *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* tanımladığını belirtmiştir. Ayrıca iki aylık tuzlu salamura derilerden *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Kurthia variabilis*, *Micrococcus*



*candidus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus rubens*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* tanımladığını ifade etmiştir.

Yapılan bir araştırmada tuzlanmış derilerden 100 farklı bakteri straini izole edilmiş olup bunların 36'sı halofilik kok ve geri kalan 64'ü çubuk olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda tuzlanmış bir ham deride halofilik bakterilerin hızla gelişerek kırmızı ve menekşe rengi pigment oluşturduğu gözlenmiştir. Renkli lekelerden yapılan izolasyon sonucunda sıklıkla *Micrococcus roseus*, *M. luteus* ve *M. morhuae* türleri izole edilmiştir (Orlita, 2004). Ayrıca aynı araştırmacı deride delik oluşumuna neden olan *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. anthracoides*, *B. pumilus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi 6 bakteri türünü hem ıslatma suyundan hem de deri üzerinde bozulmuş kısımlardan izole ederek tanımlamıştır (Orlita, 2004).

Aslan (2009), tuzlanmış derilerde bulunan mikroorganizma türlerinin saptanması konulu çalışmasında klasik tanımlama ve API test yöntemini kullanarak 36 cins ve 102 mezofilik bakteri türü izole ederek tanımlamıştır. Tanımladığı izolatlar içerisinde en yaygın bulunan bakteri cinslerinin *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas* olduğunu belirtmiştir.

Nitekim son dönemlerde 16S rRNA gen dizilimi yöntemi kullanılarak ham deri ve deri işleme sürecindeki mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik yapılan bazı çalışmalar da bulunmaktadır.

Oppong ve ark. (2006), 16S rRNA gen dizilimi ile taze deri ve devam eden işlem sıvılarından 35 farklı bakteri türünü tanımlamışlar ve bunların proteolitik aktiviteye sahip olup olmadığı ortaya koymuşlardır. Ayrıca daha önce deri endüstrisinde tespit edilmeyen birçok bakteri genusu ve türleri (*Janibacter terrae*, *Acidovorax sp.*, *Dietzia maris*, *Arthrobacter protophormiae*, *Comamonas sp.*, *Brevibacterium lutescens*, *Jeotgalicoccus psychrophilus*, *Nocardiopsis sp.*, *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas cannabina*, *Pseudomonas fulgida*, *Aeromonas sp.* ve *Acinetobacter sp.*) tanımlanmışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar ham bufalo derisinden 16S rRNA gen dizi analizi yöntemiyle *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Myroides*, *Brevibacterium*, *Vagococcus*, *Staphylococcus*, *Mycoplana*, ve *Weeksell* olmak üzere 11 bakteri cinsi ile bunların içinde *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas caviae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *Myroides odoratimimus*, *Brevibacterium sp.*, *Brevibacterium luteolum*, *B. otitidis*, *Vagococcus sp.*, *Staphylococcus sciuri*, *Mycoplana sp.*, ve *Weeksell virosa* olmak üzere 17 farklı tür tanımladıklarını bildirmişlerdir (Shede ve ark.,2008).

Berber (2009), tuzlarda, tuzlanmış ve ıslatılmış ham derilerdeki bakteriyel popülasyonun incelendiği araştırmasında FISH (fluorescence in situ hybridization) yöntemi sonuçlarına göre tuz ve tuzlanmış ham derilerde Arke, ıslatılmış deri ve ıslatma sıvılarında Bakteri popülasyonunun yoğun olduğunu belirtmiştir.

Tuzlanmış derilerle yapılan bir çalışmada 16S rRNA dizi analizi ile *Salimicrobium album*, *Salimicrobium halophilum*, *Halomonas eurihalina*, *Salimicrobium luteum*, *Halomonas koreensis*, *Halomonas elongata*, *Halomonas halmophila*, *Halomonas alimentaria*, *Marinococcus halophilus*, *Halorubrum saccharovorum*, *Halorubrum tebenquichense*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Chromohalobacter salexigens*, *Oceanobacillus picturae*, *Thalassobacillus devorans*, *Alkalibacillus salilacus*, *Natrinema pallidum*, *Natrinema gari* ılımlı ve aşırı halofil türleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte tuzlanmış derilerde oldukça farklı türde ılımlı halofil bakteri bulunduğu ve iyi korunmuş derilerde halofil bakteri sayısının kontrol altına alındığı ifade edilmiştir (Yılmaz, 2010).

Ayrıca tuzlanmış ham derilerden 16S rRNA dizi analizi sonucu *Natrialba aegyptia* 40, *Halococcus thailandensis*, *Natrinema pallidum* R-fish, *Halococcus dombrowskii* H4, *Halovivax asiaticus*, *Halovivax* sp. E107, *Halococcus morrhua*, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1 olmak üzere 16 farklı aşırı halofilik arke straini tanımlanmıştır (Bilgi, 2012).

### **2.3. Islatma Yumuşatma Mikrobiyolojisi**

Tabakhanelerde ilk işlem basamağı olarak bilinen ıslatma-yumuşatmanın amacı derinin tuzlama işlemi esnasında deriye kaybetmiş olduğu suyu geri kazandırmak, çözünür proteinleri gidermeye başlamak, lif paketlerinin mekaniksel olarak zarar görmelerini önlemek ve deriyi yabancı kirliliklerden arındırmaktır (Reeder, 1999; Orlita, 2004). Konserve edici tuzun uzaklaştırılması ve derinin dehidrasyonu bakteriyel gelişim olasılığını arttırmaktadır. Konserve edilmiş deri yoğun bir bakteri çeşitliliği içermekte olup bu bakteriler ıslatma durumunda aktif hale gelebilmektedirler (Thorstensen, 1993).

Islatma sıvılarındaki bakteriyel gelişim sıcaklığa, işlemin süresine, pH'a, neme ve ortamdaki besine bağlıdır (Orlita, 2004; Uğur, 2006). Islatma süresinin hem ülkelere hem de derinin korunma işlemine göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu sürenin en az 1.5 saat en fazla da 48 saat olabileceğini ifade etmişlerdir (Rangarajan ve ark., 2003; Orlita, 2004). Çoğu bakterinin uygun ortam koşullarında jenerasyon süresi 0.5

ile 6 saat arasında değişebilir (Madigan ve Martinko, 2009). Bakterilerin jenerasyon süresini dikkate aldığında 12-18 saat içinde bakteri sayısının önemli bir sayıya ulaşması kaçınılmaz olmaktadır (Berber, 2009).

Yapılan çalışmalar ıslatma sıvısı sıcaklığının 20-30 °C arasında değiştiğini, 27 °C'nin üstünde mikroorganizma faaliyetinin arttığını göstermektedir (Line, 1948; Birbir, 1991). Derilerde zarar oluşturan bakterilerin gelişmesi için gerekli olan sıcaklığın 4.5-35°C arasında olduğu belirtilmiştir. Islatma sıvılarında bu sıcaklık değerleri arasında bakteriler gelişmekte ve daha sonraki aşamalarda sorunlara yol açmaktadırlar. Islatma işlemlerinin çoğu 15°C'nin üstünde yapılır. Islatma işlemi tuzlanmış deriler için yardımcı bir madde olmadan 24 saat ve kurutulmuş deriler için 36-48 saat sürmektedir. Derilerin önerilen ıslatma süresinden daha uzun süre ıslatma safhasında tutulması deri maddesinde hasara yol açması bakımından risklidir. Hem ıslatma süresi ve sıcaklığı hem de ıslatmadaki organik madde yükü mikroorganizma gelişmesi için ideal bir ortam oluşturmaktadır (Orlita, 2004; Berber, 2009).

Uğur (2006), yapmış olduğu bir çalışmasında da toplanan ıslatma sıvıları sıcaklıklarının 22-27°C arasında ve işlemi süresinin ilk ıslatma için 8-12 saat, ana ıslatma için 18-24 saat arasında değiştiğini ifade etmiştir. Ayrıca aynı araştırmacı ıslatma sıvılarındaki hafif alkali ortamın ve derinin yüksek organik içeriğinin, bakteri gelişimini desteklediğini vurgularken, çalışmasında hem ilk hem de ana ıslatma sıvılarının pH'nın 7-11 arasında olduğunu belirtmiştir.

Islatma safhası deri imalatındaki en çok ihmal edilen işlemdir. Bitmiş üründe meydana gelen problemlerin çoğu uygunsuz bir ıslatma safhasının sonucu olarak görülmektedir. Ayrıca ıslatma sıvısında çözünmüş olan azotlu yıkım ürünleri, pıhtılaşmış proteinler ve kan, deriden veya dışarıdan gelen kontaminant mikroorganizmalar için ideal bir ortam sağlamaktadır (Dahl, 1956). Nitekim optimum koşullar altında ıslatma sıvıları bakteriyel sayı bakımından oldukça yoğun bir çeşit kültür ortamını ifade etmektedir (Line, 1948).

Deriler vasıtasıyla çok sayıda mikroorganizma ıslatma suyuna aktarılır. Islatma-yumuşatma banyoları bakteriyel gelişim için gerekli olan fiziksel ve kimyasal koşulları sağladığından 4-6 saat içerisinde yumuşatma suyunun her bir mililitresinde milyonlarca bakteriye rastlamak mümkündür. Bu süre içerisinde mikroorganizmalar derinin parçalanmasına bile neden olabilmektedir (Lindner ve Neuber, 1990; Karaboz, 1994; Didato ve ark., 1999; Rangarajan ve ark., 2003).

Islatma sıvılarında bulunan bakteriyel popülasyonun değerlendirilmesi antimikrobiyal maddeler ve kontaminasyon hakkında bize bir fikir vermektedir. Ayrıca derideki yüksek organik içerik ve alkalın ortam ıslatma sıvılarındaki bakteri gelişimini hızlandırmaktadır (Rangarajan ve ark., 2003).

Islatma sıvılarındaki bakteriyel popülasyonun  $10^5$  kob/ml'den daha yüksek olmaması gerekmektedir (Rangarajan ve ark., 2003). Ancak ıslatma ve yumuşatma banyolarında bakteriyel gelişme için gerekli fiziksel ve kimyasal koşullar sağlandığında 4-6 saat içerisinde bakteri sayısının  $10^6$  ve üzerine çıkabileceği bildirilmiştir (Meriçli Yapıcı ve ark., 2004).

Deri sektöründe kullanılan bazı bakterisidlerin etkinliğinin tespiti üzerine yapılan araştırmada, ıslatma basamağında toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $1,5 \times 10^8$  kob/mL, proteolitik bakteri sayısı  $8,9 \times 10^8$  kob/mL, halofil bakteri sayısı  $2,5 \times 10^9$  kob/mL ve halotolerant bakteri sayısı ise  $3,0 \times 10^8$  kob/mL olarak tespit edilmiştir (Meriçli Yapıcı ve ark., 2004).

Bilgi (2007), ıslatma ve yumuşatma basamağı sonunda toplam aerobik mezofil bakteri, aerob spor, proteolitik bakteri ve lipolitik bakteri sayılarını sırasıyla  $7,2 \times 10^4$  kob/mL,  $2,0 \times 10^4$  spor/mL,  $5,4 \times 10^4$  kob/mL,  $5,3 \times 10^4$  kob/mL olarak tespit etmiştir. Ayrıca ıslatma ve yumuşatma basamağında bir bakterisid kullanılmadığı takdirde mikroorganizma gelişiminin  $1,2 \times 10^5$  kob/mL ile  $2,7 \times 10^8$  kob/mL arasında olduğunu ifade etmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada ıslatma sıvısı örneklerinde toplam mezofil bakteri sayısının  $10^5$ – $10^7$  kob/ml arasında olduğu saptanmıştır. Bu örneklerdeki toplam proteolitik mezofil bakteri sayılarının 8 örnekte  $10^5$ – $10^6$  kob/mL arasında, 9 örnekte ise  $10^2$ – $10^4$  kob/mL arasında olduğu gözlenmiştir. Islatma sıvısı örneklerindeki lipolitik mezofil bakteri sayılarının ise 8 örnekte  $10^5$ – $10^6$  kob/g arasında, 8 örnekte ise  $10^3$ – $10^4$  kob/g arasında, 2 örnekte  $10^1$ – $10^2$  kob/g arasında olduğu belirlenmiştir (Berber, 2009).

*Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Sarsina*, *Chromobacter*, *Lactobacillus* ve *Serratia*, *Halobacterium* cinslerine ait farklı türlerin ıslatma-yumuşatma banyolarından izole edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Birbir ve ark., 1996; Pfleiderer ve Reiner, 1988; Yapıcı ve Meriçli Yapıcı, 2002).

Deri kalitesine olumsuz etki edebilen faktörlerden biri, özellikle ıslatma aşamasında bulunan proteolitik bakteri varlığı ve sayısıdır. Islatma sıvısında, optimum koşullar altında, proteolitik bakteriler hızla gelişirler ve derilerde delikler meydana getirirler. Deride delik oluşumuna neden olan *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. anthracoides*, *B. pumilus* ve

*Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteri türlerini hem ıslatma suyundan hem de deri üzerinde bozulmuş kısımlardan izole edilerek tanımlanmıştır (Orlita, 2004).

Birbir ve Ilgaz (1996), 25 adet ıslatılmış deri örneğinden *Bacillus cereus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus liquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Kurthia virabilis*, *Micrococcus rubens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aeurus* ve *Staphylococcus epidermidis* izole etmişlerdir.

Ayrıca ana ıslatma sıvısından alınan örneklerden *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter amnigenus* biogrup I, *Enterobacter cloaceae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Aerococcus viridans*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Kocuria varians*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus cohnii* ssp. *urealyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus cohnii* ssp. *cohnii*, *Staphylococcus warneri* ve *Micrococcus spp* suşları izole edildiği ve API test yöntemi ile tanımlandığı bildirilmiştir (Berber, 2009).

Yumuşatma suyunun hoş olmayan kokusu ve derideki bazı değişimler yoğun bir bakteriyel faaliyetin göstergesidir (Karaboz, 1994). Bakteriler tarafından proteaz enzimi ile proteinlerin kullanılması, enzimlerinin de sindirim faaliyetlerini devamlı olarak sürdürmeleri ve bunun sonucu olarak da kokuşmanın ortaya çıktığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Kokuşmanın sebebi bakterilerin deri yapısında bulunan sistini, amonyağı ve glisini parçalayarak hidrojen sülfürü ortaya çıkarmalarıdır. Ayrıca uygun koşullar altında bakteri enzimleri, derideki elastin ve kollajen liflerini de parçalamaktadır. Bu nedenle özellikle ıslatma aşamasında bakteri faaliyetinin kontrol edilmesi çok önemlidir (Birbir, 1991; Berber, 2009).

Yumuşatma hatalı yapıldığında, deri oldukça gevşek bir hal almaktadır. Ham derinin depolanması esnasındaki hatalar yumuşatmaya yansımakta ve hatalı yumuşatma da her zaman bakteriyel zararlar meydana gelmektedir. Epidermiste açılan küçük yaralardaki bakteriler derinin kokusunu veya suyun kokusunu değiştirmekte, derinin et yüzü ise kaygan bir hal almaktadır (Karaboz, 1994).

Deri hatalarının nedeni genellikle derilerin depolanmaları ve ıslatma sıvılarında bekletilmeleri esnasında olmaktadır. Islatma işlemi esnasında derilerde oluşabilecek

zararların önlenmesi için ıslatma sıvısındaki bakteri sayısının  $10^5$  kob/mL altına düşürülmesi gerekmektedir (Berber, 2009).

Bu nedenle ıslatma sıvılarındaki mikrobiyal popülasyon, ıslatma esnasında derilerde oluşabilecek zararın önlenmesi amacıyla zaman zaman test edilmeli ve uygun işlemlerle mikroorganizma popülasyonu kontrol altına alınmalıdır (Uğur, 2006).

Nitekim tabakhanelerde ilk işlem basamağı olarak bilinen ıslatma-yumuşatma prosesinde bir bakterisid kullanılmadığı takdirde deri önemli derecede zarar görmekte ve kontrol edilmezse kullanılmaz hale gelebilmektedir (Bilgi ve Meriçli Yapıcı, 2008). Bu nedenlerden dolayı yumuşatmada mutlaka bir bakterisid kullanılmalıdır.

#### **2.4. Kireçlik Mikrobiyolojisi**

Yumuşatma işleminden sonra gelen kıl giderme ve kireçlik işlemi, yün kıl örtüsüyle birlikte epidermis tabakasının parçalanarak uzaklaştırıldığı ve alkali şişmeyle derinin yumuşatıldığı deri kalitesi üzerine çok etkili olan bir basamaktır (Toptaş, 1993; Karaboz, 1994).

Dahl (1956), kireçlik işlemlerinde derilerin kalsiyum hidroksit içeren bir solüsyon ile muamele edildiğini ve bu solüsyonun pH değerinin bir mikrobiyolojik aktivite için çok yüksek olduğunu bildirmiştir. Farklı araştırmacılar ise yapmış oldukları çalışmalarda çok yüksek pH değeri nedeniyle (11–12) kireçlik işleminde deride herhangi bir biyolojik bozulmanın meydana gelmeyeceğini ifade etmişlerdir (Orlita, 2004; Lindner ve Neuber, 1990).

Kireçlik prosesi pH'nın oldukça yüksek olmasından dolayı mikroorganizmalar için ekstrem koşullar olarak kabul edilse de bu proste de alkali koşullara uyum sağlamış proteolitik mikroorganizmaların bulunduğu ve kontrol edilmediği takdirde problemlere sebep olabileceği bilinmektedir (Keçici, 2007).

Kireçlikte kullanılan kireç dericiler için iyi bir sterilize edici bir ajan olmasına rağmen, taze ve temiz kireç, ana madde yokluğunda, belli bir dereceye kadar bakterileri öldürür. Proteolitik bir bakteri olan *Proteus vulgaris* türünün ölmesi için suya fazladan kireç katılması gereklidir. Spor oluşturan basiller örneğin *Bacillus subtilis* doyurulmuş kireçli çözeltide 21 gün sonra ölmektedir. Bazı proteolitik bakterilerin ise ancak 25 gün sonra öldüğü saptanmıştır. Spor oluşturan proteolitik bakterilerin 521 gün sonra bile canlı kaldığı görülmüştür (Karaboz, 1994).

Nitekim Meriçli Yapıcı ve ark. (2008), yapmış oldukları araştırmada kıl giderme ve kireçlik prosesinde yüksek alkali koşullarda proteolitik bakteri ve aerobik spora

rastladıklarını ifade etmişlerdir. Orlita (1968), tabakhanedeki mikroorganizmalar üzerine yaptığı bir çalışmada kireçlik basamağında spor oluşturan bakterilerin  $1,68 \times 10^2$  spor/mL düzeyinde olduğunu tespit etmiştir.

Ayrıca tabaklama öncesi işlemlerde bakteri ve fungus sayısının belirlenmesi üzerine yapılan araştırmada da bakterisid kullanmasına rağmen 12 gibi ekstrem bir pH değerine sahip olan kıl giderme ve kireçlik sıvısında  $2,0 \times 10^1$  kob/mL ile  $1,0 \times 10^1$  kob/mL değerleri arasında proteolitik bakteri ve  $1,0 \times 10^1$  spor/mL düzeyinde spor tespit edilmiştir (Bilgi, 2007; Bilgi ve ark., 2009).

Deride bozulma, çürüme yapan kuvvetli proteolitik etkiye sahip bazı bakterilerin örneğin *Proteus vulgaris*, çeşitli *Bacillus* ve *Micrococcus* türlerinin kullanılmış kireçlik suyunda bulunması uyarı niteliğindedir. Ayrıca, buradan izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin alkali koşullarda bile iyi geliştiği saptanmıştır. Bu tip alkalifilik *Bacillus* sporlarının uzun süre canlı kaldığı belirtilmiştir (Karaboz, 1994).

Diğer yandan Keçici (2007), çalışmasında kireçlik sıvısının pH sına uygun olarak hazırlanmış %5 tuz konsantrasyonundaki besiyerlerde daha fazla üremenin görüldüğünü ve üreme gösteren bu izolatların aynı zamanda alkalifilik bakteriler olarak değerlendirildiğini ifade etmiştir.

Pfleiderer ve Reiner (1988), yapmış olduğu çalışmada eski kireç sıvısının tekrar tekrar kullanımının bu sıvılarda bulunan bakteri yükünü arttırdığı ve bakteri faaliyetleri sonucunda deride çeşitli parçalanma reaksiyonlarının olduğunu söylemiştir. Deride bozulma ve kokuşma yapan kuvvetli proteolitik etkiye sahip çeşitli *Proteus hauser*, *Bacillus cohn*, *Micrococcus cohn* türlerinin kullanılmış kireçlik sıvısında bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Nitekim deri endüstrisinde kireçlik sıvısının yeniden kullanımının mikroorganizma sayısı üzerine etkisi adı altında yapılan diğer bir çalışmada ise antimikrobiyal madde kullanılmasına rağmen 1. örnekten 10. örneğe kadar belirli düzeyde bakteri gelişimi tespit edilmiştir. Çalışmada proteolitik bakteri sayısı ve lipolitik bakteri sayısı sırasıyla  $1,0 \times 10^1$  ile  $3,8 \times 10^2$  kob/mL ve  $1,0 \times 10^1$  ile  $5,4 \times 10^2$  kob/mL değerleri arasında bulunduğu ifade edilmiştir (Keçici, 2007) .

Kirecin etkisi öncelikle derinin üst yüzeyine yerleşen mikroorganizmalar ile sınırlıdır. Eğer deri yumuşatmadan önce çok bakteri içeriyorsa, bunlar kireçlikte de büyümeye devam edebilir ve deriyi bozabilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, kireçlikten çıkan deriden izole edilen canlı kok ve basillerin yumuşatmada da bulunduğu saptanmıştır. Diğer yandan kireçlik zemininde toplanan kireç parçaları, deri parçaları, bakteri gelişimi

için uygun bir ortam oluşturabilir ve özellikle altta kalan derilerde zarara yol açabilirler (Karaboz, 1994).

Bazen hatalı konserve edilen tuzlu derilerde veya kurutma yapılırken derinin nemli kalan kısımlarında mikrobiyal faaliyetin bulunduğu ve yumuşatmada da buradaki mikroorganizmaların faaliyet göstererek çoğaldıkları, kireçlikte de büyümeleri durdurulamazsa deride parçalanmalara dek uzanan zararlara yol açtığı gözlenmiştir. Derideki parçalanmaya neden olan enzimlerin daha çok *Bacillus subtilis* türüne ait olduğu tespit edilmiştir (Pfleiderer ve Reiner, 1988).

Yine aynı araştırmacılar uzun kireçlik yapıldığında bakteriyal faaliyet nedeniyle kıl köklerinde oluşan gazların dışarı çıktığını ve bu gaz oluşumunun samada yoğunluk kazanarak kenarları düzgün ve yuvarlak şekilde gözükken deliklerin oluşumuna sebep olduğunu gözlemlemiş ve bunlara da “pikeur” delikleri adını vermişlerdir. Bu haldeki bir derinin dolapta bırakılmaması gerektiği, yoksa faaliyet bölgesini kaplayan bakterilerin 24 saat içinde sağlıklı bir deriyi tümüyle parçalayabildiği tespit edilmiştir (Pfleiderer ve Reiner, 1988).

Ayrıca Bilgi (2007), araştırmasında kıl giderme ve kireçlik basamağından önce bakterisid kullanılmadığı takdirde ıslatma basamağındaki mikroorganizma gruplarının kıl giderme ve kireçlikte de ortaya çıktığını ifade etmiş ve bu nedenle söz konusu basamakta mikroorganizma kontrolünün elden bırakılmaması gerektiğini ortaya koymuştur.

### **2.5. Kireç Giderme-Sama Mikrobiyolojisi**

Kireçlik işleminden dolayı ortamın pH (11-12) değeri aşırı alkalidir ve ortamın nötralize edilmesi gereklidir. Bunun için öncelikli olarak ortamdaki kirecin uzaklaştırılması amaçlandığı için bu işlem basamağına kireç giderme denilmektedir (Toptaş, 1993; Karaboz, 1994).

Kireç gidermeyi izleyen sama işlemi genellikle aynı dolapta ard arda gerçekleştirilir. Bu yüzden kireç giderme-sama işlemleri bir işlem basamağı olarak kabul edilebilir (Bilgi, 2007). Sonuç olarak derideki pH (8.2-8.5) düşer ve gerekli sama maddeleri kullanılarak sama işlemi gerçekleştirilir.

Günümüzde samada kullanılan maddeler, pankreas enzimleri yanında bakteri ve fungus enzimlerini içeren karışımlardır. Bu işlem basamağında mikroorganizmaların bu özelliklerinden endüstriyel amaçlı olarak yararlanılmaktadır (Toptaş, 1993).

Samada kullanılan ticari enzimlerin deriyi enfekte eden mikroorganizmaların faaliyetini arttırdığı görülmüştür. Ticari sama enzim preparatları doğal olarak



mikroorganizma içermez fakat depolamada ve kullanımda enfekte olabilir. 1–2 saat olan sama süresince bakteriyal etkileşim tehlikesi az olmasına karşın, uzun süren sama işlemlerinde bakteriyal gelişim tehlikesi olabilir (Karaboz, 1994).

Nitekim sama süresinin uzaması durumunda çoğu bakteri ve özellikle proteolitikler için pH zaten uygundur, ayrıca sama sıvısında yüzen deri parçaları ve parçalanmış proteinler, bakteriyal büyümeyi daha da teşvik ederek, enzimlerin derinin yapısına olan etkisini daha da arttırmaları. Sama sıcaklığı ve süresi arttıkça, bakteriyal etkileşim artmaktadır. Çeşitli sama enzim preparatları için önerilen sıcaklıklar çoğu bakteriler için uygundur. Bu nedenle sıcaklığı fazla arttırmak tehlikeli olabilir. Sama sıvısı tekrar kullanılacaksa, yenisi ile karıştırılarak kullanılır. Ancak böyle sama sıvıları bakterilerce bulaşık olur (Karaboz, 1994).

Asidik samada *Bacillus subtilis* veya *Bacillus megaterium* enfeksiyonu gerçekleşebilir. Bu durum deri üzerinde tabaklamadan sonra bile kalan leke oluşumlarına, kıl-köklerinin kaygan bir tabakayla kaplanmasına ve derinin matlaşmasına yol açmaktadır (Karaboz, 1994).

Line (1948), çalışmasında kullanılmış sama sıvılarındaki çoğu mikroorganizmanın jelatini sıvılaştırabildiğini ve bunlardan bazılarının tola (kireçlikten çıkmış, etlemesi yapılmış deri) üzerinde gelişmesi ile koyu lekeler neden olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacı aynı çalışmasında kullanılmış sama sıvısındaki bakteri sayısının  $1 \times 10^8$ - $1,5 \times 10^9$  kob/mL kadar yüksek olabileceğini ortaya koymuştur. Diğer yandan Orlita (1968), tabakhanedeki mikroorganizmalar üzerine yaptığı çalışmada sama işlemi sonunda ilk günde  $1,0 \times 10^2$  spor/mL sayıda sporlu bakteri tespit etmiştir.

Tabaklama öncesi işlemler de bakteri ve fungus sayısının belirlenmesi üzerine yapılan araştırmada kireç giderme ve sama işlemi sonunda tuz içermeyen besiyerinde toplam aerobik mezofil bakteri sayısı  $2,3 \times 10^3$  kob/mL, aerob spor sayısı  $1,2 \times 10^2$  spor/mL, proteolitik bakteri  $2,9 \times 10^3$  kob/mL ve lipolitik bakteri sayısı  $2,8 \times 10^4$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. % 5 tuz konsantrasyonunda yapılan sayımlarda toplam aerobik mezofil bakteri sayısı  $3,0 \times 10^3$  kob/mL, aerob spor sayısı  $5,0 \times 10^1$  spor/mL, proteolitik bakteri sayısı  $3,5 \times 10^3$  kob/mL ve lipolitik bakteri sayısı  $1,5 \times 10^4$  kob/mL olarak belirlenmiştir. %10 tuz konsantrasyonunda ise toplam aerobik mezofil bakteri sayısı  $1,6 \times 10^3$  kob/mL, aerob spor sayısı  $2,2 \times 10^2$  spor/mL, proteolitik bakteri sayısı  $3,0 \times 10^3$  kob/mL ve lipolitik bakteri sayısı  $2,2 \times 10^2$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kireçlik basamağı sonunda oldukça azalan bakteri sayısının kireç giderme-sama basamağında dikkate değer ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada kireçlik basamağında üreme göstermeyen lipolitik bakterilerin

kireç giderme-samada tekrar gelişim gösterdikleri bildirilmiştir. Bir önceki basamakta üreme göstermeyen bakterilerin daha sonraki basamakta belirli düzeyde üreme göstermesi ortam koşullarının mikroorganizma lehine değiştiğini göstermiştir (Bilgi, 2007).

Nitekim kireç giderme-sama işlemi sonunda yapılan mikrobiyolojik inceleme sonucunda tüm gruplarda üreme kaydedilmiş olması ve bakterisidsiz işlenen derilerde bu sayının daha yüksek bulunması bu basamakta mikroorganizma kontrolünün elden bırakılmaması gerektiğini ortaya koymuştur (Bilgi, 2007).

### **2.6. Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları**

Mikroorganizmalar, yaşamlarını sürdürebilmek için çevresel şartlara adaptasyonlarını sağlayan çeşitli enzimlere sahiplerdir. Mikrobiyal enzimler özel mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilirler (Tatar, 2007; Çoşkun, 2010).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik olması, stabiliteye sahip olması, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilibilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999; Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003; Çoşkun, 2010).

Endüstriyel enzim pazarının büyük bir kısmını proteaz, amilaz, amidaz, esteraz ve lipaz gibi hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında kullanılan tüm enzimler içerisinde alkali proteazların % 25, diğer proteazların % 21, amilazların %18, reninin % 10, tripsinin % 3, lipazın % 3 ve diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimlerin ise % 10 oranında kullanıldığı görülmektedir (Rao ve ark., 1998; Kıran ve Çölekçioğlu, 2003; Fukara, 2007).

Günümüzde endüstriyel enzimlerin çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmakta ve bir çok avantaja sahip olmalarına karşın, bazı proseslerdeki ekstrem koşullara dayanıksız olmaları nedeni ile kullanımları sınırlı kalmaktadır. Ekstremofil mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) ekstrem koşullara daha dayanıklı olduklarından, son 20 yılda ekstremofil ve ekstremozimlere olan ilgi artmış ve ekstremozimler endüstriyel biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Fukara, 2007; Gheorghiu Alpan, 2008).

Ekstremofilik mikroorganizmalar ekstrem ortamlarda yaşayan organizmalar olup termofilik, asidofilik, halofilik, alkalifilik ve psikrofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılırlar. Ekstremofilik enzimler ise sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluk gibi ekstrem şartlarda çalışabilen ve endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahip enzimlerdir (Horikoshi,1999). Yapılan son araştırmalar, endüstriyel uygulamalar için kullanılacak ekstremozimler üzerine yoğunlaşmıştır.

Diğer yandan gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimlerin çeşitli endüstri kollarında kullanımı, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel enzimler ülkemizde en çok tekstil ve deterjan sanayiinde kullanılmakta olup, bunu gıda ve deri endüstrisi izlemektedir (Bal, 2005). Bu durum endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir (Anvar ve Saleemuddin, 1998; Niehaus ve ark., 1999).

### **2.7. Alkalifilik Mikroorganizmalar ve Fizyolojik Özellikleri**

Ekstrem çevre koşullarındaki özel koşullara adapte olarak populasyon oluşturan mikroorganizmalar, yaşayabildikleri bu koşullara göre alkalifiller, halofiller, termofiller ve asidofiller olarak adlandırılmaktadır. Mikroorganizmaların çoğu nötral veya buna yakın pH değerlerinde yaşarlar. Alkalifilik mikroorganizmalar yüksek alkali çevrelerde yaşayan farklı bir gruptur. Alkalifilik mikroorganizmalar gelişebilmek için pH 9.0 veya daha yüksek alkali koşullara gereksinim duyar ve genellikle optimum pH 10.0'da gelişebilmektedirler. Alkalifiller esas olarak nötral pH'ya sahip çevre koşullarından, bazen de asidik toprak örneklerinden ve dışkıdan izole edilmektedir (Horikoshi, 1999).

Doğada ekstrem çevrelerde alkalifilik mikroorganizmalar, nütrofilik mikroorganizmalar ile bir arada bulunurlar. Alkali çevreler, sodalı göller ve çöller, tuz gölleri ya da fazla miktarda karbonat içeren topraklar olmak üzere oldukça bazik habitatlardır (Horikoshi, 1999; Ulukanlı ve Dığrak, 2001). Bu nedenle alkalifil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bazik (alkali) olması gerekir. Sodyum karbonat, pH'nın 10 civarlarına ayarlanması için kullanılır. Çünkü alkalifiller çok düşük miktarlarda da olsa sodyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Horikoshi, 1999).

Bazı nütrofilik organizmalar ekstrem pH koşullarında gelişme gösterebilmektedir. Bunun nedeni olumsuz koşullarda hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için membran özelliklerini ve taşıma mekanizmalarını değiştirerek özel fizyolojik ve metabolik sistemlere adapte olmalarıdır. Alkalifilik mikroorganizmalar yüksek alkaline koşullarda

gelişebilen farklı bir grup oluşturmaktadır. Buna ilaveten alkalifiller ve alkalotolerantlar olmak üzere iki geniş gruba ayrılırlar. Alkalifil terimi optimum olarak pH 9.0'da gelişen ancak pH 7.0'nin altında ve pH 10.0'un üzerindeki pH koşullarında da gelişebilen organizmalar için kullanılmaktadır. Diğer yandan alkalotolerant organizmalar pH 10.0 üzerindeki pH değerlerinde gelişim gösterebilirken optimum gelişim aralığı nötrale yakındır. Ekstrem alkalifiller fakültatif ve obligat alkalifiller olmak üzere iki alt gruba daha ayrılır. Fakültatif alkalifiller optimal pH 10.0'da ve üzerindeki pH koşullarında gelişim gösterirken nötral koşullarda da gelişebilmektedirler ancak obligat alkalifiller nötral koşullarda gelişim gösterememektedirler (Kumar and Takagi 1999).

Birçok alkalifil, nötrofilik mikroorganizmaların aksine pH 10.0 civarında optimum gelişme göstermektedir. Bu durumda alkalifilik mikroorganizmaların ekstrem pH koşullarında gelişim gösterebilmeleri nötrofilik mikroorganizmalarla aralarında fizyolojik ve yapısal farklılık olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Hücre içi enzimlerin optimum pH'sına göre mikroorganizmaların sitoplazmik pH'sı tahmin edilebilmektedir. Örneğin alkalifilik bir mikroorganizma olan *Micrococcus* sp. 31- suşuna ait  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi katalitik aktivitesinin optimum pH 7.5'da gerçekleştirmektedir bu da hücre içi pH'nın nötral olduğunu göstermektedir (Horikoshi, 1999).

Hücre içi pH'yı tahmin etmedeki bir diğer yöntem aktif olarak hücre tarafından taşınmayan zayıf bazların hücre içindeki ve dışındaki dağılımını belirlemektedir. Hücre içinin nötral hücre dışı ortamın alkalifilik olması, alkalifilikteki anahtar özelliğin hücre yüzeyiyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Alkalifilik *Bacillus* cinslerinin protoplastı, alkalın çevre koşullarında stabilitesini kaybettiği zaman hücreyi alkalın koşullarda korumakta anahtar rolü hücre duvarının oynadığı düşünülmüştür. Birçok alkalifilik *Bacillus* spp.'nin hücre duvarı bileşenleri nötrofilik *Bacillus subtilis* ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Ayrıca *Bacillus* spp. Hücre duvarları peptidoglikan tabakasına ilaveten galakturonik asit, glukonik asit, glutamik asit, aspartik asit ve fosforik asit gibi asidik polimerleri içerdiği belirlenmiştir. Peptidoglikan tabakaya ait olmayan bu negatif yüklü asidik bileşenlerin, hücre yüzeyinden sodyum ve hidronyum iyonlarının absorbe ederek hidroksil iyonlarını uzaklaştırma yeteneğini sağlayarak alkalın koşullarda gelişmeye yardım ettiği düşünülmektedir (Horikoshi, 1999).

## **2.8. Alkalifilik Enzimler ve Kullanım Alanları**

Alkalifilik özellikteki organizmalar, prokaryot, eukaryot ve archea grubu içerisinde yer almaktadırlar. Alkalifiller arasında çok değişik taksonomik gruplar olmakla birlikte,

bunların bazıları taksonomiye yeni girmişlerdir. Alkalifiller, bahçe toprağı gibi normal çevresel ortamlardan izole edilebileceğı gibi, yüksek alkalik özellik gösteren topraklardan da izole edilebilirler. Alkalifilik enzimler endüstriyel uygulamalarda büyük öneme sahiptirler. Alkali selülaz, alkali proteaz ve alkali amilaz gibi alkalifilik organizmalardan izole edilen enzimler, çeşitli deterjanların içerisine karıştırılmışlar ve biyolojik deterjanlar şeklinde tanımlanmışlardır. Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin % 30 dan büyük kısmı çamaşır deterjanları içerisine karıştırılarak değerlendirilmektedir. (Horikoshi, 1996).

Alkalifilik amilaz, selülaz ve proteazlar aynı zamanda endüstrinin diğer birçok alanında da yoğun şekilde değerlendirilmektedirler. Bunlar arasında dericilik, tekstil, gıda endüstrisi, içecek endüstrisi, ekmek ve pasta ürünleri, çeşitli soya ürünlerinin üretimi, protein hidrolizatlarının tatlandırılması, farmasötik endüstrisi ve tıbbi uygulamalar, kimya endüstrisi, atıkların temizlenmesi, nişastadan etanol üretimi gibi kendi içlerinde birer endüstri olan çok değişik alanlar vardır (Rao ve ark., 1998; Igarashi ve ark., 1998; Kumar ve Takagi, 1999; Aygan, 2008).

### **2.8.1. Proteazlar**

Proteazlar (EC 3,4), doğada çok çeşitli olarak bulunan proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizleyen enzim grubudur. Proteazlar bütün canlı organizmalarda bulunan, hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan enzimlerdendir. Proteinlerin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptirler. Bu enzimler, çok çeşitli olmalarının yanında metabolizma, gen ekspresyonunun regülasyonu, patojenite ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizi ve bunun gibi biyolojik olaylarda önemli görevler yapmaktadır. Son on yılda gıda, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisinde protein bazlı boyaların uzaklaştırılmasında alkalen proteaz uygulamaları çok hızlı bir şekilde artmıştır.

Dünya genelinde enzim satışlarının % 60'ını oluşturan bakteriyel proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük sınıflarından biri haline gelmiştir. Geniş biyokimyasal çeşitlilikleri, mikroorganizmaların hızlı gelişmeleri, hücre kültürleri için limitli alanların yeterli olması ve genetik manipülasyonlarla yeni enzimlerin meydana getirilmesini sağladığı için mikrobiyal proteazlar enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir.

Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenirler. Hücre içi proteazlar sporulasyon, farklılaşma, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücrenel ve metabolik olaylarda görev yapmaktadır. Hücre dışı proteazların hücre dışı koşullarda hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına

imkan sağlamak gibi rolleri vardır. Aynı zamanda protein parçalanmasını temel alan birçok ticari alanda da kullanılmaktadırlar.

Proteazlar protein substratları üzerine etki mekanizmalarına göre endo ve ekzoenzimler olmak üzere iki geniş sınıf oluştururlar. Endoenzimler serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere kategorize edilirler. Optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerine göre nötral, asidik ve alkalin proteazlar olmak üzere ayrılırlar. Proteazlar içerisinde alkali koşullarda en iyi aktivite gösteren enzim sınıfı serin proteazlardır. (Rao ve ark., 1998).

Mikrobiyal proteazlar geniş pH aralıklarında aktivite gösterdikleri için asidik, nötral ve alkali olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Proteaz enzimi üretimi birçok bakteri ve mantarda türünde oldukça yaygındır. Bununla birlikte *Bacillus* cinsinde yer alan çeşitli suşlar enzim endüstrisinde çok önemli bir yere sahiptirler (Fogarty ve Kelly, 1979; Tatar, 2007).

Bakteriyal nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında aktivite göstermektedir ve nispeten termal stabiliteyi düşüktür. Bakteriyal nötral proteazların en karakteristik özelliği, hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afinite göstermeleridir. Termotoleranslarının az olması nedeni ile düşük sıcaklık hidrolizi ile gıda hidrolizatlarının üretiminde avantaj sağlamaktadır. Bakteriyal alkalin proteazlar ise pH 10.0 gibi alkalin koşullarda yüksek aktivite göstermeleri ve geniş substrat spesifikliği göstermeleriyle karakterize edilirler. Optimal sıcaklıkları 60°C civarındadır. Bakteriyel alkalin proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi için uygun kılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

Alkalin proteazlar yüksek pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimlerdir. Uygulama alanları gıda ve besin endüstrisi, peptid sentezi, deri endüstrisi, endüstriyel ve evsel atıkların giderilmesi, fotoğraf endüstrisi, medikal alanlar, ipek işlenmesi ve en çok talep gördüğü deterjan endüstrisidir. Ayrıca alkalin proteazlar tüy, deri ve boynuzların kullanılabilir biokütleyle çevrilmesi amacı ile fibröz proteinlerin hidrolizlenmesinde de kullanılmaktadır (Kazan ve ark., 2005). Proteaz enzimi, ülkemizde tekstil, deri ve deterjan sanayiinde en sık kullanılan enzimlerin başında gelmektedir.

Alkalin proteazların optimum pH aralığı genellikle pH 9.0-11.0'dir. Çok yaygın olmasa da pH 11.0'in üzerindeki koşullarda aktivite gösteren alkalin proteazlar bulunmaktadır. Bu enzimlerin izoelektrik noktaları da oldukça yüksektir ve genellikle pH 6.0-12.0 aralığında stabildirler. Alkalin proteazların optimum sıcaklıkları 50-70°C aralığındadır (Kumar ve Takagi, 1999).

Alkalen proteazlar yüksek gıda değerine sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Protein hidrolizatları kan basıncının düzenlenmesinde, bebek mamalarının formüllerinde, spesifik terapi diyet ürünlerinde ve meyve suları ve bazı içeceklerin raf ömürlerinin artırılmasında da kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2002a).

Alkalen proteaz sınıfının ticari başarısı araştırmacıları pH ve sıcaklık kinetiği yönünden, protein mühendisliği teknikleri ve kimyasal modifikasyonlarla aktif bölgedeki amino asit köklerinin belirlenmesi ve X-ışını kristallografisi yöntemleri ile daha sağlam yeni enzimlerin araştırılmasına yönlendirmiştir. Gelecekte protein mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi ile alkalen proteazların birçok yeni özelliği ortaya çıkacaktır. Birçok endüstride alkalen proteazlar önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin potansiyelleri kullanım alanlarından daha fazladır ve gelecekte kullanım alanları daha da artması beklenmektedir (Gupta ve ark., 2002b).

Alkalen proteazların organik çözücüler varlığında doğal olarak stabil olmaları ve sentetik reaksiyonlarda kullanılabilmesi nedeni ile özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden üretimi deterjan endüstrisi için ilgi gören bir diğer konudur.

Bakteriyel alkalen proteazlar geniş substrat spesifitesi ve alkalen pH'daki yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve pH 10'dur. Bu özellikleri nedeni ile deterjan endüstrisinde genellikle bakteriyel alkalen proteazlar kullanılmaktadır. Bakterilerden özellikle yüksek sıcaklık ve pH' larda büyüyen bir *Bacillus* soyu tarafından üretilen proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama olanağını vermektedir. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi *Bacillus* soylarının taranmasına, izolasyon ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Fritze ve ark., 1990, Nielsen ve ark., 1995, Takami ve Krulwich, 2000; Bal, 2005).

### **2.8.2. Amilazlar**

Amilazlar bilinen en önemli ve eski endüstriyel enzimlerdir. Amilazlar, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize ederek glikoz, maltoz, maltotrioz ve  $\alpha$ -limit dekstrinlerin oluşmasını sağlayan ekstraselüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, uygun koşullarda kısa sürede elde edilmesinden dolayı asıl kaynağı mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bu enzimler günümüzde büyük bir öneme sahiptirler ve gıda, fermentasyon, tekstil ve kağıt v.b endüstrilerinde kullanılmaktadırlar. Endüstriyel alanda kullanılan amilazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olmakla

birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedirler (Wiseman, 1987; Fukara, 2007; Tatar, 2007).

Amilazlar, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılabilirler, endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını rastgele noktalardan parçalar ve değişik zincir uzunluğunda düz ve dallanmış oligosakkaritleri oluştururlar. Ekzoamilazlar, ise, nişasta molekülünü indirgen olmayan ucundan parçalarlar ( Gupta ve ark., 2003).

Amilazlar, asidik ve bazik koşullarda etki etmelerine göre asidik ve bazik karakterli olabilmekte, bunlardan bazik pH'da aktivite gösterenler deterjan endüstrisinde önem kazanmaktadır. Bazı basillerin pH 10 veya daha yukarısında aktivite gösteren  $\alpha$ -amilazları olduğu belirtilmiştir (Gupta ve ark., 2003; Fukara, 2007).

Nişasta, birçok glikoz molekülünün çeşitli şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Tatar, 2007).

Mikrobiyal enzimler arasında en yaygın olarak kullanılanlar  $\alpha$ -amilaz, glikoamilaz, glikoizomeraz ve proteazlardır.  $\alpha$ -amilaz enzimi gıda endüstrisinin farklı alanlarında, meyve suyu endüstrisinde, deterjan üretiminde, eczacılıkta ve tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

$\alpha$ -Amilazlar fungus, maya ve bakterilerden elde edilirler.  $\alpha$ -Amilazlar birçok aktinomiset bakteri, maya ve funguslardan elde edilmesine rağmen, fungal ve özellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilen enzimlerin, endüstriyel sektörlerde kullanımı daha yaygındır (Uçar, 2011).

$\alpha$ -amilaz enzimi son yıllarda özellikle kuru temizleme gibi yeni alanlarda da giderek artan şekilde kullanım alanı bulmuştur. Nötrofilik özelliğe sahip amilaz enzimleri genel olarak pH 5-7.5 aralığında aktivite gösterirken, özellikle deterjan sanayisinde kullanılan alkali amilaz enzimleri pH 8-11 aralığında aktivite göstermekte olup, alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler (Igarashi ve ark., 1998; Uhlig, 1998; Tatar, 2008).

Amilazlar ayrıca tekstil, gıda, içki, kağıt ve bira v.d. endüstrilerde yaygın olarak kullanıldığı gibi klinik, medikal ve analitik kimya alanlarında da kullanılmaktadırlar (Pandey ve ark., 2000; Fukara, 2007).

Biyoteknolojik öneme sahip  $\alpha$ -amilaz enzimi *Bacillus sp.* grubunda oldukça yaygın bir şekilde bulunur. Bu enzim ekmek ve pastacılık, bira, peynir gibi gıda endüstrilerinde ,nişastanın maltoza hidroliz edilmesi, maltoz şuruplarının eldesi ,otomatik çamaşır ve



bulaşık makinesinde kullanılan deterjanlarının üretiminde kullanılmaktadırlar (Igarashi ve ark., 1998 ).

Nitekim Igarashi ve ark (1998), alkalifilik Bacillus kültürlerinden alkali izoamilaz, alkali rezistant neopullulanaz ve yüksek alkali pullulanaz gibi bazı tek dallı enzimleri karakterize etmişlerdir. Bu enzimlerin alkali koşullarda  $\alpha$ -amilazlarla birlikte çamaşır ve bulaşık deterjan sanayinde etkili olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

### **2.8.3. Lipazlar**

Lipazlar (triacil gliserol açıl hidrolazlar) birçok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahiptirler. Lipazlar esteraz enzimlerinin özel bir sınıfıdır ve yağlar üzerine etkilidir. Yağları hidrolize ederek onları gliserol ve yağ asitlerine parçalarlar. Esterazların aksine lipazlar sadece su/yağ ara yüzeylerinde aktivasyon gösterirler. Lipazlar aktif bölgelerinde serin yer aldığı için serin hidrolazlar olarak adlandırılmaktadır (Saxena ve ark., 1999).

Lipazlar, gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eden enzimler olarak tanımlanır. Ester hidrolizi gerçekleştiren diğer bir enzim grubu da esterazdır. Esterazlar, çözünmeyen konsantrasyonlarında etkin değildirler. Esterazlarla karşılaştırıldıklarında lipazlar çok farklı substrata etki etmelerinin yanında aktiviteleri substrat konsantrasyonu ile değil substrat yüzeyi ile ilişkilidir. Lipazlar ve esterazlar oldukça geniş substrat spesifikliğı gösterirler, bu nedenle fonksiyonları göz önüne alınarak sınıflandırılmazlar. Esterazlar için optimum pH 5,5-6,5 iken, lipazlar için pH 8,0-9,0 civarındadır (Kaytankaş, 2006).

Lipazlar kullandıkları substratların fazla olması, ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi) kararlı yapılarını koruyabilmeleri gibi başlıca nedenlerle en önemli biyokatalizörler olarak varsayılır. Son on yıl içerisinde özellikle organik sentezler başta olmak üzere lipazlar, proteaz ve amilazlar kadar önem kazanmıştır (Saxena ve ark., 1999).

Son zamanlarda lipazlar (triacil gliserol açilhidrolaz E.C.3.1.1.3) gıda teknolojisi, deterjan, kimya sanayi ve biyomedikal bilimler gibi endüstriyel uygulamalarda geniş bir yelpazede kullanılması ve çok yönlü özelliklerinden dolayı biyoteknolojide artarak büyüyen anahtar enzim olarak ortaya çıkmaktadır (Jaeger ve ark., 1999; Gupta ve ark., 2004, Bilgi, 2012).

Lipaz enziminin çeşitli fermantasyon basamaklarında görev alması nedeniyle özellikle islenmiş et ürünleri (sucuk, sosis vb.) üretiminde ve peynir başta olmak üzere çeşitli gıdalarda aroma zenginleştirme amacıyla kullanımı gelişmektedir (Sharma ve ark., 2001; Hasan ve ark., 2006).

Ticari kullanımlı lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden elde edilir. Birçok lipaz esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları katalizler. Hidrolitik lipazların başlıca ticari kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz satışının % 32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2001).

Endüstriyel lipaz kullanımları içerisinde en önemli pay kuşkusuz hidrolitik lipazlara aittir. Son zamanlarda, farklı kullanım amaçlı (endüstriyel kullanım, ev içi kullanımlar, çamasır, bulasık, toz temizleyiciler vb.) deterjanlarda temizleme gücü artırımı hedeflenerek enzim katkıları kullanılmaya başlanmıştır. Deterjanlara ilave edilen başlıca enzimler; proteazlar, amilazlar, selülazlar ve lipazlardır. Yağları hidrolize etme yetenekleri ile lipazlar deterjanların önemli katkı maddelerinden biridir (Sharma ve ark., 2001).

Mikrobiyal lipazlar, bitki ve hayvan kaynaklı lipazlara göre çok geniş uygulama alanına sahiptir. Bunun sebebi, mikroorganizmaların kolay ve hızlı çoğalabilmeleri ve ayrıca lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Lipazlar, gıda ve süt ürünleri (peynir olgunlaştırma, aroma geliştirme, EMC teknolojisi), deterjan, ilaç sanayisi (naproxen, ibuprofen), tarımla ilgili kimyasal madde (insektisit, pestisit), ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır. Lipazlar, potansiyel biyokatalizör olarak kullanıldıkları daha birçok yeni alanda başarıyla görev almaktadırlar (Sharma ve ark., 2001).

### **2.9. Deri Endüstrisinde Kullanılan Enzimler**

Deri teknolojisinde mikroorganizmaların olumsuz etkilerinin yanı sıra, mikroorganizma ve enzimlerinden (proteinaz, kollegenaz, keratinaazlar, amilazlar ve lipazlar) yumuşatma, kıl giderme ve sama gibi deri işlem basamaklarında olumlu yönde de yararlanılmaktadır.

Deri endüstrisinde işleme; ıslatma, kıl giderme, sama ve tabaklama gibi çeşitli aşamalar içermektedir. Protein yapıda oluşları deri ve kıllar için en önemli yapısal problemdir. Deri işlenmesinin geleneksel metotları sodyum sülfat gibi kirlilik ve atık problemlerine sebep olan zehirli kimyasallar içerir. Kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanılmasının deri kalitesinin geliştirilmesinde ve çevresel kirliliğin azaltılmasında başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Rao ve ark., 1998).

Deri işlenmesinde kullanılan hidrojen sülfid ve diğer kimyasallar güvenlik ve çevre açısından oldukça tehlikelidir. Çevresel nedenlerden dolayı kolay kontrolü, hızlı olması,

atıkların uzaklaştırılması nedeni ile deri işlenmesinde enzimatik yöntemler tercih edilmektedir (Andersen, 1998). Deri endüstrisinde enzim kullanımı ile hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu süreç, geleneksel olarak kullanılan, derilerin kireç ve sodyum sülfid ile işlenmesinin yerini almaktadır. Ayrıca kimyasalların kullanıldığı klasik yöntem pahalı ve çevreye zararlı olduğundan, günümüzde deri sanayinde enzimlerin kullanılması tercih edilmektedir. Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkali proteazlar daha kaliteli deri üretimine olanak sağlamaktadır. Bu uygulamada, deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı bir deri yüzeyinin elde edilmesi sağlanmaktadır (Anwar ve Saleemuddin, 1998; Gheorghiu Alpan, 2008).

Elastolitik ve keratinolitik aktiviteleri sayesinde alkalin proteazlar deri işleme endüstrisinde kullanılabilir. Proteazlar derinin ıslatılması, kılların uzaklaştırılması ve derinin inceltmesi aşamalarında kullanılabilirler. Enzim uygulaması ile istenmeyen pigmentlerin uzaklaştırılarak deri yüzeyini genişletmektedir. Deriden kılların uzaklaştırılması aşamasında, kıl köklerinin şişmesiyle oluşan alkali koşullarda alkalin proteazlar kıl foliküllerindeki proteinlerine etki ederek kolay ve hızlı bir şekilde kılların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. *Bacillus subtilis* IIQDB32 alkalin proteazı ile koyun derisindeki kılların uzaklaştırılabileceği ifade edilmiştir (Gupta ve ark., 2002a).

Islatmanın amacı derinin şişmesini sağlamaktır. Geleneksel olarak bu basamak alkali koşullarda uygulanır. Mevcut durumda mikrobiyal alkalin proteazlar suyun daha hızlı absorpsiyonunda ve ıslatma süresinin kısaltılmasında kullanılmaktadır. İyonik olmayan ve bir ölçüde iyonik sülfektanaların kullanımı enzimlerin kullanımıyla uyum göstermektedir. Geleneksel kıl ve yün giderimi kıl köklerindeki çözünür proteinlere sülfid uygulanmasıyla aşırı alkali ortamda gerçekleştirilir (Rao ve ark., 1998).

Proteazlar derinin kollajen içermeyen yapılarının seçici hidrolizinde, albuminler ve globulinler gibi fibriller olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

Deri sanayisinde en zorunlu operasyon derinin kıllarından arındırılmasıdır. Bu işlemin kimyasal maddeler ile yapılması ciddi anlamda kirlenmeye ve işçilerde sağlık sorununa neden olmaktadır. Buna karşılık derinin kıllarından arındırılmasında proteazların kullanılması kirlenmeyi ve sağlık sorunlarını azaltmaktadır (Nilegaonkar ve ark., 2007).

Günümüzde sulu kireç ve sodyum klorid ile alkalin proteazlar kıl gidermede kullanılmaktadır ve bu durum atık su miktarında önemli bir düşüşle sonuçlanmaktadır (Rao

ve ark., 1998). George ve ark. (1995), *Aspergillus flavus*, *Streptomyces sp.*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* türlerinden izole ettikleri elastolitik ve keratinolitik aktiviteye sahip alkalın proteazları derilerin bio-işlenmesinde; kıl giderme ve sama uygulamalarında kullanmışlardır.

Alkalifilik enzimlerin başlıca uygulama alanı deterjan endüstrisidir. Ayrıca deri işletmeciliğinde, tabaklama uygulamaları ile derideki kılların uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadırlar (Horikoshi, 1999). Deri endüstrisinde hayvan postlarından kılların uzaklaştırılmasında kullanılan *Bacillus cereus* MCM B-326'dan elde edilen proteazın, pH 6.0-12.0 aralığında aktif olduğu optimum pH 9.0 değerinde aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Sarnaik ve ark., 2006).

Kıl gidermede, *Bacillus subtilis* türünden elde edilen alkali proteaz ile birlikte keçi derisinin iki üç saatlik inkübasyonu sonucu, kılların deriden kolayca uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir (Ramakrishna ve ark, 2010).

Enzimlerin kullanımıyla yağ giderme etkinliğinin artırılması üzerine yapılan bir araştırma sonucuna göre, kireçlik işleminde % 0,2 oranında alkali proteaz kullanımının en etkin sonucu verdiği ortaya çıkmıştır. % 0,1 alkaliproteaz da benzer sonucu vermekte ve uygulama için daha ekonomik kullanım sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, ıslatmada % 0,5 alkali proteaz, kireçlikte % 0,5 alkali lipaz ve alkali proteaz/lipaz kombinasyonları ile pikle derilerde % 0,025 ve 0,5 asit lipaz kullanımlarının yağ gidermede etkili olduğu saptanmıştır (Afşar ve Çetinkaya, 2008).

### **2.10. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Özellikleri ve Enzimleri**

*Bacillus* cinsinin üyeleri mezofiller ve ekstremofilleri içeren endospor formundaki gram-pozitif bakterilerdir. *Bacillus* türleri toprak ve bununla ilişkili nehirler, nehir ağzları ve kıyı suları gibi su kaynakları ve bitkileri de içeren ortamlarda en fazla yayılış gösteren mikroorganizmalardır (John, 2009). *Bacillus* cinsi, aerobik, bazen fakültatif anaerobiktir ve katalaz pozitifdir (Claus ve Berkeley, 1986). Tek ya da çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, türler arasında farklılık gösterir. Sporlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporun hücre üzerindeki konumu ise merkezde, merkeze yakın veya uçta bulunabilir (Prescott ve ark., 2002). Birçok türü hayvan ve insanlara karşı zararsız olup sadece birkaç patojen tür belirlenmiştir. Bu cinsin üyeleri olağandışı metabolik farklılık ve yaşam şekilleri gösterirler ve termofilleri, alkalifiller ve asidofilleri içerirler (Pandey, 2006).

Optimum büyüme sıcaklıkları 25 °C ile 37 °C' de arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri 75 °C' den daha yüksek ve 3°C' den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri pH 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilirler (Sneath, 1986; Öztürk, 2007).

*Bacillus* türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besiyerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah v.b pigmentler üretebilirler (Sneath, 1986; Rosovitz ve ark., 1998; Öztürk, 2007).

*Bacillus* cinsi bakteriler zor koşullarda spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkalın veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Claus and Berkeley; 1986).

Pek çok çalışmada kullanılan *Bacillus* türleri ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptir. Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri sayesinde besin endüstrisinde de önem taşımaktadır (Rosovitz ve ark., 1998; Öztürk, 2007).

*Bacillus* türleri, endüstriyel önemi büyük olan ekstraselüler amilaz ve proteaz enzimlerini üretirler (Morgan ve Priest, 1981). *Bacillus* cinsine ait türler alkalın proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir ve özellikle deterjan endüstrisi için *Bacillus* cinsi bakterilerden alkalın proteaz üretimi ilgi gören bir konudur (Tekin, 2008). Diğer bir biyoteknolojik öneme sahip enzim  $\alpha$ -amilaz olup *Bacillus* sp. grubunda oldukça yaygın bir şekilde bulunur. Bu enzimler ekmek ve pastacılık, bira, peynir gibi gıda endüstrilerinde; otomatik çamaşır ve bulaşık makinesinde kullanılan deterjanların üretiminde kullanılmaktadırlar (Igarashi ve ark., 1998 ).

Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilmektedir. Alkalın proteaz üreticisi *Bacillus* türleri; *Bacillus alcalophilus* ATCC 21522, *B. alcalophilus*, *B.alcalophilus* subsp. *halodurans* KP1239, *B. amyloliquefaciens*, *B.circulans*, *B.coagulans*, *B.firmus*, *B.intermedius*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. proteolitycus*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *Amylosacchariticus*, *B. thrungiensis*, *Bacillus* sp. Ya-B, *Bacillus* sp. NKS-21, *Bacillus* sp. B21-2, *Bacillus* sp. Y, *Bacillus* sp. CW-1121, *Bacillus* sp. KSM-K16, *Bacillus* sp. MK5-6 olarak bildirilmiştir (Kumar ve Takagi, 1999).

Alkalifilik mikroorganizmalar içerisinde proteaz aktivitesi *Bacillus* genusu üyeleri içerisinde yaygın olarak bulunmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999). *Bacillus* cinsine ait

türler alkalen proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cinse ait en çok tercih edilen türler *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis*'tir. Bu nedenle, alkalifilik *Bacillus* soyları hem akademik hem de endüstriyel açıdan ilginç ve çok önemlidir.

Anonim (1988) göre,  $\alpha$ -amilaz enzimi endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya'da üretilmiştir. 1970 yılında *B.subtilis* ve *B.licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmıştır (Tatar, 2008).

Igarashi ve ark (1998), alkalifilik *Bacillus* türlerinden alkali izoamilaz, alkali dirençli neopullulanaz ve yüksek alkali pullulanaz gibi bazı enzimleri karakterize etmişler ve bunların alkali koşullarda alfa-amilazlar ile birlikte çamaşır ve bulaşık deterjan sanayinde etkili olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Ayrıca izolasyonunu yaptıkları amilazın maksimum aktivitesinin pH 8.0-8.5 civarında olduğunu gözlemlemişlerdir.

Alkalin  $\alpha$ -amilaz'ın bileşiminden ağır deterjanlar ile otomatik makine deterjanlarında yararlanır. Deterjanların etkisini gösterdiği pH aralığı 8-11'dir. Sıvılaştırıcı  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin çoğu *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciense*'den üretilmektedir.  $\alpha$ -amilaz enzimlerinden, kumaş ve fayanslarda nişasta lekeleri gibi kirlerin çıkarılmasında faydalanılır. Nişastanın çözünürlüğü yüksek derecede sıcaklığa bağlıdır (Nielsen ve Borchert, 2000; Çoşkun, 2010).

Ertuğrul ve ark. (2007), lipaz enzimi üretebilen *Bacillus* türlerini taramışlar ve lipaz aktivitesi üzerine, pH, sıcaklık ve ortam bileşenleri gibi birçok parametrenin etkilerini incelemişlerdir.

*Bacillus* cinsi bakterilerin tanımlanmalarında klasik biyokimyasal ve fizyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bazı suşların bu testlerle kesin olarak tanımlanması mümkün olamamaktadır. Özellikle de *B. thuringiensis*, *B. anthracis* ve *B. mycoides*' in yer aldığı *B. cereus* grubu bakterilerin sınıflandırılmaları tartışmalıdır. Çeşitli araştırmacılar birbirine yakın olan bu türlerin *B. cereus*' un üyesi olarak gruplandırılabilceğini ileri sürmüşlerdir (Chang ve ark., 2003) .

Barrow ve Feltham (1993) göre, günümüzde, API ve VITEK teknikleri kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir. Bu sistemlerin temeli, sistemde kayıtlı referans organizmalar ile doğal organizmanın biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

Barrow ve Feltham (1993) göre, *Bacillus*'ların teşhisinde kullanılabilen bir diğer uygulama ise yağ asiti kompozisyonu temeline dayalı tanımlama sistemleridir. Bu yöntem,

hücrel yağ asitleri metil-esterlerinin (FAME) Gaz-Chromatografisi (GC) ile analizi ve referans değerler ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır (Aygan, 2008).

Barrow ve Feltham (1993) göre, belirtilen yöntemlerin yanısıra günümüzde, moleküler tanılama şeklinde de adlandırılan ve 16S rRNA/DNA sekans analizi esas alınarak gerçekleştirilen ileri tanımlama yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu teknik ağırlıklı olarak filogenik çalışmalarda tercih edilmektedir (Aygan, 2008).

Diğer yandan sınıflandırmadaki mevcut problemleri çözmek ve modern bakteriyel taksonomiye yardımcı olmak amacıyla son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR), 16S rRNA Dizi Analizi, DNA-DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP), Toplam Hücre proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi moleküler yöntemler kullanılarak türler arasındaki farklılıklar ve benzerlikler belirlenmeye çalışılmaktadır (Chang ve ark., 2003).

### **BÖLÜM 3**

#### **MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deri örneği**

Bu çalışmada araştırma materyali olarak yerli ırk koyun ham derileri kullanılmıştır. Kesimhanelerden taze olarak temin edilen ham deriler, konservasyon yöntemleri dikkate alınarak konservedenmiş ve giysilik deri elde etmek amacıyla genel prensipler çerçevesinde işlenmişlerdir (Thorstensen, 1993; Sharphouse, 1983).

Derilerin ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama işlemleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biga Meslek Yüksek Okulu Dericilik Programı Uygulama Atölyesindeki makine ve teçhizattan yararlanılarak yapılmıştır. Söz konusu her bir işlem basamağı sonunda işlem sıvılarından örnekler alınmıştır. Alınan örnekler, alkalifilik bakteri izolasyonu için, soğuk zincirle Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir.

##### **3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri**

###### **3.1.2.1. Horikoshi-I agar**

İçeriği çizelge 1’de verilen Horikoshi-I agar besiyeri proteaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve eğik katı agarda stok kültürlerin saklanması için kullanılmıştır (Horikoshi, 1999).

Çizelge 1. Horikoshi I agar besiyeri

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Glikoz (Himedia)	10.0 g
Pepton (Bacto)	5.0 g
Yeast Extract (Himedia)	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Himedia)	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (Fluka)	0.2 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Sigma)	10.0 g
Agar (Himedia)	20.0 g



**3.1.2.2. Horikoshi-II agar**

$\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve eğik katı agarda stok kültürlerin saklanması için Horikoshi-II agar besiyeri (Çizelge 2) kullanılmıştır (Horikoshi, 1999).

Çizelge 2. Horikoshi II agar besiyeri

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Çözünür Nişasta (Fluka)	10.0 g
Pepton (Bacto)	5.0 g
Yeast Extract (Himedia)	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Himedia)	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (Fluka)	0.2 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Sigma)	10.0 g
Agar (Himedia)	20.0 g

**3.1.2.3. Rodamin-B agar**

Lipaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve eğik katı agarda stok kültürlerin saklanması için Rodamin-B agar (Çizelge 3) kullanılmıştır (Kouker ve Jaeger, 1986; Haba ve ark., 2000).

Çizelge 3. Rodamin- B agar

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Nutrient Broth (Sigma)	8.0 g
NaCl (Bacto)	4.0 g
Agar (Himedia)	10.0 g
Rodamin-B (1mg/mL) (Himedia)	10.0 mL
Zeytinyağı (Himedia ) Son konsantrasyonda % 2,5	31,25 mL

Yukarıda içerikleri verilen besiyerleri 121<sup>0</sup>C’de 15 dk otoklavlanmıştır. Çalışmada kullanılan besiyeri pH’ları (Horikoshi-I ve Horikoshi-II besiyeri içeriklerinde belirtilen 10g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> miktarı ilave edilmeden) steril % 20’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılarak ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama işlem sıvılarının pH larına uygun olacak şekilde sırasıyla pH 8, pH 11 ve pH 9 olarak ayarlanmıştır. Ayrıca Horikoshi-I besiyeri

otoklavlandıktan sonra % 10 oranında yağsız steril süt ilavesi ile modifiye edilmiştir. Rodamin-B Besiyerine ise besiyeri içeriğinde bulunan Rodamin-B boyası ve zeytinyağı, besiyeri otoklavlandıktan sonra şırınga filtre kullanılarak ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri aseptik koşullarda 45–50 °C’de daha önce steril edilmiş petrilere dökülmüştür.

#### **3.1.2.4. Tributyrin agar**

İzolatların lipaz enzim aktivitesinin kontrolü için kullanılmış ve içeriği çizelge 4’de verilmiştir (Ertuğrul ve ark, 2007).

Çizelge 4. Tributyrin agar

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Pepton (Bacto)	5.0 g
Yeast Extract (Himedia)	3.0 g
Tributyrin	10.0 mL
Agar (Himedia)	15.0 g

#### **3.1.2.5. Tween 80 agar**

İzolatların esteraz enzim aktivitesi tayininde Tween 80 besiyeri (Çizelge 5) kullanılmıştır (Ertuğrul ve ark., 2007).

Çizelge 5. Tween 80 agar

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Nutrient Broth (Sigma)	8.0 g
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (Himedia)	4.0 g
Agar (Himedia)	10.0 g
Tween 80 (Himedia)	2.4 mL

#### **3.1.2.6. SIM besiyeri**

H<sub>2</sub>S, indol oluşumu ve hareketin varlığını belirlemek için kullanılan bir besiyeridir (Tatar, 2007). Sigma firmasına ait hazır ticari besiyeri hali kullanılmış ve besiyeri içeriği çizelge 6’da verilmiştir.

Çizelge 6. SIM besiyeri

<b>Bileşimi</b>	<b>g/L</b>
Kazein peptonu	2.0 g
Et peptonu	6.0 g
Amonyum Demir III Sitrat	0.2 g
Amonyum Thiosülfat	0.2 g
Agar	3.0 g

### **3.1.2.7. Karbonhidrat fermentasyon besiyerleri**

İzolatların karbon kaynaklarını kullanabilme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla % 1 oranında D-mannitol, Fruktoz, Glikoz ve Maltoz karbon kaynaklarının ayrı ayrı ilave edildiği ticari Nutrient Broth besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerine karbonhidratların parçalanması sonucu asit oluşumunun tespiti için pH indikatörü olan brom timol mavisi (% 0,04 oranında) ve gaz oluşumunun belirlenmesi için Durham tüpü ilave edilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Temiz, 2000; Yavuztürk, 2005 ).

Durham tüpü ve % 0,04'lük (w/v) brom timol blue çözeltisi eklenmiş Nutrient Broth besiyerleri (pH 7.00) 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda besiyerlerine karbonhidrat kaynakları membran filtreden geçirilmek suretiyle steril olarak ilave edilmiştir. Besiyeri pH'ları steril % 20'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılarak ayarlanmış ve pH ayarlaması sonucu besiyerleri mavi renk almıştır.

### **3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler**

#### **3.1.3.1. Besiyeri ve izolasyonda kullanılan çözeltiler**

Araştırmada besiyeri hazırlanmasında ve izolasyonlarda kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanması aşağıda verilmiştir.

##### **3.1.3.1.1. % 20' lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi**

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için kullanılmıştır. Çözelti; 200,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ın 800,0 mL saf suda çözülmesi ile hazırlanmıştır (Gupta, 2005).

##### **3.1.3.1.2. % 0.04'lük (w/v) brom timol blue çözeltisi**

0.1 gr Brom Timol Mavisi başına 3,2 mL 0.05 N NaOH ve 5 ml % 96'lık etil alkol eklenerek ısı ile çözülür ve sonra 50 mL daha % 96'lık etil alkol katılıp, hacmi su ile 250 mL'ye tamamlanır (Atlan, 1989; Bal 2005).

**3.1.3.1.3. Peptonlu su çözeltisi**

İzolasyonlar için seyreltme sıvısı olarak peptonlu su çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler 0,1 g peptonun 100 mL distile suda çözülmesi ile hazırlanmıştır (Tamer ve ark.,1989). Çözelti pH'ları, ekim yapılacak besiyeri pH'ına uygun olacak şekilde % 20'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

**3.1.3.1.4. % 20'lik gliserol çözeltisi**

Kültürlerin -20 °C'de stoklaması için kullanılmıştır. 80 mL steril distile su içerisine 20 mL gliserol eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir (Adıgüzel, 2006).

**3.1.3.2. Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler**

Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanması aşağıda bir sıra dahilinde verilmiştir.

**3.1.3.2.1. Kristal viole boyası**

İçeriği çizelge 7'de verilen Kristal viole boyası Gram boyama için kullanılmıştır. Boya, 2 g Kristal violenin 20 mL etil alkolde ve 0,8 g amonyum oksalatın 80 mL distile suda çözüldürülmesiyle elde edilen iki ayrı çözeltinin birbirine karıştırılması ile hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989; Harley ve Prescott, 2002).

Çizelge 7. Kristal viole boyası

Kristal Viole	2.0 g
Etil Alkol (% 95'lik)	20.0 mL
Amonyum Oksalat	0.8 g
Distile Su	80.0 mL

**3.1.3.2.2. Gram iyodür (Lugol)**

Gram boyamada kullanılmak üzere hazırlanmıştır (Çizelge 8). İyot ve KI havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş su ilave edilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Harley ve Prescott, 2002).

Çizelge 8. Gram iyodür çözeltisi

İyot	1.0 g
KI	2.0 g
Distile Su	100.0 mL

**3.1.3.2.3. Safranin boyası**

İçeriği çizelge 9’da verilen Safranin boyası Gram boyamada kullanılmıştır. Etanolde çözüldürülen safranine, distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve filtre kağıdından süzümüştür (Tamer ve ark., 1989; Harley ve Prescott, 2002).

Çizelge 9.Safranin boyası

Safranin	0.25 g
Etil Alkol (% 95’lik)	10.0 mL
Distile Su	100.0 mL

**3.1.3.2.4. Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi**

İçeriği çizelge 10’da verilen Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi izolatların oksidaz testi ayıracı olarak kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çizelge 10. Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi

Tetrametil p-fenilen Daimin Dihidroklorid Pepton (Bacto)	1.0 g
Distile Su	100.0mL

**3.1.3.2.5. % 3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi**

3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin 1000 mL distile su içine eklenmesi ile hazırlanmış (Çizelge 11) ve izolatların katalaz testi ayıracı olarak kullanılmıştır (Aslan, 2009).

Çizelge 11. % 3’ük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi

Hidrojen Peroksit ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.0 mL
Distile Su	100.0 mL

**3.1.3.2.6. Kovaks ayıracı**

Çözeltinin hazırlanmasında p-dimetilaminobenzaldehid alkolde çözümlenerek su banyosunda ısıtılmış ve % 37’lik HCl yavaşça ilave edilmiştir (Çizelge 12). İzolatların indol testi ayıracı olarak kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989; Harley ve Prescott, 2002).

Çizelge 12. Kovaks ayıracı

N-amil veya izoamil alkol	150 mL
%37’lik Hidroklorik asit (HCl)	50 mL
p-dimetilaminobenzaldehid	10.0 g

**3.1.3.3. Nicel enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler****3.1.3.3.1. Potasyum-fosfat tamponu**

Enzimlerin pH 8'deki aktivite düzeylerinin saptanmasında kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (27,2 g/L) ile 0.2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (34,84 g/L) çözeltileri ve distile sudan çizelge 13'de verilen hacimlerde karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip yeni bir çözelti elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008, Aygan, 2008).

Çizelge 13. Potasyum- fosfat tamponu

pH	0.2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (27.2 g/L) mL	0.2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (38.84 g/L) mL	Distile Su mL
8	5,3	94,7	100

**3.1.3.3.2. Glisin-NaOH tamponu**

Enzimlerin pH 9 ve pH 11'deki aktivite düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Tampon 50 mM glisin çözeltisine (3.753 g/L glisin) 50 mM NaOH çözeltisinin (2 g/L) yavaş yavaş ilave edilmesi ile istenilen pH değerlerine getirilerek hazırlanmıştır (Tekin, 2008, Temizkan ve Arda, 2008).

**3.1.3.3.3. Dinitro salisilik asit (DNS) çözeltisi**

Nicel amilaz enzim aktivitesi tayininde, enzim aktivitesini durdurmak ve enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. 1g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülür. Üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL ye tamamlanır (Miller, 1951; Tatar, 2007; Aygan, 2008).

**3.1.3.3.4. Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi**

Nicel proteaz enzim aktivitesi tayininde, enzim aktivitesini durdurmak için kullanılmıştır. 0.11 M TCA (Trikloroasetik asit, 17.97 g), 0.22 M  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sodyum Asetat Trihydrate 29.9 g) ve 0.33 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Asetik Asit, 19.81 mL) olacak şekilde tüm bileşenler bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacmi 1L'ye tamamlanmıştır (Tekin, 2008; Kerimak Öner, 2008).

**3.1.3.3.5. 0.5 M Sodyum karbonat çözeltisi**

Nicel proteaz enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır. 52.995 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bir miktar distile suda çözülerek çözelti hacmi 1 L' ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Tekin, 2008; Kerimak Öner, 2008).

**3.1.3.3.6. 1N folin çözeltisi**

Folin-ciocalteu's phenol reaktifinin 1:1 oranında dH<sub>2</sub>O ile karıştırılması ile elde edilmiştir. Çözelti nicel proteaz enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Tekin, 2008; Kerimak Öner, 2008).

**3.1.3.4. Moleküler tanılamada kullanılan çözeltiler****3.1.3.4.1. 10X TAE tamponu**

Elektroforez uygulamalarında kullanılmak üzere stok 10X TAE tamponu hazırlanmıştır. çizelge 14'de verilen maddeler 800 mL steril saf suda çözülür ve pH 8'e ayarlanarak 1000 mL'ye tamamlanır (Bilgi, 2012).

Çizelge 14. 10X TAE tamponu

---

Tris Baz (Sigma)	48.4 g
Glasiyal Asetik Asit (Sigma)	11.42 g
0.5 M EDTA (pH 8)	20 mL

---

**3.1.3.4.2. 1X TAE tamponu**

10X TAE stok tamponundan 10 mL alınmış ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Yılmaz, 2010).

**3.1.3.4.3. 0.5 M EDTA pH 8**

73.06 g EDTA (Himedia), 350 mL steril saf suda çözülür ve NaOH ilave edilerek pH 8'e ayarlanır. Çözelti steril saf su ile 500 mL'ye tamamlanır (Bilgi, 2012).

**3.1.3.4.4. Agaroz jel**

DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin elektroforez ile kontrolü için kullanılmıştır. Genomik DNA örneklerinin kontrolü için % 0,8'lik, PCR ürünlerinin kontrolü için % 1,5'lik agaroz jel kullanılmıştır (Yaşa ve ark, 2008). Sırasıyla 100 mL 1X TAE içerisine 0,8 g ve 1,5 g agaroz eklenmiş ve kaynatılarak karışımın homojen olması sağlanmıştır. Hazırlanan agaroz jel karışımı 50–60 °C'ye kadar soğutularak tarakların yerleştirildiği elektroforez kasetine dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir (Aygan, 2008; Bilgi, 2012).

**3.1.3.4.5. 6x jel yükleme boyası**

Çizelge 15’de içeriği verilen yükleme boyası DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanılmıştır. Boya çözeltisi homojen hale getirilerek 2 mL’lik mikro tüplere bölünmüş ve -20 °C’de saklanmıştır (Bilgi, 2012).

Çizelge 15. 6x jel yükleme boyası

Tris Baz	12.1 mg	10mM
EDTA	223.3 mg	60mM
Brom Fenol Mavisi	30 mg	% 0.3
Steril Saf Su	4 mL	
Gliserol	6mL	

**3.1.3.4.6. Syber green jel boya çözeltisi**

DNA ve PCR ürünlerinin U.V. lamba altında görünür hale gelmesi için kullanılmıştır. Çizelge 16’deki boya çözeltisi hazırlanarak ışık almayacak şekilde -20 °C’de saklanmıştır (Bilgi, 2012).

Çizelge 16. 400x syber green I jel boya çözeltisi

10.000 X Syber Green I (Lumiprobe)	40 µl
DMSO (Dimetil sülfoksit)	1000µl

**3.1.3.5. Kullanılan başlıca cihaz ve ekipmanlar**

Çalışma esnasında; Hassas terazi (Precisa 205 ASCS), Manyetik Karıştırıcı (Velp), Vortex (Velp), Otoklav (Hirayama Hiclave HG-80), Etüv (Elektromag), İnkübatör (Nüve EN 120), Çalkalamalı inkübatör (Stuart Orbital Incubator SI 500), Soğutmalı inkübatörler (Nüve ES 120 Elektromag M7040), Çalkalayıcı (Nüve SL 350), Mikroskop (Zeiss Pimo Star), Derin Dondurucu (Siemens), Elektroforez (Thermo OWL Easycast B2), Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC 300 XL), Jel görüntüleme cihazı (Quantum ST4), Mikropipetler (Biohit mLline), pH metre (Hanna), Saf su cihazı (Nüve NS 108), Santrifüj (Thermo MicroCL 17R), Spektrofotometre (Shimadzu UV 1208), Spektrofotometre küveti (Quartz), Su banyosu (Nüve BM 402), Thermalcycler (Techne TC-5000) cihaz ve ekipmanları kullanılmıştır.



### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Deri işleme yöntemi

Çalışmada araştırma materyali olarak yerli ırk koyun ham derileri kullanılmıştır. Kesimhanelerden taze olarak temin edilen ham deriler, konservasyon yöntemleri dikkate alınarak % 50 oranında tuzla konservedenmiş ve giysilik deri elde etmek amacıyla genel prensipler çerçevesinde kireç giderme-sama sonuna kadar işlenmişlerdir. Çalışmada deriler aşağıda verilen reçeteye göre Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biga Meslek Yüksek Okulu Dericilik Programı Araştırma ve Uygulama İşletmesindeki makine ve teçhizattan yararlanılarak işlenmişlerdir. Çalışmada kullanılan deri işleme yöntemi çizelge 17' de verilmiştir.

Çizelge 17. Deri işleme yöntemi

İşlem	%	Kimyasal Madde	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	pH
Islatma	500	Su	20	240	7.0
	500	Su	20		
	0.5	Non-iyonik yüzey aktif madde			
Yumuşatma	0.4	Kuarternize edilmiş bileşiklerden oluşan biosid		30	7.0
	Otomatikte çalışma ( 55 dk. durur / 5 dk. çalışır. Toplam süre 18 saat				
Kıl Giderme		15 Bome (°Be') Na <sub>2</sub> S- 25°Be' Ca (OH) <sub>2</sub>			
	400	Su	20		
Kireçlik	2	Na <sub>2</sub> S			
	4	Ca(OH) <sub>2</sub>		30	12
	Otomatikte çalışma (55 dk. durur / 5 dk. çalışır. Toplam süre 24 saat				
Yıkama	300	Su	35	10	
	300	Su	35		
Kireç Giderme-Sama	1.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		30	8.5
	1	Proteolitik enzim		60	
Yıkama	200	Su	20	10	

Deriler işlenirken Islatma-yumuşatma, kireçlik ve kireç giderme-sama işlem basamakları sonunda işlenti sıvılarından steril kaplara sıvı örnekler aseptik koşullarda alınmış ve soğuk zincirle 1-2 saat içerisinde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir.

### **3.2.2. Bakterilerin izolasyonu**

Çalışmada Islatma-yumuşatma, kireçlik ve kireç giderme-sama işlem basamağından alınan sıvı örneklerin 10 mL'si 90 mL seyreltme sıvısına eklenerek  $10^{-1}$ 'lik seyreltme elde edilmiştir. Bundan sonraki seyreltmeler 9 mL seyreltme sıvısı içeren tüplere 1'er mL aktararak yapılmıştır. Sonuçta bakteriyolojik izolasyon için  $10^{-8}$  e kadar seyreltiler hazırlanmıştır. Daha sonra  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  ve  $10^{-8}$ 'lik seyreltilerden Horikoshi I, Horikoshi II ve Rodamin-B besiyerlerine ekimler dubletli olacak şekilde aseptik koşullarda yayma kültürel yöntemi kullanılarak yapılmıştır (AOC, 2000).

#### **3.2.2.1. Proteaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi**

Proteaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin izolasyonu için ekim yapılan Horikoshi I besiyerleri 37 °C de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesine sahip izolatlar yağsız sütün hidrolizi sonucunda koloni çevresinde oluşturdukları proteolitik zonun varlığına bağlı olarak belirlenmiştir (Çoban, 2004; Tekin, 2008). Petrilerde gelişim gösteren proteolitik mikroorganizmalar koloni ve pigmentasyon özelliklerine göre seçilerek çizgi ekim tekniği ile izole edilmişlerdir (Mwatha ve Grant, 1993; Bilgi ve ark., 2009). İzole edilen koloniler uygun besiyerlerinde +4 °C' de korunmuştur. Uzun süreli stoklamalar için ise gliserol yöntemi kullanılmıştır.

#### **3.2.2.2. $\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi**

$\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin izolasyonu için ekim yapılan Horikoshi II besiyerleri 37 °C de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda besiyeri petri kutusunun kapağına dökülen iyod çözeltisi buharına tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Nişasta içeren zemin koyu maviye boyanırken, amilaz enzimi üreten kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşumunun gözlenmesiyle, bu izolatlar amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hols ve ark, 1994; Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003; Aygan, 2008; Çoşkun, 2010). Petrilerde gelişim gösteren amilolitik mikroorganizmalar koloni ve pigmentasyon özelliklerine göre seçilerek çizgi ekim tekniği ile izole edilmişlerdir (Mwatha ve Grant, 1993; Bilgi ve ark., 2009). İzole edilen koloniler uygun besiyerlerinde +4 °C' de korunmuştur. Uzun süreli stoklamalar için ise gliserol yöntemi kullanılmıştır.

**3.2.2.3. Lipaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin belirlenmesi**

Lipaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin izolasyonu için Rodamin-B besiyeri kullanılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde 350 nm ultra viyole (U.V.) altında etrafında portakal-kırmızı hale oluşumu gösteren koloniler gerçek lipaz enzim aktivitesine sahip koloniler olarak değerlendirilmiştir (Haba ve ark., 2000).

Rodamin B besiyerinden elde edilen izolatlar ayrıca kontrol amaçlı Tributyrin Agar besiyerine (Ertuğrul ve ark., 2007) ve Tween 80 besiyerine (Haba ve ark., 2000; Çoban, 2004) çizgi ekim tekniğiyle ekilmişlerdir. İnkübasyon sonucunda Tributyrin Agar besiyerinde etrafında şeffaf zon oluşturan izolatlar lipaz pozitif (Ertuğrul ve ark., 2007) Tween 80 besiyerinde etrafında zon oluşturan izolatlar ise estereaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgi, 2012).

Petridelerde gelişim gösteren lipolitik mikroorganizmalar koloni ve pigmentasyon özelliklerine göre seçilerek çizgi ekim tekniği ile izole edilmişlerdir (Mwatha ve Grant, 1993; Bilgi ve ark., 2009). İzole edilen koloniler uygun besiyerlerinde +4 °C' de korunmuştur. Uzun süreli stoklamalar için ise gliserol yöntemi kullanılmıştır.

**3.2.3. İzolatların stoklanması**

Distile su ile % 20 konsantrasyonda hazırlanan gliserol çözeltisi otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine aktive edilen izolatlardan 500 µl eklenmiş üzerine ise 500 µl % 20' lik gliserol çözeltisinden aktarılarak vortekslenmiştir. Ardından eppendorf tüpleri -20 °C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir (Adıgüzel, 2006 ).

**3.2.4. Gram boyama**

İzolatlar öncelikle izole edildikleri ayırt edici besiyerlerinde 37°C'de 18-24 saat aktive edilmişlerdir. Aktivasyon sonunda Gram boyama preparatları hazırlanmış ve havada kurutulmuştur. Preparatlar kristal viyole boyasıyla 1-2 dakika, Gram iyodür (Lugol) ile 1 dakika, % 95'lik etanol ile 15-20 saniye ve safranin boyasıyla 1 dakika muamele edilerek boyanmışlardır. Preparatlar boyama işleminin her basamağından sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparatlar havada kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda 100'lük immersiyon objektifinde incelenmiştir. İnceleme sonrası kırmızı-pembe renkli bakteriler Gram negatif, mor renkli bakteriler Gram pozitif olarak tanımlanmıştır (Tamer ve ark., 1989; Harley ve Prescott, 2002; Bal, 2005; Aslan, 2009) .

**3.2.5. Endospor varlığı**

Endosporlar basit boyama ve Gram boyamada kullanılan bazik boyalara karşı geçirgen değildirler. Bu nedenle boyama sırasında bazik boyalarla boyanmış hücrelerdeki endosporlar boyanmamış bölgeler olarak görülür. Böylece endosporlar ışık mikroskobu altında parlak hücreler halinde görülebilir hale gelirler. Çalışmada izolatların spor varlığının incelenmesinde Gram boyama için hazırlanan preparatlar kullanılmış ve boyanmamış hücreler endospor olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000, Madigan ve Martinko, 2009).

**3.2.6. Oksidaz testi**

Oksidaz aktivitesi, izolatların izole edildikleri ayırt edici besiyerlerinde 37°C'de 18-24 saat aktive edilmesi sonucu test edilmiştir. Besiyerinde gelişen saf kolonilerden steril platin öze ile alınarak tetrametil-para-fenilendiamin dihidroklorid ayırıcı damlatılmış filtre kağıdı üzerine sürülmüştür. 5-10 sn içinde mavi-mor rengin meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000; Harley ve Prescott, 2002; Çoban, 2004; Aslan, 2009).

**3.2.7. Katalaz testi**

Katalaz aktivitesi, izolatların izole edildikleri ayırt edici besiyerlerinde 37°C'de 18-24 saat inkübasyonu sonucunda test edilmiştir. Besiyerinde gelişen saf koloniler üzerine birkaç damla % 3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisi damlatılmıştır. Koloniler üzerinde gaz kabarcıklarının meydana gelmesi katalaz pozitif, gaz kabarcıklarının gözlenmemesi ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Temiz, 2000; Harley ve Prescott, 2002; Çoban, 2004).

**3.2.8. Hareketlilik testi**

İzolatların hareketliliğini belirlemek amacıyla SIM besiyeri kullanılmıştır. Kapaklı cam tüplere hazırlanan besiyerlerine 24 saatlik aktif kültürden dik ekimler yapılmış ve tüpler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda ekim çizgisi boyunca üremenin görülmesi hareketlilik negatif, ekim çizgisinden besiyerinin içine doğru yayılarak üremenin görülmesi ise hareketlilik pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tatar, 2007).

**3.2.9. İndol oluşum testi**

İndol oluşum testi için SIM besiyeri kullanılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C’de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerine 0,5 mL Kovaks ayracı eklenmiştir. Besiyerinin üst kısmında kırmızı renkte bir halka oluşumu pozitif sonuç, sarı bir tabakanın oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

**3.2.10. Hidrojensülfür (H<sub>2</sub>S) oluşum testi**

H<sub>2</sub>S oluşum testi için SIM besiyerlerine 24 saatlik aktif kültürden iğne öze ile dik ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C’de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde ekim çizgisi boyunca ve besiyerinin içine doğru siyah renk oluşumu H<sub>2</sub>S üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

**3.2.11. Karbonhidrat kullanım testleri**

Karbonhidrat kullanım testleri karbon kaynağı olarak %1 oranında glukoz, D-mannitol, fruktoz ve maltoz şekeri, pH indikatörü olarak %0,04’lük (w/v) brom timol blue ve gaz oluşumunun tespiti için durham tüpü içeren NB besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Dört farklı şeker için ayrı ayrı besiyerleri hazırlanmış ve aktive edilmiş kültürlerden ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, Brom Timol Mavi’ sinin alkalın pH’daki mavi renginden, asidik pH’ daki sarı renge dönmesi pozitif sonuç olarak; durham tüpü içerisinde oluşan gaz birikimi ise gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Yavuztürk, 2005; Bal, 2005).

**3.2.12. İzolatların tuz toleransı**

İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi amacıyla her bir izolat izole edildiği, % 5, % 10, % 15, % 20 NaCl içeren ayırt edici besiyerlerine çizgi ekim tekniği kullanılarak ekilmişlerdir. Ekim yapılan petripler 37 °C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların üreme ve nitel enzim aktivitesi gösterdiği tuz aralığı saptanmıştır (Çoban, 2004; Aygan, 2008).

**3.2.13. İzolatların pH toleransı**

İzolatların pH toleransının belirlenmesinde, her bir izolatın izole edildiği ayırt edici besiyerleri kullanılmıştır. Besiyeri pH’ları % 20’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılarak pH 7, 8, 9, 10, 11 ve 12’ye ayarlanmış ve her bir izolat çizgi ekim tekniği kullanılarak besiyerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan petripler 37 °C’de 18-24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda izolatların üreme ve nitel enzim aktivitesi gösterdiği pH aralığı saptanmıştır.

**3.2.14. İzolatların sıcaklık toleransı**

İzolatların sıcaklık toleranslarının belirlenmesinde, her bir izolat izole edildiği ayırt edici besiyerine çizgi ekim tekniği kullanılarak ekilmiş ve 27 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C'de 18-24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda izolatların üreme ve nitel enzim aktivitesi gösterdiği sıcaklık aralığı belirlenmiştir (Çoban, 2004; Aygan, 2008).

**3.2.15. Nicel enzim kapasitelerinin belirlenmesi****3.2.15.1. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi**

Nicel proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde yüksek nitel enzim aktivitesine sahip proteolitik 12 farklı izolat seçilmiştir.

**3.2.15.1.1. Proteaz enzim üretimi**

Seçilen izolatlardan proteaz enzim eldesi Horikoshi-I broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyeri pH'ları her bir izolatın; izole edildiği işlem basamağı ve besiyeri pH'ına göre pH 8, pH 9 ve pH 11'e ayarlanmıştır. Proteaz enzim eldesi izolatların 50 mL besiyeri ortamı içeren 250mL'lik erlenmayerlere inoküle edilmesi ve 37°C'de, 180 rpm çalkalama hızında 48 saat büyütülmesi ile gerçekleştirilmiştir (Kumar ve ark., 1999; Öztürk ve ark., 2009). Geliştirilen bakteri süspansiyonundan belirli aralıklarla alınan 1.5 mL'lik örneklerin 10.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatant hücre dışı enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Gheorghiu Alpan, 2008).

**3.2.15.1.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü**

Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde, Takami ve ark. (1989)'nın belirttiği yöntem kullanılmıştır. Ancak yöntemde substrat olarak kullanılan hammersten kazein yerine çalışmamızda kazein kullanılmıştır. Çalışmada ele alınan izolatın izole edildiği besiyeri pH'ına göre, % 0.6 oranında kazein içeren pH 8'lik Potasyum-Fosfat Tamponu; pH 9'luk ve pH 11'lik 50 mM Glisin-NaOH tamponlarının 2.5 mL'si ile 0.5 mL izolatlardan elde edilen süpernatantlar karıştırılarak 20 dakika 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda reaksiyonlar 2.5 mL 0.1 M TCA ile durdurulduktan sonra 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda 2 mL'lik efendorf tüplerine alınan çözeltiler 5000 xg 15 dk süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjizasyon sonucu elde edilen üst berrak sıvılara 2.5 mL 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 0.5 mL 1N Folin-ciocalteu's phenol reaktifi eklenerek 30 dakika oda koşulunda inkübe edilmiştir. Süre sonunda spektrofotometride örneklerin 660 nm'de absorbanı ölçülmüştür. Enzim aktivitesi ölçümü her bir örneğe ait 3 paralel tüpün 3 kez tekrar edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kör olarak ise enzim çözeltisi

yerine tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımları kullanılmıştır (Tekin, 2008; Öztürk ve ark.,2009).

### **3.2.15.1.3. Proteaz enzim ünitesinin tanımı**

Bir ünite (U/mL) proteaz aktivitesi, kazeinin hidrolizi sonunda, 37°C’de, pH 8, pH 9 ve pH 11’de dakikada 1µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi standart tirozin grafiği (Ek 30) oluşturularak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Tekin, 2008; Öztürk ve ark., 2009).

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/mL/dk)} = \frac{(\text{OD}_{660}/\text{eğim}_{\text{tirozin}}) \times \text{Toplam hacim(mL)}}{\text{Enzim hacmi(mL)} \times \text{İnkübasyon süresi (dk)}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

### **3.2.15.1.4. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması**

Proteaz enzim aktivitesinin hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için her bir pH derecesine uygun (pH 8’lik Potasyum-Fosfat; pH 9’luk ve pH 11’lik 50 mM Glisin-NaOH ) tampon çözeltisi ile 1 µg/mL tirozin çözeltisi hazırlanmıştır. 0-50 µl hacimlerde 1 µg /mL tirozin çözeltisi alınarak her bir pH derecesi için ayrı ayrı hazırlanan altı tüpe konmuştur. Daha sonra her bir tüp pH derecesine uygun tampon çözeltisi ile 1 mL’ye tamamlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda tirozin içeren her bir çözeltiden 0,5 mL temiz tüplere aktarılarak üzerine 2.5 mL 0.5 M sodyum karbonat çözeltisi ile 0.5mL folin çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve bu sürenin sonunda spektrofotometrede 660 nm’de absorbands değerleri okunmuştur. Kör olarak 0µg/mL tirozin içeren yine her bir pH derecesine uygun tampon çözeltileri kullanılmıştır. Tirozin miktarına bağlı olarak 660 nm’deki absorbands değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafiklerin eğiminden yararlanılarak enzim örneklerinin proteaz aktivitesi hesaplanmıştır (Takami ve ark., 1989; Kerimak Öner, 2008). Tirozin standart grafikleri Ek 30’da verilmiştir.

### **3.2.15.2. α-Amilaz aktivitesinin belirlenmesi**

Nicel α-amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde yüksek nitel enzim aktivitesine sahip amilolitik 10 farklı izolat seçilmiştir.

**3.2.15.2.1.  $\alpha$ -Amilaz enzim üretimi**

Çalışmada kullanılacak hücre dışı  $\alpha$ -amilaz enzim üretimi; Horikoshi-II broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyeri pH'ları her bir izolata; izole edildiği işlem basamağı ve besiyeri pH'ına göre pH 8, pH 9 ve pH 11'e ayarlanmıştır.  $\alpha$ -Amilaz enzim üretimi izolatların 50 mL besiyeri ortamı içeren 250 mL'lik erlenmayerlere inoküle edilmesi ve 37°C'de, 180 rpm çalkalama hızında 48 saat büyütülmesi ile gerçekleştirilmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Geliştirilen bakteri süspansiyonundan belirli aralıklarla alınan 1.5 mL'lik örneklerin 10.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatant hücre dışı enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Gheorghiu Alpan, 2008).

**3.2.15.2.2.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin ölçümü**

$\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde DNS yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada substrat olarak içerisinde % 1 oranında nişasta bulunan pH 8'lik Potasyum-Fosfat Tamponu; pH 9'luk ve pH 11'luk 50 mM Glisin-NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Aktivite tayini için 0,5 mL enzim ve 0,5 mL substrat tüpte karıştırılarak 37 °C' de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim substrat karışımına toplam hacim kadar DNS çözeltisi eklenerek 5 dk kaynar suda bekletilmiştir. Örnekler soğutma işleminden sonra 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör olarak eşit hacimde substrat ve DNS karışımı kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel tüpde hazırlanmış ve ölçümler her pH değeri için üç kez tekrarlanmıştır (Tatar, 2007; Aygan, 2008).

**3.2.15.2.3.  $\alpha$ -Amilaz enzim ünitesinin tanımı**

Bir ünite (U/mL)  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, nişastanın hidrolizi sonunda, 37°C'de, pH 8, pH 9 ve pH 11'de dakikada 1 $\mu$ g maltoz oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi standart maltoz grafiği oluşturularak (Ek 31) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Uçar, 2011).

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/mL/dk)} = \frac{(\text{OD}_{540}/\text{eğim}_{\text{maltoz}}) \times \text{Toplam hacim(mL)}}{\text{Enzim hacmi(mL)} \times \text{İnkübasyon süresi (dk)}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

**3.2.15.2.4. Maltoz standart grafiğinin hazırlanması**

$\alpha$ -Amilaz aktivitesinin hesaplamasında kullanılacak olan maltoz standart grafiğinin hazırlanmasında DNS yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler için her bir pH derecesine uygun



(pH 8'lik Potasyum-Fosfat; pH 9'luk ve pH 11'lik 50 mM Glisin-NaOH) tampon çözeltisi ile hazırlanan maltozun farklı konsantrasyonlardaki (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000  $\mu$ M) çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltilerdeki şeker miktarı DNS metodu ile 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş; daha sonra konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir (Uçar, 2011).

### **3.2.15.3. Büyüme eğrisinin belirlenmesi**

Enzim aktiviteleri ölçülen izolatların gelişimi 600 nm dalga boyu ışıkta absorbans (O.D) ölçümü ile izlenmiştir. Örnekler 50 mL besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere % 10 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında belirli aralıklarla alınan örnekler +4 °C'de 10.000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm'de ve tanık olarak fizyolojik suya karşı ölçülmüştür. Her bir izolat için zamana karşı absorbans değerleri kullanılarak büyüme eğrileri çizilmiştir. Optik yoğunluk değerleri zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen veriler enzim aktivitelerinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır (Gao ve ark., 2008; Bilgi, 2012).

### **3.2.15.4. İstatistiksel analizler**

Çalışmada proteolitik ve amilolitik özellikteki izolatların, nicel enzim aktivite bulguları istatistiksel analizleri Minitab 160 programında Display Descripti ve Statistic metodunu ile yapılmıştır. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

### **3.2.16. Moleküler tanımlama**

Çalışmada moleküler tanımlama için fenotipik özellikleri belirlenmiş izolatlardan birbirinden farklı 29 izolat seçilmiş ve 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılarak filogenetik tanımlamaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntem aşağıda bir sıra halinde verilmiştir.

#### **3.2.16.1. DNA izolasyonu**

İzolatların genomik DNA izolasyonu için ticari GeneOn marka Bakteriyal DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Örneklerin genomik DNA'ları Horikoshi I besiyerinde geliştirilen 18 saatlik kültürlerden izole edilmiş ve DNA izolasyon ticari kiti talimatları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Yavuztürk, 2005). Elde edilen genomik DNA'lar % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Yaşa ve ark, 2008). Kontrol sonrası kısa süreli kullanımlar için +4 °C' de, uzun süreli kullanımlar için -20 °C'de saklanmıştır.

**3.2.16.2. Primerlerin saptanması**

Yapılan literatür taraması sonucu çalışmada, universal bakteriyal ileri primeri 27 F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve bakteriyal geri primeri 1492 R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılmıştır (Brandl ve ark., 2001; Deng ve ark., 2010).

**3.2.16.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Çalışmada izolatların PZR için Geneon marka Maximo Taq DNA Polymerase PCR kiti kullanılmıştır ve PZR protokolü çizelge 18'de verilmiştir.

Çizelge 18. Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü

Stok Çözelti	
ddH <sub>2</sub> O	19,8 µl
Taq Buffer (10 X)	2,5 µl
dNTP	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Taq DNA Polimeraz (10U/µl)	0,2 µl
Kalıp DNA	1 µl

DNAz ve RNAz içermeyen steril 0.2 ml PZR tüplerinde hazırlanan reaksiyonun son hacmi 25 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından kısa süreli santrifüj edilen tüpler thermalcycler'a yerleştirilmiştir. Reaksiyon 1 döngü 94 °C'de 5 dk, 30 döngü 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 30 döngü 54 °C'de 1 dk primer bağlanması, 30 döngü 72 °C'de 1,5 dk polimerizasyon, 1 döngü 72 °C'de 5 dk son uzama (Çizelge 19) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Brandl ve ark., 2001; Deng ve ark., 2010). Seçilen izolatların U 27 F- U 1492 R primer çifti kullanılarak elde edilen PZR ürünleri PZR Clean-up (GeneOn) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır (Yavuztürk, 2005; Bilgi, 2012).

Çizelge 19. Thermalcycler protokolü

Sıcaklık	94 °C	94 °C	54 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Süre	5 dk	1dk	1dk	1,5dk	5 dk	∞
Döngü Sayısı	1	30	30	30	1	

**3.2.16.4. PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü ve dizi analizi**

Saflaştırılan PZR ürünleri kontrol amaçlı % 1,5'luk agaroz jele 2.5 µl DNA örneği, 0.5 µl Syber green I ve 0.5 µl 6x jel yükleme boyası olacak şekilde yüklenmiştir. Örnekler ile karşılaştırmak için ilk kuyucuğa 5 µl Geneon marka 100 bp plus blue DNA ladder ve 1 µl Syber green I yüklenmiş ve örnekler elektroforezde 80 V, 100 mA elektrik akımında 1 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonunda yürütülen jel, görüntüleme cihazı ile incelenmiş ve PZR ürünleri dizi analizine göndermek için -20 °C'de saklanmıştır (Yaşa ve ark., 2008; Bilgi, 2012). Saflaştırılmış PZR ürünlerinin dizi analizi Bioeksen firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

## **BÖLÜM 4**

### **ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

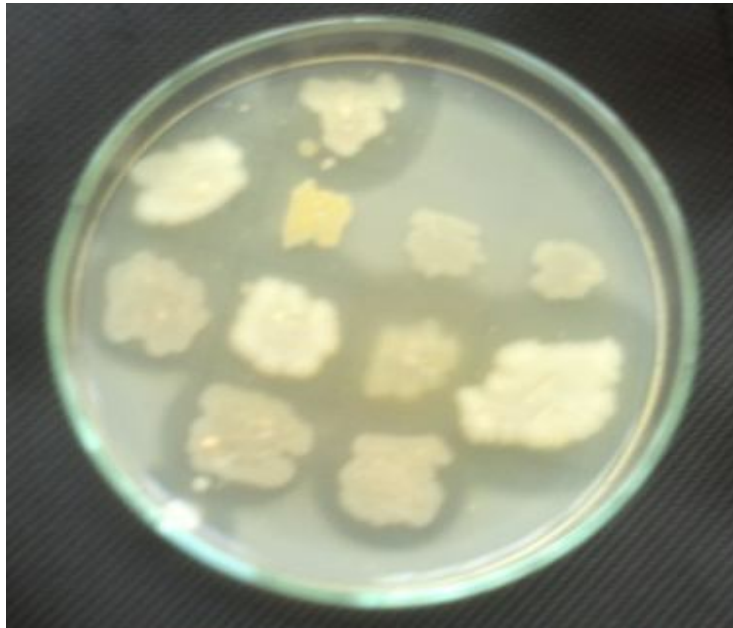
#### **4.1. Araştırma Bulguları**

Çalışmada tabaklama öncesi işlem basamaklarından (ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama) 50 adet proteolitik, 52 adet amilolitik ve 15 adet lipolitik özellikte toplam 117 adet izolat elde edilirken, lipolitik özellikteki izolatların lipaz aktivitesi yerine esteraz aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Öncelikle elde edilen proteolitik ve amilolitik izolatların fenotipik özellikleri belirlenmiştir. Fenotipik özellikleri belirlenen izolatlardan moleküler tanılama için birbirinden farklı 29 izolat seçilmiş ve bu izolatlardan en iyi nitel enzim aktivitesine sahip 12 adet proteolitik, 10 adet amilolitik toplam 22 adet izolat seçilerek nicel enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Son olarak moleküler tanılama için seçilen 29 izolatın filogenetik tanımlamaları yapılmıştır. Çalışma bulguları bir sıra dahilinde aşağıda verilmiştir.

#### **4.1.1. Proteaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları**

##### **4.1.1.1. İzolatların elde edilmesi**

Çalışmada söz konusu işlem basamaklarından izole edilen proteolitik izolatlar ekim yapılan Horikoshi I besiyerlerinde oluşturdukları zon varlıklarına göre seçilmiştir. Proteaz enzim aktivitesine sahip bazı bakteri izolatlarının besiyerinde oluşturdukları proteolitik zonlar şekil 2’de verilmiştir.



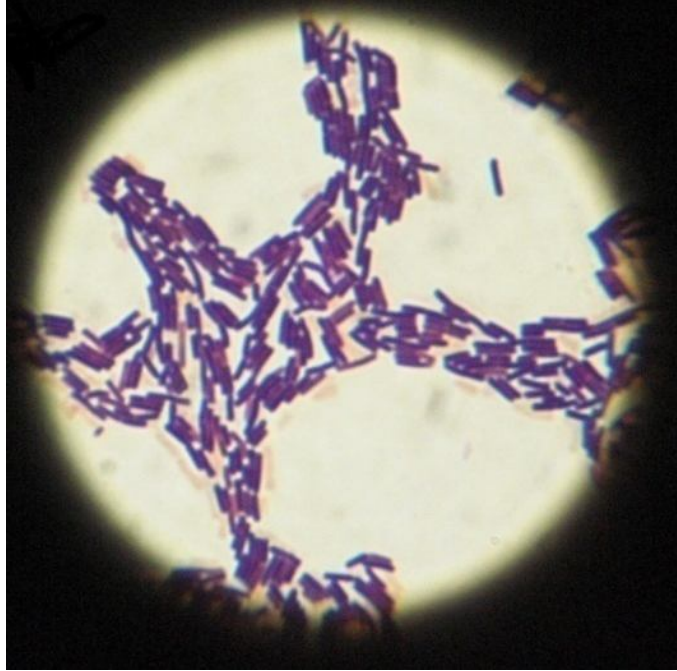
Şekil 2. Proteaz enzim aktivitesine sahip bazı izolatlar.

Çalışmada ıslatma yumuşatma prosesinden (pH 8) 13 adet, kireçlik prosesinden (pH 11) 16 adet, kireç giderme-sama prosesinden (pH 9) 21 adet olmak üzere toplamda 50 adet proteaz enzim aktivitesine sahip bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatlara izole edildikleri işlem basamağına göre kod numarası verilmiştir.

Buna göre kodlarda yer alan S harfi ıslatma-yumuşatma, L harfi kireçlik ve D harfi kireç giderme-sama basamağını temsil ederken; P harfi bakterinin sahip olduğu proteaz enzim aktivitesini temsil etmektedir.

#### **4.1.1.2. İzolatların mikroskopik özellikleri**

Araştırmada elde edilen proteolitik bakterilere öncelikle Gram boyama yapılarak bakterilerin morfolojik özellikleri ve endospor oluşturma yetenekleri belirlenmiş; ayrıca saflık kontrolleri de yapılmıştır. Buna göre elde edilen proteolitik izolatların tamamının saf endospor oluşturma yeteneğine sahip Gram pozitif basıl oldukları belirlenmiştir. Gram boyama sonucu PS4 izolatının mikroskopik görüntüsü şekil 3’ de verilmiştir.



Şekil 3. PS4 izolatının ışık mikroskobu görüntüsü (10X100).

Proteolitik izolatlara ait Gram boyama sonuçları çizelge 20, çizelge 21, çizelge 22 de verilmiştir.

Çizelge 20. Islatma yumuşatma işlem basamağında elde edilen izolatlar

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
PS1	+	Basil	+
PS2	+	Basil	+
PS3	+	Basil	+
PS4	+	Basil	+
PS5	+	Basil	+
PS6	+	Basil	+
PS7	+	Basil	+
PS8	+	Basil	+
PS9	+	Basil	+
PS10	+	Basil	+
PS11	+	Basil	+
PS12	+	Basil	+
PS13	+	Basil	+

Çizelge 21. Kireçlik işlem basamağında elde edilen izolatlar

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
PL1	+	Basil	+
PL2	+	Basil	+
PL3	+	Basil	+
PL4	+	Basil	+
PL5	+	Basil	+
PL6	+	Basil	+
PL7	+	Basil	+
PL8	+	Basil	+
PL9	+	Basil	+
PL10	+	Basil	+
PL11	+	Basil	+
PL12	+	Basil	+
PL13	+	Basil	+
PL14	+	Basil	+
PL15	+	Basil	+
PL16	+	Basil	+

Çizelge 22. Kireç giderme-sama işlem basamağında elde edilen izolatlar

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
PD1	+	Basil	+
PD2	+	Basil	+
PD3	+	Basil	+
PD4	+	Basil	+
PD5	+	Basil	+
PD6	+	Basil	+
PD7	+	Basil	+
PD8	+	Basil	+
PD9	+	Basil	+
PD10	+	Basil	+
PD11	+	Basil	+
PD12	+	Basil	+
PD13	+	Basil	+
PD14	+	Basil	+
PD15	+	Basil	+
PD16	+	Basil	+
PD17	+	Basil	+
PD18	+	Basil	+
PD19	+	Basil	+
PD20	+	Basil	+
PD21	+	Basil	+

#### 4.1.1.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri

Morfolojileri belirlenen izolatlar sırasıyla oksidaz, katalaz, hareket, indol oluşumu, H<sub>2</sub>S üretimi ve son olarak karbonhidrat kullanım testleri yapılmıştır.

Bazı izolatlar için, indol ve hareket sonuçları şekil 4’de ve şekil 5’de, karbon kaynaklarından asit ve gaz oluşum sonuçları ise şekil 7 ‘de verilmiştir.

Çalışmada elde edilen proteolitik izolatların biyokimyasal test sonuçları çizelge 23’de; karbon kaynaklarından asit gaz oluşum test sonuçları çizelge 24’de verilmiştir.

Buna göre çalışmamızda elde edilen proteaz aktivitesine sahip 50 izolatın % 44’ünün oksidaz pozitif, tamamının katalaz pozitif, % 38’inin indol pozitif , % 14’ünün H<sub>2</sub>S pozitif ve % 54’ünün hareketli bakteri olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. Bazı izolatlara ait indol pozitif ve negatif sonuçları.



Şekil 5. Bazı izolatlara ait SIM besiyerindeki hareketlilik testleri.



Çizelge 23. Proteolitik özellikteki izolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Testler				
	Oksidaz	Katalaz	Hareket	İndol	H <sub>2</sub> S
PS1	+	+	+	-	+
PS2	+	+	-	-	-
PS3	+	+	-	-	-
PS4	-	+	+	+	+
PS5	-	+	-	-	-
PS6	+	+	-	-	-
PS7	+	+	-	-	-
PS8	-	+	+	-	+
PS9	-	+	-	-	-
PS10	-	+	-	-	+
PS11	-	+	+	-	+
PS12	-	+	+	-	+
PS13	-	+	+	-	+
PL1	+	+	+	+	-
PL2	+	+	+	-	-
PL3	+	+	+	+	-
PL4	+	+	+	+	-
PL5	+	+	-	+	-
PL6	+	+	+	+	-
PL7	+	+	+	+	-
PL8	+	+	-	+	-
PL9	+	+	+	+	-
PL10	+	+	+	+	-
PL11	+	+	-	+	-
PL12	+	+	+	+	-
PL13	+	+	-	+	-
PL14	-	+	+	+	-
PL15	-	+	-	+	-
PL16	-	+	-	+	-
PD1	-	+	+	-	-
PD2	-	+	+	+	-
PD3	-	+	-	-	-
PD4	-	+	-	-	-
PD5	-	+	-	-	-
PD6	-	+	+	-	-
PD7	-	+	-	-	-
PD8	-	+	-	-	-
PD9	-	+	+	-	-
PD10	-	+	+	-	-
PD11	-	+	-	-	-
PD12	-	+	-	-	-
PD13	+	+	+	-	-
PD14	-	+	+	-	-
PD15	+	+	+	-	-
PD16	+	+	+	-	-
PD17	+	+	-	+	-
PD18	-	+	+	-	-
PD19	-	+	-	-	-
PD20	-	+	+	-	-
PD21	-	+	-	+	-

Çalışmada proteolitik izolatların karbonhidrat kullanım testleri %1 oranında glukoz, D-mannitol, fruktoz ve maltoz şekeri içeren NB besiyerlerinde tespit edilmiştir. Karbonhidratların parçalanması sonucunda asit oluşumunun tespiti için besiyerlerine pH indikatörü olarak brom timol mavisi eklenmiştir. Gaz oluşumunun belirlenmesi içinse durham tüpü ilave edilmiştir. Besiyerlerine eklenen indikatör nedeniyle besiyerleri alkali pH'larda mavi renk almıştır. inkübasyon sonunda besiyerlerinde oluşan sarı ve yeşil renk asit oluşumu pozitif, durham tüpü içerisindeki gaz birikimi ise gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Bazı proteolitik izolatlara ait karbonhidrat kullanım test sonuçları.

Çalışma sonucunda 37 izolatın glikozdan, 13 izolatın mannitolden, 19 izolatın fruktozdan ve 17 izolatın ise maltozdan asit ürettikleri belirlenmiştir. Diğer yandan 5 izolatın glikozdan, 5 izolatın mannitolden, 4 izolatın fruktozdan, 6 izolatın maltozdan hem asit hemde gaz oluşturduğu tespit edilmiştir ( Çizelge 24).

Çizelge 24. Proteolitik özellikteki izolatların karbonhidrat kullanım test sonuçları

İzolatlar	Karbon Kaynakları							
	Glikoz		Mannitol		Fruktoz		Maltoz	
	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz
PS1	+	-	+	-	+	-	+	-
PS2	-	-	-	-	-	-	-	-
PS3	+	-	-	-	-	-	+	+
PS4	+	-	+	-	+	-	+	-
PS5	+	-	+	+	+	+	+	+
PS6	+	-	-	-	+	-	+	-
PS7	-	-	-	-	-	-	-	-
PS8	+	-	+	+	+	-	+	+
PS9	+	-	+	-	-	-	-	-
PS10	+	+	+	-	+	+	+	+
PS11	+	+	+	+	+	+	-	-
PS12	+	-	+	+	+	-	+	+
PS13	+	+	+	+	+	-	+	+
PL1	-	-	-	-	-	-	-	-
PL2	+	-	-	-	-	-	-	-
PL3	+	-	-	-	-	-	-	-
PL4	-	-	-	-	-	-	-	-
PL5	-	-	-	-	-	-	-	-
PL6	+	-	-	-	-	-	-	-
PL7	-	-	-	-	-	-	-	-
PL8	+	+	-	-	-	-	-	-
PL9	+	-	-	-	-	-	-	-
PL10	-	-	-	-	-	-	-	-
PL11	-	-	-	-	-	-	-	-
PL12	-	-	-	-	-	-	-	-
PL13	-	-	-	-	-	-	-	-
PL14	+	+	+	-	+	-	+	-
PL15	-	-	-	-	-	-	-	-
PL16	+	-	-	-	+	-	+	-
PD1	-	-	-	-	-	-	-	-
PD2	+	-	-	-	+	-	+	-
PD3	+	-	-	-	-	-	-	-
PD4	+	-	-	-	-	-	-	-
PD5	-	-	-	-	-	-	-	-
PD6	+	-	-	-	-	-	+	-
PD7	+	-	-	-	-	-	-	-
PD8	+	-	-	-	-	-	-	-
PD9	+	-	-	-	-	-	-	-
PD10	+	-	-	-	+	-	-	-
PD11	+	-	-	-	-	-	-	-
PD12	+	-	-	-	-	-	-	-
PD13	+	-	+	-	+	+	-	-
PD14	+	-	-	-	-	-	-	-
PD15	+	-	+	-	+	-	+	-
PD16	+	-	+	-	+	-	+	-
PD17	+	-	-	-	+	-	+	-
PD18	+	-	-	-	-	-	+	-
PD19	+	-	-	-	-	-	-	-
PD20	+	-	-	-	+	-	-	-
PD21	+	-	-	-	+	-	-	-

**4.1.1.4. İzolatların fizyolojik büyüme gereksinimi**

Çalışmada proteolitik özellikteki izolatların fizyolojik büyüme gereksinimlerinin belirlenmesinde; izolatların tuz, pH ve sıcaklık toleransları incelenmiştir. Çalışmada izolatlara ait tuz tolerans sonuçları çizelge 25’de; pH tolerans sonuçları çizelge 26’da ve sıcaklık tolerans sonuçları ise çizelge 27’de verilmiştir.

**4.1.1.4.1. İzolatların tuz toleransları**

Proteolitik özellikteki izolatların tuz toleranslarının belirlenmesinde NaCl içermeyen ortamlardan izole edilen 50 izolatdan, 28’sinin % 5 NaCl konsantrasyonunda, 9’unun % 5 ve % 10 NaCl konsantrasyonlarında ve 13’ünün ise çalışmada kullanılan tüm NaCl konsantrasyonlarında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 25).

**4.1.1.4.2. İzolatların pH toleransları**

pH toleranslarının incelenmesinde proteolitik özellikteki 50 adet izolatdan, 13’ünün pH 7-9 aralığında, 18’inin pH 7-10 aralığında, 15’inin pH 9-12 aralığında, 1’inin pH 10-12 aralığında, 3’ünün ise pH 8-11 aralığında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 26).

**4.1.1.4.3. İzolatların sıcaklık toleransları**

Proteolitik özellikteki izolatların sıcaklık toleranslarının incelenmesinde elde edilen 50 adet izolatdan, 27’sinin 27-55 °C; 21’inin 27-50°C aralığında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PS13 ve PD 20 izolatlarının söz konusu sıcaklıklarda gelişim gösteremedikleri belirlenirken; izolatların tamamının optimum gelişim sıcaklıkları 37 °C olarak belirlenmiştir (Çizelge 27).

Çizelge 25. Proteolitik özellikteki izolatların tuz toleransları

İzolatlar	Tuz Konsantrasyonu (%)							
	5 %		10 %		15 %		20 %	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
PS1	+	+	+	+	+	+	+	+
PS2	+	+	+	+	+	+	+	+
PS3	+	+	+	+	+	-	-	-
PS4	+	+	+	-	+	-	-	-
PS5	+	+	+	+	+	-	-	-
PS6	+	+	+	+	+	+	+	+
PS7	+	+	+	+	+	+	+	+
PS8	+	+	+	+	+	-	+	-
PS9	+	+	+	+	+	+	+	+
PS10	+	+	-	-	-	-	-	-
PS11	+	+	+	+	+	+	+	+
PS12	+	+	+	+	+	+	+	+
PS13	+	+	-	-	-	-	-	-
PL1	+	+	+	-	+	-	-	-
PL2	+	+	+	-	+	-	-	-
PL3	+	+	+	-	+	-	-	-
PL4	+	+	+	-	+	-	-	-
PL5	+	+	+	-	+	-	-	-
PL6	+	+	+	-	+	-	-	-
PL7	+	+	+	-	+	-	-	-
PL8	+	+	+	+	+	-	-	-
PL9	+	+	+	+	+	-	-	-
PL10	+	+	+	-	+	-	-	-
PL11	+	+	+	-	+	-	-	-
PL12	+	+	+	-	+	-	-	-
PL13	+	+	+	+	+	-	-	-
PL14	+	+	+	+	-	-	-	-
PL15	+	+	+	+	+	+	+	+
PL16	+	+	-	-	-	-	-	-
PD1	+	+	-	-	-	-	-	-
PD2	+	+	-	-	-	-	-	-
PD3	+	+	+	+	+	-	+	-
PD4	+	+	+	+	+	-	-	-
PD5	+	+	-	-	-	-	-	-
PD6	+	+	-	-	-	-	-	-
PD7	+	+	+	-	+	-	+	-
PD8	+	+	+	+	+	+	+	+
PD9	+	+	+	+	+	+	+	+
PD10	+	+	+	-	-	-	-	-
PD11	+	+	+	-	+	-	+	-
PD12	+	+	+	-	+	-	+	-
PD13	+	+	+	-	+	-	+	-
PD14	+	+	+	+	+	+	+	+
PD15	+	+	+	-	+	-	+	-
PD16	+	+	+	-	+	-	-	-
PD17	+	+	-	-	-	-	-	-
PD18	+	+	+	+	+	+	+	+
PD19	+	+	+	-	+	-	+	-
PD20	+	+	-	-	-	-	-	-
PD21	+	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 26. Proteolitik özellikteki izolatların pH toleransları

İzolatlar	pH Değerleri											
	pH7		pH8		pH9		pH10		pH11		pH12	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
PS1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PS12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PS13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PL1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL11	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PL12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL14	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL15	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PL16	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PD1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PD3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PD6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PD12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PD19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PD21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Çizelge 27. Proteolitik özellikteki izolatların sıcaklık toleransları

İzolatlar	Sıcaklık Değerleri							
	27 °C		45 °C		50 °C		55 °C	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
PS1	+	+	+	+	+	+	+	+
PS2	+	+	+	+	+	+	+	+
PS3	+	+	+	+	+	+	+	+
PS4	+	+	+	+	+	+	-	-
PS5	+	+	+	+	+	+	+	+
PS6	+	+	+	+	+	+	+	+
PS7	+	+	+	+	+	+	+	+
PS8	+	+	+	+	+	+	+	+
PS9	+	+	+	+	+	+	+	+
PS10	+	+	+	+	+	+	-	-
PS11	+	+	+	+	+	+	+	+
PS12	+	+	+	+	+	+	+	+
PS13	-	-	-	-	-	-	-	-
PL1	+	+	+	+	+	+	-	-
PL2	+	+	+	+	+	+	-	-
PL3	+	+	+	+	+	+	-	-
PL4	+	+	+	+	+	+	-	-
PL5	+	+	+	+	+	+	-	-
PL6	+	+	+	+	+	+	-	-
PL7	+	+	+	+	+	+	-	-
PL8	+	+	+	+	+	+	-	-
PL9	+	+	+	+	+	+	-	-
PL10	+	+	+	+	+	+	-	-
PL11	+	+	+	+	+	+	-	-
PL12	+	+	+	+	+	+	-	-
PL13	+	+	+	+	+	+	-	-
PL14	+	+	+	+	+	+	-	-
PL15	+	+	+	+	+	+	-	-
PL16	+	+	+	+	+	+	+	+
PD1	+	+	+	+	+	+	-	-
PD2	+	+	+	+	+	+	-	-
PD3	+	+	+	+	+	+	+	+
PD4	+	+	+	+	+	+	+	+
PD5	+	+	+	+	+	+	+	+
PD6	+	+	+	+	+	+	-	-
PD7	+	+	+	+	+	+	+	+
PD8	+	+	+	+	+	+	+	+
PD9	+	+	+	+	+	+	+	+
PD10	+	+	+	+	+	+	+	+
PD11	+	+	+	+	+	+	+	+
PD12	+	+	+	+	+	+	+	+
PD13	+	+	+	+	+	+	+	+
PD14	+	+	+	+	+	+	+	+
PD15	+	+	+	+	+	+	+	+
PD16	+	+	+	+	+	+	+	+
PD17	+	+	+	+	+	+	-	-
PD18	+	+	+	+	+	+	+	+
PD19	+	+	+	+	+	+	+	+
PD20	-	-	-	-	-	-	-	-
PD21	+	+	+	+	+	+	+	+

## 4.1.1.5. Nicel proteaz enzim aktivitesi sonuçları

Çalışmada fenotipik özellikleri belirlenen, proteolitik özellikteki 50 izolatdan en iyi nitel proteaz aktivitesine sahip birbirinden farklı 12 izolat seçilmiştir. Seçilen bu izolatların nicel proteaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Nicel proteaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak kazein kullanılmıştır. Aktivite ölçümleri izolat gelişiminin 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ve 30. saatlerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılan her izolat için büyüme eğrileri çıkartılmış ve elde edilen aktivite bulgularıyla karşılaştırılmıştır. İzolatların çoğunluğu gelişimlerinin logaritmik fazını karşılayan saatlerde enzim aktivitesi göstermişlerdir. Proteaz enzim aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 28’de verilmiştir.

Çizelge 28. Proteaz aktivitesi ölçüm bulguları

İzolat no	Enzim Aktivitesi (U/mL) ( $\bar{X} \pm S_x$ )									
	3. Saat	6. Saat	9. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	21. Saat	24. Saat	27. Saat	30. Saat
PS4	0,05± 0,02	0,28± 0,02	2,39± 0,17	1,03± 0,05	0,57± 0,09	0,25± 0,10	0,11± 0,10	0,52± 0,04	0,19± 0,04	0,02± 0,01
PS6	0,18± 0,05	1,21± 0,60	1,76± 0,05	2,12± 0,05	2,19± 0,20	3,05± 0,15	4,40± 0,10	3,54± 0,27	2,67± 0,06	2,24± 0,13
PS11	0,03± 0,03	0,85± 0,09	0,33± 0,20	1,13± 0,02	1,66± 0,01	1,16± 0,04	0,75± 0,02	4,24± 0,90	0,80± 0,14	0,88± 0,02
PS13	0,18± 0,01	0,21± 0,08	3,74± 0,04	0,73± 0,01	1,14± 0,01	1,70± 0,82	1,60± 0,11	1,63± 0,10	0,16± 0,02	0,17± 0,01
PL7	0,01± 0,01	0,02± 0,01	0,01± 0,01	0,07± 0,01	0,07± 0,01	0,28± 0,01	0,79± 0,90	0,63± 0,03	0,34± 0,03	0,18± 0,01
PL8	0,01± 0,01	0,06± 0,02	0,11± 0,01	0,12± 0,01	0,15± 0,01	0,21± 0,01	0,40± 0,05	0,81± 0,01	0,70± 0,02	0,43± 0,01
PL9	0,01± 0,01	0,02± 0,01	0,04± 0,01	0,07± 0,01	0,12± 0,01	0,20± 0,01	0,36± 0,06	0,77± 0,07	0,69± 0,01	0,51± 0,01
PL11	0,01± 0,01	0,02± 0,01	0,05± 0,01	0,20± 0,01	0,35± 0,01	0,04± 0,01	0,03± 0,01	0,03± 0,01	0,03± 0,01	0,01± 0,01
PL13	0,01± 0,01	0,04± 0,01	0,05± 0,01	0,05± 0,01	0,06± 0,01	0,09± 0,01	0,12± 0,06	0,96± 0,07	0,60± 0,02	0,04± 0,03
PD2	0,05± 0,03	0,90± 0,03	0,69± 0,01	0,38± 0,03	0,34± 0,02	0,27± 0,03	0,20± 0,02	0,56± 0,01	0,34± 0,05	0,27± 0,02
PD8	0,03± 0,02	0,03± 0,01	0,04± 0,01	0,05± 0,01	0,10± 0,02	0,19± 0,04	0,25± 0,03	0,14± 0,02	0,08± 0,01	0,03± 0,02
PD11	0,06± 0,03	0,07± 0,02	0,03± 0,02	0,06± 0,02	0,12± 0,01	0,15± 0,01	0,22± 0,01	0,32± 0,02	0,18± 0,01	0,10± 0,03

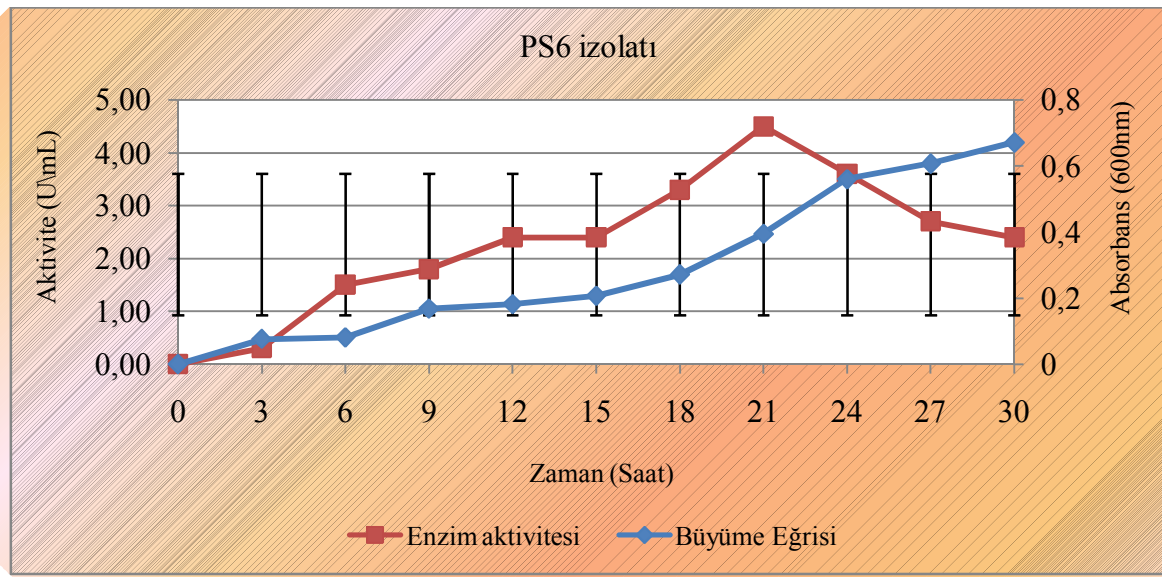


Yöntemde belirtilen reaksiyon koşullarında ıslatma-yumuşatma işlem basamağından elde edilen 4 izolatdan PS6 izolatının  $4,40 \pm 0,10$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Kireçlik işlem basamağından elde edilen PL13 izolatının  $0,96 \pm 0,07$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile aynı işlem basamağından elde edilen diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kireç giderme-sama işlem basamağından elde edilen 3 izolatdan PD2 izolatının  $0,90 \pm 0,03$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile diğer 2 izolata göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmada kullanılan 12 izolattan PS6 izolatının  $4,40 \pm 0,10$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile diğer izolatlardan daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan proteolitik özellikteki izolatlardan en yüksek enzim aktivitesine sahip PS6 izolatının büyüme eğrisiyle birlikte proteaz aktivitesinin 3 saatlik değişim grafiği şekil 7' de verilmiştir.



Şekil 7. PS6 izolatının büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesinin 3'er saatlik değişimi.

Şekil 7 incelendiğinde PS6 izolatının en yüksek enzim aktivitesine 21. saatte ulaştığı ve 24. saatten itibaren enzim aktivitesinin düşmeye başladığı tespit edilmiştir. Büyüme grafiği incelendiğinde ise en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü ve aktivitenin düşmeye başladığı zamanların her ikisinde bakteri gelişiminin logaritmik evresinde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada izolatın enzim aktivitesinin logaritmik evrede düşüşe geçmesi; izolatın gelişimini tamamlayamadan besiyerindeki substratı tükettiğini düşündürmüştür. Diğer yandan hücre artışının devam etmesi ise besiyeri içeriğindeki yeast extractın varlığına bağlanmıştır. Nitekim bu sonuç ile besiyeri ortamındaki substrat miktarının arttırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

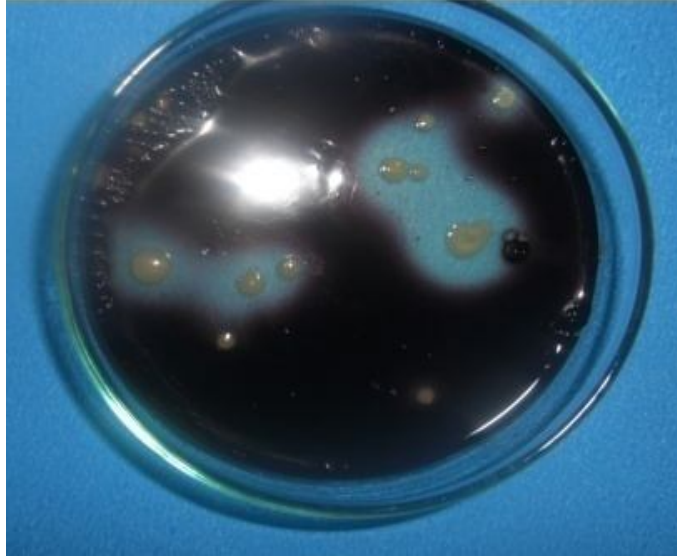
Sonuç olarak çalışmada nicel enzim aktiviteleri belirlenen proteolitik özellikteki izolatların tamamının, ekstraselüler proteaz enzimi ürettiği belirlenmiş ve izolatların potansiyel enzim aktiviteleri ortaya konmuştur.

#### **4.1.2. Amilaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları**

##### **4.1.2.1. İzolatların elde edilmesi**

Çalışmada ıslatma-yumuşatma, kireçlik ve kireç giderme-sama proselerinden izole edilen amilolitik izolatlar, Horikoshi II besiyerlerinde koloni etrafında oluşturdukları şeffaf zon varlıklarına göre seçilmiştir.

Amilaz enzim aktivitesine sahip bazı bakteri izolatlarının besiyerinde oluşturdukları amilolitik zonlar şekil 8’de verilmiştir.



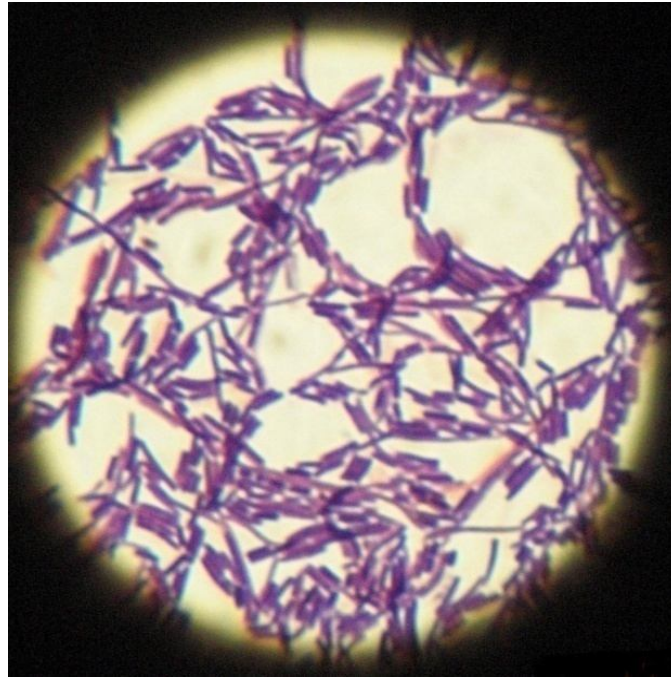
Şekil 8. Amilaz enzim aktivitesine sahip kolonilerin petri görüntüsü.

Çalışmada ıslatma yumuşatma prosesinden (pH 8) 16 adet, kireçlik prosesinden (pH 11) 21 adet ve kireç giderme-sama prosesinden (pH 9) 15 adet olmak üzere toplamda 52 adet  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesine sahip bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatlara izole edildikleri işlem basamağına göre kod numarası verilmiştir.

Buna göre kodlarda yer alan S harfi ıslatma-yumuşatma, L harfi kireçlik ve D harfi kireç giderme-sama basamağını temsil ederken; A harfi bakterinin sahip olduğu amilaz enzim aktivitesini temsil etmektedir.

#### **4.1.2.2. İzolatların mikroskopik özellikleri**

Araştırmada elde edilen amilolitik özellikteki bakterilere öncelikle Gram boyama yapılarak kültürlerin saflıkları kontrol edilmiş; morfolojik özellikleri ve endospor oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. Buna göre elde edilen izolatların tamamının saf endospor oluşturma yeteneğine sahip Gram pozitif basil oldukları belirlenmiştir. Gram boyama sonucu AS6 izolatının mikroskopik görüntüsü şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. AS6 izolatının ışık mikroskobu görüntüsü (10X100).

Çalışmadan elde edilen izolatlar ve morfolojik inceleme sonuçları sırasıyla çizelge 29, çizelge 30, çizelge 31’ de verilmiştir.

Çizelge 29. İslatma yumuşatma işlem basamağında elde edilen izolatlar.

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
AS1	+	Basil	+
AS2	+	Basil	+
AS3	+	Basil	+
AS4	+	Basil	+
AS5	+	Basil	+
AS6	+	Basil	+
AS7	+	Basil	+
AS8	+	Basil	+
AS9	+	Basil	+
AS10	+	Basil	+
AS11	+	Basil	+
AS12	+	Basil	+
AS13	+	Basil	+
AS14	+	Basil	+
AS15	+	Basil	+
AS16	+	Basil	+

Çizelge 30. Kireçlik işlem basamağında elde edilen izolatlar.

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
AL1	+	Basil	+
AL2	+	Basil	+
AL3	+	Basil	+
AL4	+	Basil	+
AL5	+	Basil	+
AL6	+	Basil	+
AL7	+	Basil	+
AL8	+	Basil	+
AL9	+	Basil	+
AL10	+	Basil	+
AL11	+	Basil	+
AL12	+	Basil	+
AL13	+	Basil	+
AL14	+	Basil	+
AL15	+	Basil	+
AL16	+	Basil	+
AL17	+	Basil	+
AL18	+	Basil	+
AL19	+	Basil	+
AL20	+	Basil	+
AL21	+	Basil	+

Çizelge 31. Kireç giderme ve sama işlem basamağından elde edilen izolatlar.

İzolatlar	Gram Boyama	Hücre şekli	Spor varlığı
AD1	+	Basil	+
AD2	+	Basil	+
AD3	+	Basil	+
AD4	+	Basil	+
AD5	+	Basil	+
AD6	+	Basil	+
AD7	+	Basil	+
AD8	+	Basil	+
AD9	+	Basil	+
AD10	+	Basil	+
AD11	+	Basil	+
AD12	+	Basil	+
AD13	+	Basil	+
AD14	+	Basil	+
AD15	+	Basil	+

#### 4.1.2.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri

Çalışmada morfolojileri belirlenen amilolitik izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde sırasıyla oksidaz, katalaz, hareket, indol oluşumu, H<sub>2</sub>S üretimi ve karbonhidrat kullanım testleri yapılmıştır.

Çalışmada elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesine sahip izolatların biyokimyasal test sonuçları çizelge 32’de; karbon kaynaklarından asit ve gaz oluşum test sonuçları ise çizelge 33’de verilmiştir. Ayrıca bazı amilolitik özellikteki izolatlara ait karbon kaynaklarından asit ve gaz oluşum sonuçları şekil 10’da verilmiştir.

Buna göre çalışmamızda elde edilen amilolitik özellikteki 52 izolatın % 82,7’sinin oksidaz pozitif, tamamının katalaz pozitif, % 25’inin indol pozitif, tamamının H<sub>2</sub>S negatif ve % 59,6’sının hareketli bakteri olduğu belirlenmiştir (Çizelge 32).

Çalışmada amilolitik izolatların karbonhidrat kullanım testleri için yöntemde belirtildiği üzere besiyerlerine pH indikatörü ve gaz oluşumunun belirlenmesi için durham tüpü ilave edilmiştir. inkübasyon sonunda besiyerlerinde oluşan sarı ve yeşil renk asit oluşumu pozitif, durham tüpü içerisindeki gaz birikimi ise gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 10).

Yapılan karbonhidrat kullanım testleri sonucunda 32 izolatın glikozdan, 24 izolatın mannitolden, 29 izolatın fruktozdan ve 27 izolatın maltozdan asit ürettikleri belirlenmiştir. Diğer yandan 3 izolatın glikozdan, 1 izolatın mannitolden, 6 izolatın fruktozdan, 15 izolatın maltozdan hem asit hemde gaz oluşturduğu tespit edilmiş (Çizelge 33).

Çizelge 32. Amilolitik özellikteki izolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Testler				
	Oksidaz	Katalaz	Hareket	İndol	H <sub>2</sub> S
AS1	-	+	+	-	-
AS2	+	+	+	-	-
AS3	+	+	+	-	-
AS4	+	+	+	-	-
AS5	-	+	+	-	-
AS6	+	+	+	-	-
AS7	+	+	+	-	-
AS8	+	+	+	-	-
AS9	+	+	+	-	-
AS10	+	+	+	-	-
AS11	+	+	+	-	-
AS12	-	+	-	-	-
AS13	+	+	-	-	-
AS14	+	+	+	-	-
AS15	+	+	+	-	-
AS16	+	+	+	-	-
AL1	+	+	+	-	-
AL2	-	+	+	-	-
AL3	+	+	+	-	-
AL4	+	+	+	-	-
AL5	+	+	-	+	-
AL6	-	+	-	-	-
AL7	+	+	+	-	-
AL8	+	+	-	+	-
AL9	+	+	+	+	-
AL10	+	+	+	+	-
AL11	+	+	-	+	-
AL12	+	+	+	+	-
AL13	+	+	+	-	-
AL14	+	+	+	-	-
AL15	+	+	-	+	-
AL16	+	+	+	+	-
AL17	+	+	-	+	-
AL18	+	+	-	-	-
AL19	+	+	-	+	-
AL20	-	+	-	+	-
AL21	-	+	-	+	-
AD1	+	+	+	-	-
AD2	-	+	+	+	-
AD3	+	+	-	-	-
AD4	+	+	-	-	-
AD5	+	+	+	-	-
AD6	-	+	-	-	-
AD7	+	+	-	-	-
AD8	+	+	+	-	-
AD9	+	+	-	-	-
AD10	+	+	-	-	-
AD11	+	+	+	-	-
AD12	+	+	-	-	-
AD13	+	+	-	-	-
AD14	+	+	+	-	-
AD15	+	+	-	-	-

Çizelge 33. Amilolitik özellikteki izolatların karbonhidrat kullanım test sonuçları

İzolatlar	Karbon Kaynakları							
	Glikoz		Mannitol		Fruktoz		Maltoz	
	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz
AA1	-	-	-	-	-	-	-	-
AA2	+	-	-	-	-	-	+	+
AA3	+	-	+	-	+	-	+	+
AA4	+	-	+	-	+	-	+	-
AA5	+	-	-	-	+	-	+	-
AA6	+	-	+	-	+	-	+	-
AA7	+	-	+	-	+	-	+	-
AA8	+	-	+	-	+	+	-	-
AA9	+	-	+	-	+	-	+	+
AA10	+	-	+	-	+	-	+	-
AA11	+	-	+	-	+	-	+	+
AA12	+	-	+	-	+	-	+	+
AA13	+	-	-	-	-	-	-	-
AA14	+	-	+	-	+	+	+	+
AA15	+	-	+	-	+	-	+	+
AA16	+	-	-	-	-	-	+	+
AB1	-	-	-	-	-	-	-	-
AB2	-	-	-	-	-	-	-	-
AB3	-	-	+	-	+	+	-	-
AB4	-	-	-	-	-	-	-	-
AB5	-	-	-	-	-	-	-	-
AB6	-	-	-	-	-	-	-	-
AB7	-	-	-	-	-	-	-	-
AB8	-	-	-	-	-	-	-	-
AB9	-	-	-	-	-	-	-	-
AB10	-	-	-	-	-	-	-	-
AB11	-	-	-	-	-	-	-	-
AB12	-	-	-	-	-	-	-	-
AB13	-	-	-	-	-	-	-	-
AB14	-	-	-	-	-	-	-	-
AB15	-	-	-	-	-	-	-	-
AB16	-	-	-	-	-	-	-	-
AB17	-	-	-	-	+	+	-	-
AB18	-	-	-	-	-	-	-	-
AB19	-	-	-	-	-	-	-	-
AB20	+	+	-	-	+	-	-	-
AB21	+	+	-	-	-	-	+	-
AC1	+	-	+	-	+	-	+	-
AC2	+	-	-	-	-	-	-	-
AC3	+	-	+	-	+	-	+	+
AC4	+	-	+	-	+	-	+	-
AC5	+	-	+	-	+	-	+	-
AC6	+	+	+	+	+	+	+	+
AC7	+	-	+	-	+	+	-	-
AC8	+	-	+	-	+	-	+	+
AC9	+	-	-	-	+	-	+	+
AC10	+	-	-	-	+	-	+	+
AC11	+	-	+	-	+	-	+	+
AC12	+	-	+	-	+	-	+	+
AC13	+	-	+	-	+	-	+	-
AC14	+	-	+	-	+	-	+	-
AC15	+	-	+	-	+	-	+	-



Şekil 10. Bazı amilolitik izolatlara ait karbonhidrat kullanım test sonuçları.

#### **4.1.2.4. İzolatların fizyolojik büyüme gereksinimi**

Çalışmada amilolitik özellikteki izolatların fizyolojik büyüme gereksinimlerinin belirlenmesinde; izolatların tuz, pH ve sıcaklık toleransları incelenmiştir. Çalışmada izolatlara ait tuz tolerans sonuçları çizelge 34’de; pH tolerans sonuçları çizelge 35’de ve sıcaklık tolerans sonuçları ise çizelge 36’da verilmiştir.

##### **4.1.2.4.1. İzolatların tuz toleransları**

Çalışmada NaCl içermeyen ortamlardan izole edilen 52 izolatdan, 29’unun % 5 NaCl konsantrasyonunda, 2’inin % 5 ve % 10 NaCl konsantrasyonlarında ve 2’sinin % 5, % 10, % 15 ve % 20 NaCl konsantrasyonlarında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 34).

##### **4.1.2.4.2. İzolatların pH toleransları**

Çalışmada amilolitik özellikteki 52 izolatdan, 21’inin pH 7-10 aralığında, 6’sının pH 7-9 aralığında, 4’ünün pH 7-11 aralığında, 5’inin pH 10-11 aralığında, 10’unun pH 9-12 aralığında, 6’sının pH 10-12 aralığında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 35).

##### **4.1.2.4.3. İzolatların sıcaklık toleransları**

Buna göre amilolitik özellikteki izolatların 15’inin 27°C’de, 6’sının 27-45°C aralığında ve 31’inin 27-55°C aralığında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatların optimum gelişim sıcaklığı ise 37 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 36).



Çizelge 34. Amilolitik özellikteki izolatların tuz toleransları

İzolatlar	Tuz Konsantrasyonu (%)							
	5 %		10 %		15 %		20 %	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
AS1	+	+	+	+	-	-	-	-
AS2	+	+	+	+	-	-	-	-
AS3	+	+	-	-	-	-	-	-
AS4	+	+	-	-	-	-	-	-
AS5	+	+	+	-	-	-	-	-
AS6	+	+	-	-	-	-	-	-
AS7	+	+	-	-	-	-	-	-
AS8	+	+	+	-	-	-	-	-
AS9	+	+	+	+	-	-	-	-
AS10	+	+	+	+	-	-	-	-
AS11	+	+	+	-	-	-	-	-
AS12	+	+	+	-	-	-	-	-
AS13	+	+	+	-	-	-	-	-
AS14	+	+	+	+	-	-	-	-
AS15	+	+	+	+	-	-	-	-
AS16	+	+	+	+	-	-	-	-
AL1	+	+	+	-	-	-	-	-
AL2	+	+	+	-	-	-	-	-
AL3	+	+	+	+	-	-	-	-
AL4	+	+	+	+	-	-	-	-
AL5	+	+	+	+	-	-	-	-
AL6	+	+	+	+	-	-	-	-
AL7	+	+	-	-	-	-	-	-
AL8	+	+	+	+	-	-	-	-
AL9	+	+	+	+	-	-	-	-
AL10	+	+	+	+	-	-	-	-
AL11	+	+	+	+	-	-	-	-
AL12	+	+	+	+	-	-	-	-
AL13	+	+	-	-	-	-	-	-
AL14	+	+	+	+	-	-	-	-
AL15	+	+	-	-	-	-	-	-
AL16	+	+	+	+	-	-	-	-
AL17	+	+	+	+	-	-	-	-
AL18	+	+	+	+	+	+	+	+
AL19	+	+	+	+	-	-	-	-
AL20	+	+	+	+	-	-	-	-
AL21	+	+	+	+	+	+	+	+
AD1	+	+	+	-	-	-	-	-
AD2	+	+	-	-	-	-	-	-
AD3	+	+	+	-	-	-	-	-
AD4	+	+	-	-	-	-	-	-
AD5	+	+	-	-	-	-	-	-
AD6	+	+	-	-	-	-	-	-
AD7	+	+	-	-	-	-	-	-
AD8	+	+	-	-	-	-	-	-
AD9	+	+	-	-	-	-	-	-
AD10	+	+	-	-	-	-	-	-
AD11	+	+	-	-	-	-	-	-
AD12	+	+	+	-	-	-	-	-
AD13	+	+	-	-	-	-	-	-
AD14	+	+	-	-	-	-	-	-
AD15	+	+	-	-	-	-	-	-

Çizelge 35. Amilolitik özellikteki izolatların pH toleransları

İzolatlar	pH Değerleri											
	pH7		pH8		pH9		pH10		pH11		pH12	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
AS1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AS3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AS4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AS5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AS6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AS7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AS9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AS10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AS11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AS15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AS16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AL1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AL2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AL3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AL5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AL7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL14	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AL16	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL17	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL18	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL20	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AL21	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AD1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AD15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Çizelge 36 . Amilolitik özellikteki izolatların sıcaklık toleransları

İzolatlar	Sıcaklık Değerleri							
	27 °C		45 °C		50 °C		55 °C	
	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı	Üreme	Zon Varlığı
AS1	+	+	+	+	-	-	-	-
AS2	+	+	+	+	+	+	+	+
AS3	+	+	+	+	+	+	+	+
AS4	+	+	+	+	+	+	+	+
AS5	+	+	-	-	-	-	-	-
AS6	+	+	-	-	-	-	-	-
AS7	+	+	-	-	-	-	-	-
AS8	+	+	+	+	+	+	+	+
AS9	+	+	-	-	-	-	-	-
AS10	+	+	+	+	+	+	+	+
AS11	+	+	+	+	+	+	+	+
AS12	+	+	+	+	+	+	+	+
AS13	+	+	+	+	+	+	+	+
AS14	+	+	+	+	+	+	+	+
AS15	+	+	+	+	+	+	+	+
AS16	+	+	+	+	-	-	-	-
AL1	+	+	-	-	-	-	-	-
AL2	+	+	-	-	-	-	-	-
AL3	+	+	+	+	+	+	+	+
AL4	+	+	-	-	-	-	-	-
AL5	+	+	+	+	-	-	-	-
AL6	+	+	-	-	-	-	-	-
AL7	+	+	-	-	-	-	-	-
AL8	+	+	+	+	-	-	-	-
AL9	+	+	+	+	+	+	+	+
AL10	+	+	+	+	+	+	+	+
AL11	+	+	+	+	-	-	-	-
AL12	+	+	+	+	-	-	-	-
AL13	+	+	-	-	-	-	-	-
AL14	+	+	+	+	+	+	+	+
AL15	+	+	-	-	-	-	-	-
AL16	+	+	+	+	+	+	+	+
AL17	+	+	+	+	+	+	+	+
AL18	+	+	+	+	+	+	+	+
AL19	+	+	+	+	+	+	+	+
AL20	+	+	-	-	-	-	-	-
AL21	+	+	+	+	+	+	+	+
AD1	+	+	+	+	+	+	+	+
AD2	+	+	-	-	-	-	-	-
AD3	+	+	+	+	+	+	+	+
AD4	+	+	+	+	+	+	+	+
AD5	+	+	+	+	+	+	+	+
AD6	+	+	+	+	+	+	+	+
AD7	+	+	+	+	+	+	+	+
AD8	+	+	+	+	+	+	+	+
AD9	+	+	+	+	+	+	+	+
AD10	+	+	+	+	+	+	+	+
AD11	+	+	-	-	-	-	-	-
AD12	+	+	-	-	-	-	-	-
AD13	+	+	+	+	+	+	+	+
AD14	+	+	+	+	+	+	+	+
AD15	+	+	+	+	+	+	+	+

#### 4.1.2.5. Nicel amilaz enzim aktivitesi sonuçları

Araştırmamızda nitel  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi belirlenen 52 izolatdan, en iyi nitel enzim aktivitesine sahip birbirinden farklı 10 adet izolat seçilmiştir. Seçilen bu izolatların nicel  $\alpha$ -amilaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

İzolatların nicel enzim aktivitelerinin belirlenmesinde substrat olarak nişasta kullanılmıştır. Aktivite ölçümleri izolat gelişiminin 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ve 30. saatlerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılan her izolat için büyüme eğrileri çıkartılmış ve elde edilen aktivite bulgularıyla karşılaştırılmıştır. İzolatların çoğunluğu gelişimlerinin logaritmik fazını karşılayan saatlerde enzim aktivitesi göstermişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz enzim aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 37’de verilmiştir.

Çizelge 37.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi ölçüm bulguları

İzolat no	Enzim Aktivitesi (U/mL) ( $\bar{X} \pm S_x$ )									
	3. Saat	6. Saat	9. Saat	12. Saat	15. Saat	18. Saat	21. Saat	24. Saat	27. Saat	30. Saat
AS3	0,28± 0,01	0,47± 0,01	0,53± 0,01	0,69± 0,02	0,60± 0,04	0,45± 0,02	0,45± 0,02	0,35± 0,03	0,20± 0,01	0,16± 0,06
AS6	0,36± 0,01	0,41± 0,01	0,56± 0,04	0,72± 0,04	0,76± 0,01	0,56± 0,04	0,53± 0,01	0,52± 0,00	0,45± 0,01	0,35± 0,01
AS7	0,52± 0,06	0,55± 0,01	0,55± 0,05	0,70± 0,01	0,73± 0,01	0,64± 0,02	0,60± 0,02	0,57± 0,10	0,49± 0,03	0,42± 0,03
AL3	0,39± 0,06	0,45± 0,01	0,50± 0,02	0,57± 0,03	0,61± 0,02	0,62± 0,02	0,52± 0,03	0,49± 0,06	0,44± 0,04	0,33± 0,01
AL12	0,03± 0,01	0,06± 0,01	0,07± 0,01	0,08± 0,01	0,09± 0,01	0,10± 0,01	0,20± 0,01	0,10± 0,01	0,10± 0,01	0,09± 0,01
AL17	0,24± 0,04	0,32± 0,03	0,33± 0,05	0,31± 0,04	0,23± 0,01	0,29± 0,02	0,25± 0,02	0,27± 0,01	0,29± 0,01	0,27± 0,01
AL18	0,06± 0,03	0,12± 0,07	0,10± 0,01	0,17± 0,01	0,18± 0,03	0,13± 0,01	0,10± 0,01	0,09± 0,01	0,08± 0,01	0,08± 0,01
AD3	0,14± 0,03	0,22± 0,01	0,28± 0,07	0,29± 0,03	0,32± 0,02	0,28± 0,02	0,27± 0,03	0,23± 0,01	0,14± 0,03	0,11± 0,01
AD8	0,15± 0,03	0,20± 0,03	0,28± 0,08	0,33± 0,00	0,37± 0,01	0,28± 0,03	0,26± 0,06	0,23± 0,02	0,22± 0,02	0,21± 0,08
AD11	0,17± 0,03	0,18± 0,04	0,24± 0,06	0,28± 0,05	0,30± 0,01	0,29± 0,05	0,28± 0,05	0,25± 0,05	0,21± 0,08	0,17± 0,15

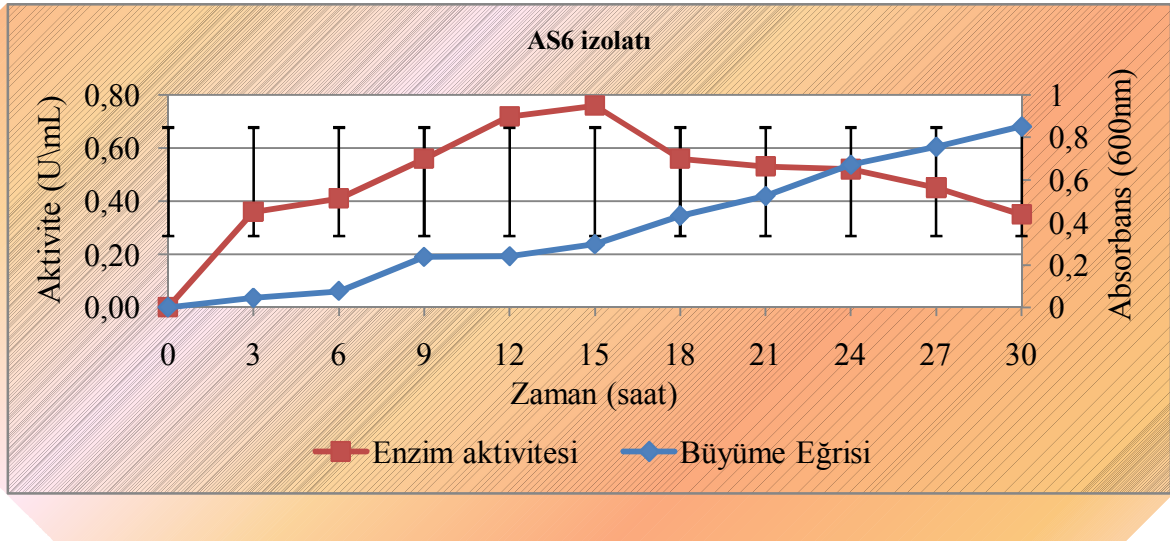
Islatma-yumuşatma işlem basamağından elde edilen 3 izolatdan AS6 izolatının 0,76 ± 0,01 U/mL’lik enzim aktivitesi ile diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Kireçlik işlem basamağından elde edilen AL3 izolatının  $0,62 \pm 0,02$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile aynı işlem basamağından elde edilen diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kireç giderme-sama işlem basamağından elde edilen 3 izolatdan AD8 izolatının  $0,37 \pm 0,01$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile diğer 2 izolata göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak yöntemde belirtilen reaksiyon koşullarında çalışmada kullanılan 10 izolattan, AS6 izolatının gelişiminin 15. saatin de ulaştığı  $0,76 \pm 0,01$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan amilolitik özellikteki izolatlardan en yüksek enzim aktivitesine sahip AS6 izolatının büyüme eğrisiyle birlikte  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin 3 saatlik değişim grafiği şekil 11' de verilmiştir.



Şekil 11. AS6 izolatının büyüme eğrisi ve  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin 3'er saatlik değişimi.

Şekil 13 incelendiğinde AS6 izolatın en yüksek enzim aktivitesine 15. saatte ulaştığı ve daha sonra enzim aktivitesinin düşmeye başladığı belirlenmiştir. Büyüme grafiği incelendiğinde ise en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü ve aktivitenin düşmeye başladığı zamanların büyüme grafiğinin logaritmik evresinde olduğu tespit edilmiştir.

Logaritmik evre tamamlanmadan aktivitenin düşüşe geçmesi, izolatın gelişimini tamamlayamadan, ortamdaki substratı tükettiğini ve ortamda bulunan diğer içeriklerle büyüme devam edebildiğini düşündürmüştür. Diğer yandan bu sonuç besiyeri ortamdaki substrat miktarının artırılması gerektiğini göstermiştir.

Bununla beraber çalışmada nicel enzim aktiviteleri belirlenen amilolitik izolatların tamamı değerlendirildiğinde, amilolitik özellikteki bakterilerin ekstraselüler amilaz enzimi ürettiği belirlenmiş ve izolatların potansiyel enzim aktiviteleri ortaya konmuştur.

#### **4.1.3. Lipaz enzim aktivitesine sahip bakteri sonuçları**

Yöntemde belirtildiği üzere lipaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin izolasyonu için öncelikle Rodamin-B besiyerleri kullanılmıştır. Söz konusu işlem basamaklarından ekim yapılan besiyerleri inkübasyon sonunda 350 nm ultra viyole (U.V.) ışık altında incelenmiştir. Sonuç olarak besiyerinde gelişim gösteren koloniler etrafında portakal-kırmızı hale oluşumu gösteren koloniyeye rastlanmamıştır. Ancak söz konusu besiyerlerinden ıslatma-yumuşatma basamağından 8 bakteri ve kireçlik basamağından 13 bakteri olmak üzere toplamda 21 adet bakteri izole edilmiştir.

Elde edilen izolatlar, kullanılan yöntemin çalışmamız için uygun olmadığı ya da yöntemde kendimiz tarafından yapılan laboratuvar hatalarının olabileceği düşüncesiyle, kontrol amaçlı Tributyrin Agar besiyerine ve Tween- 80 besiyerine çizgi ekim tekniği kullanılarak ekilmişlerdir.

Yapılan kontrol çalışması sonucunda Tributyrin Agar besiyerine ekimi gerçekleştirilen koloniler etrafında yine herhangi bir hidrolitik zon oluşumu gözlenmemiştir. Diğer yandan Tween-80 besiyerine ekimi yapılan ıslatma-yumuşatma basamağından elde edilen 8 bakterinin tamamının, kireçlik basamağından elde edilen 13 bakterinin 7' sinin Tween-80 besiyerinde hidrolitik zon oluşturduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kullanılan yöntemlere dayanarak çalışma kapsamında elde edilen izolatların lipaz enzim aktivitesi yerine esteraz enzim aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Çalışmada toplamda 15 adet esteraz enzim aktivitesine sahip lipolitik bakteri izole edilmiştir.

Ancak elde edilen izolatların lipaz enzim potansiyellerinin yetersiz olmasından dolayı çalışmanın bu bölümünde elde edilen 15 adet estereaz enzim aktivitesine sahip bakteri çalışmanın diğer kısımlarına dahil edilmemiş ve moleküler tanımlamaya gidilmemiştir. Elde edilen izolatlar başka bir çalışmada kullanılmak amacıyla % 20 gliserol çözeltisi kullanılarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **4.1.4. Moleküler tanılama sonuçları**

Çalışmada nitel enzim aktivitelerine göre izole edilmiş ve fenotipik özellikleri belirlenmiş 117 izolattan birbirinden farklı 29 (16 proteolitik, 13 amilolitik) izolat seçilmiş ve 16S ribozomal RNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Ayrıca moleküler tanımlama için

seçilen 29 izolattan yüksek nitel enzim aktivitesine sahip 22 izolatın nicel enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Seçilen izolatların genomik DNA izolasyonları materyal ve yöntemde belirtildiği üzere ticari bakteriyal DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. DNA örneklerinin saflık kontrolleri % 0,8'lik agaroz jelde yapılmış ve kontrolleri yapılan DNA örnekleri materyal ve yöntemde belirtilen prosedürlere göre PZR ile çoğaltılmıştır.

İzolatların PZR ürünleri Geneon marka PZR Clean-up kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. İşlem sonrasında saflaştırılmış PZR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde 100 baz çiftlik marker kullanılarak yürütülerek kontrol edilmiştir. 19 farklı izolata ait saflaştırılmış PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü şekil 12'de verilmiştir.



M: Marker (Geneone 100bp plus)

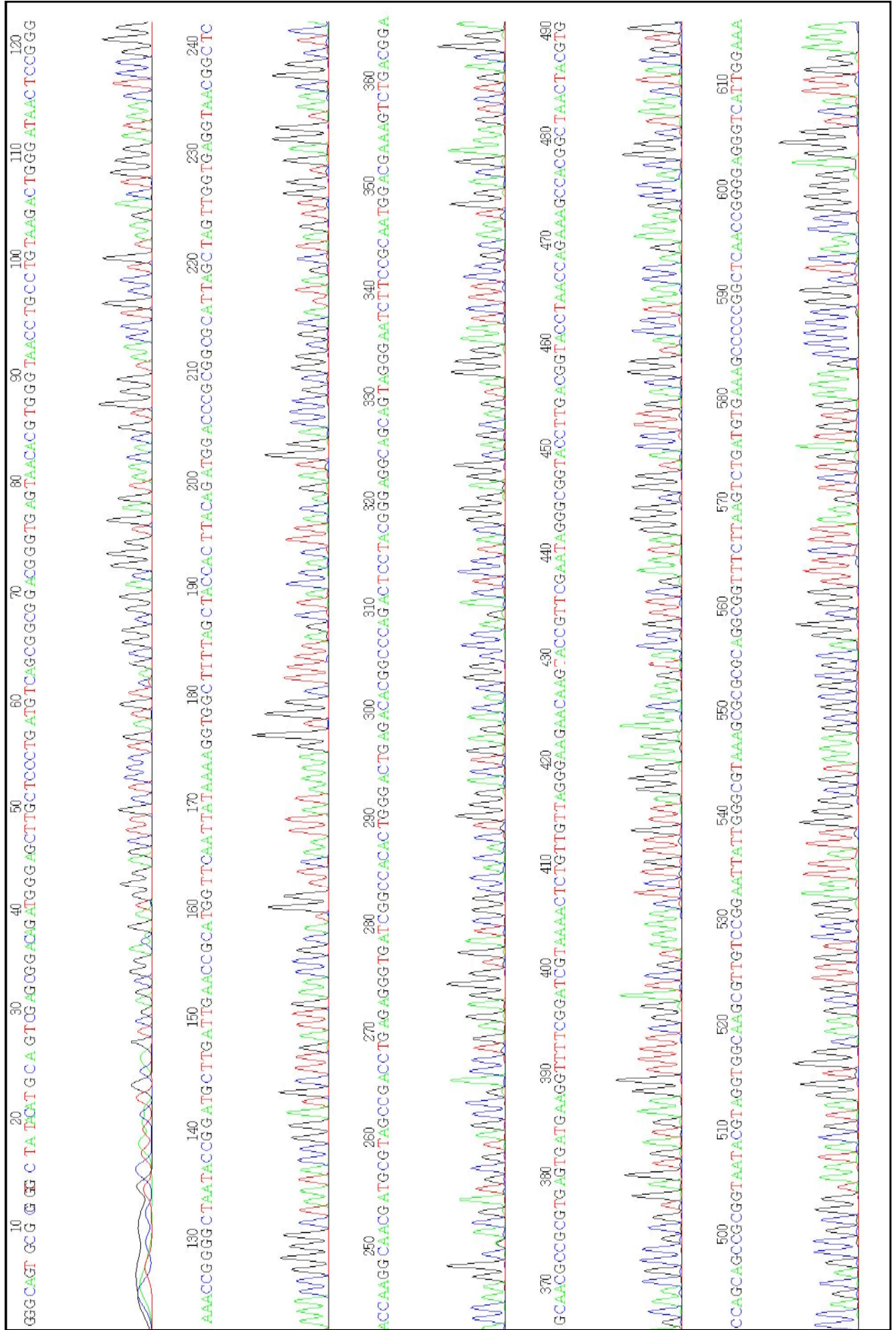
Şekil 12. Bazı izolatlara ait saflaştırılmış PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Kontrolleri yapılan PZR ürünlerinin dizi analizi Bioeksen firması tarafından gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin dizi analizleri sonucunda elde edilen PS13 izolatına ait baz dizileri şekil 13 ve şekil 14'de verilmiştir.

Dizi analizlerine ait sonuçlar Chromas isimli programla kontrol edilmiş ve temizlenmiştir. İleri ve geri primerleri özel ticari bir programla align edildikten sonra ortak bölgeler çıkartılarak baz sayısı 1241 ile 1435 arasında değişen 16S rRNA gen bölgeleri elde edilmiştir. İzolatlara ait söz konusu gen bölgeleri ekler bölümünde verilmiştir.

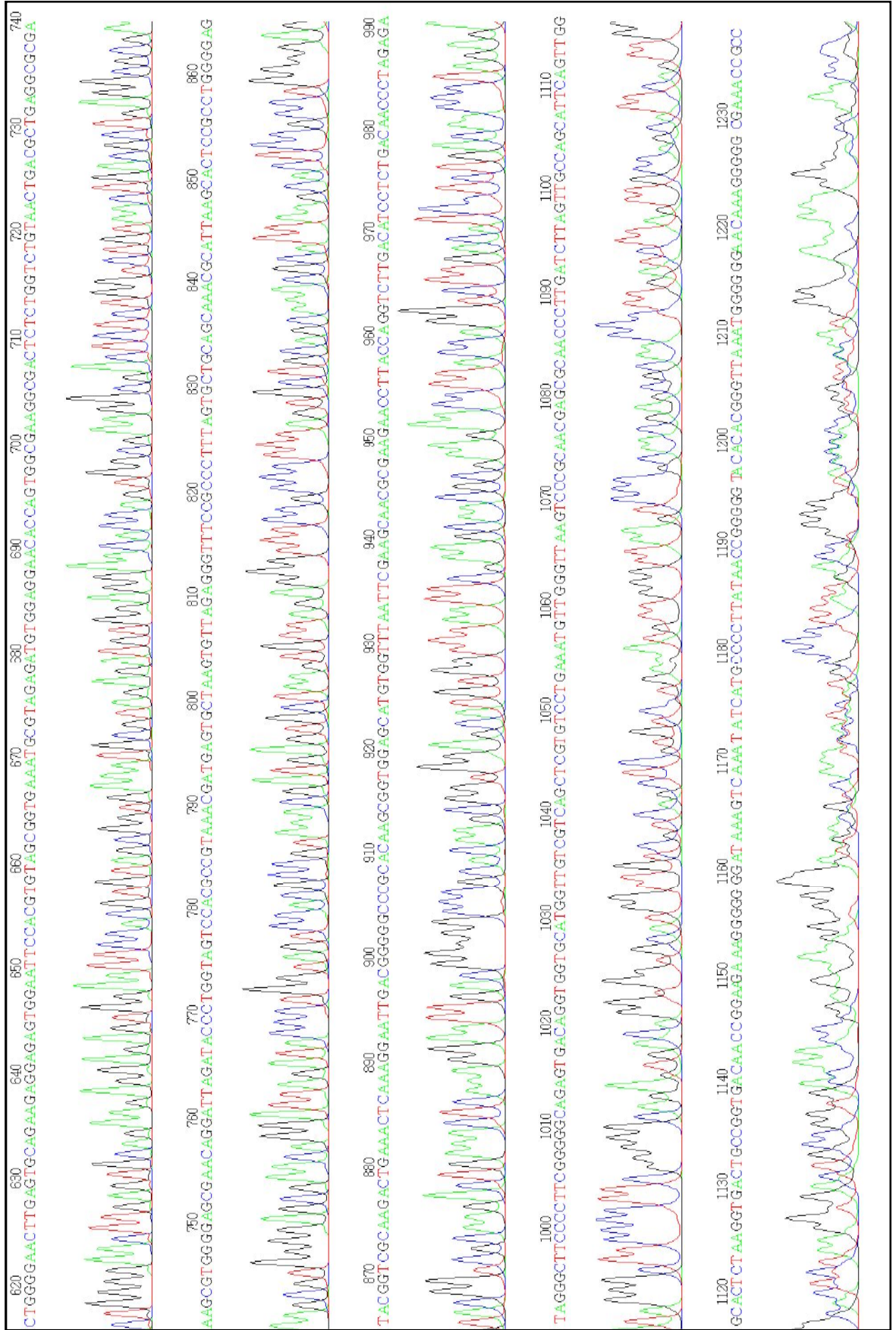
Elde edilen bu gen bölgeleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> internet adresindeki nükleotit BLAST tarama seçeneği kullanılarak Gen bankasında var olan 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmış ve aralarındaki benzerlik oranları belirlenmiştir.

Buna göre çalışmamızda tanılanan 29 izolattan, 17'si filogenetik olarak farklı türlere benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda tanımlanan 29 izolatın gen bankasında var olan 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırma bulguları çizelge 38'de verilmiştir.

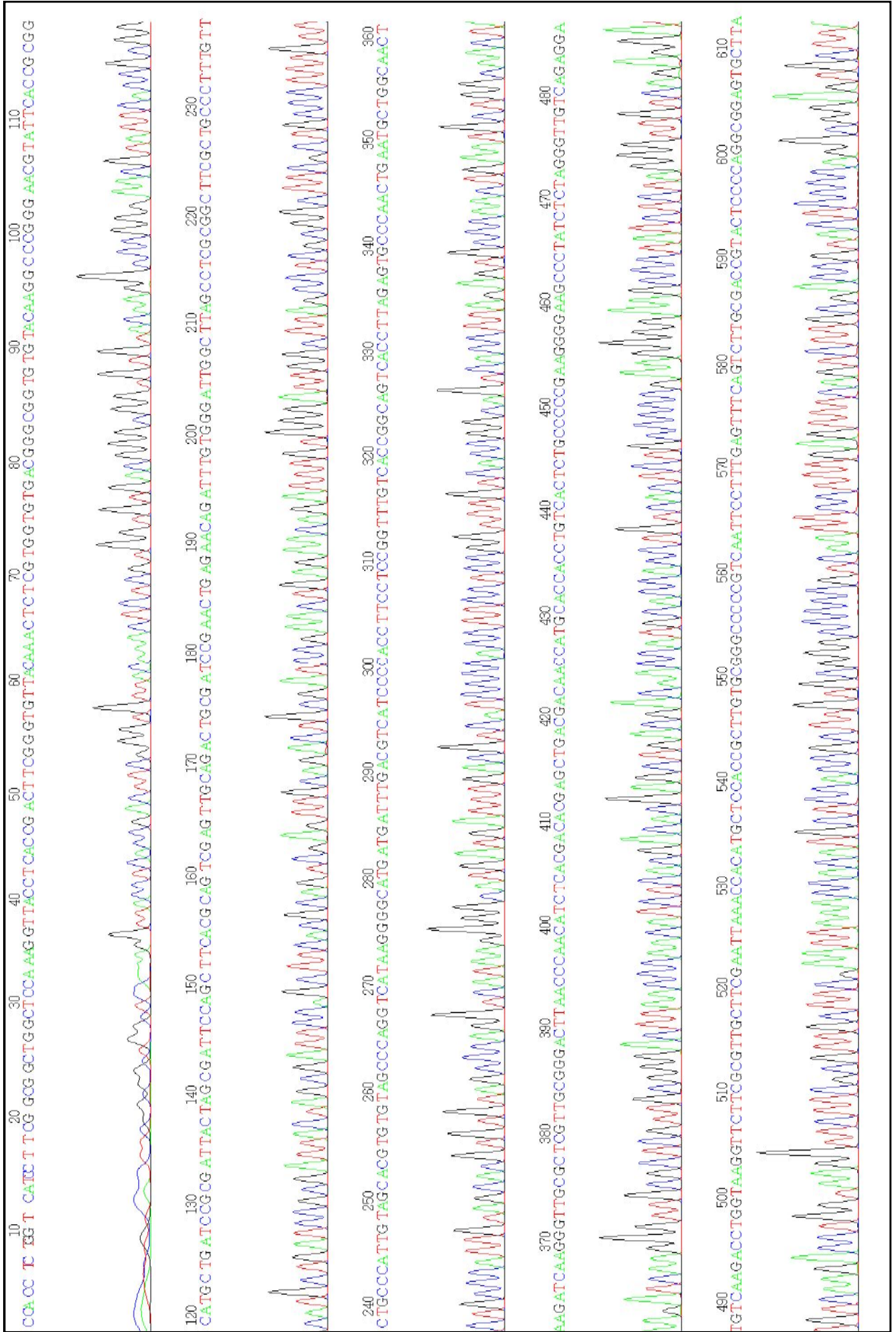


Şekil 13. PS13 izolatının dizi analizi sonucu elde edilen Forward kromotogramı.

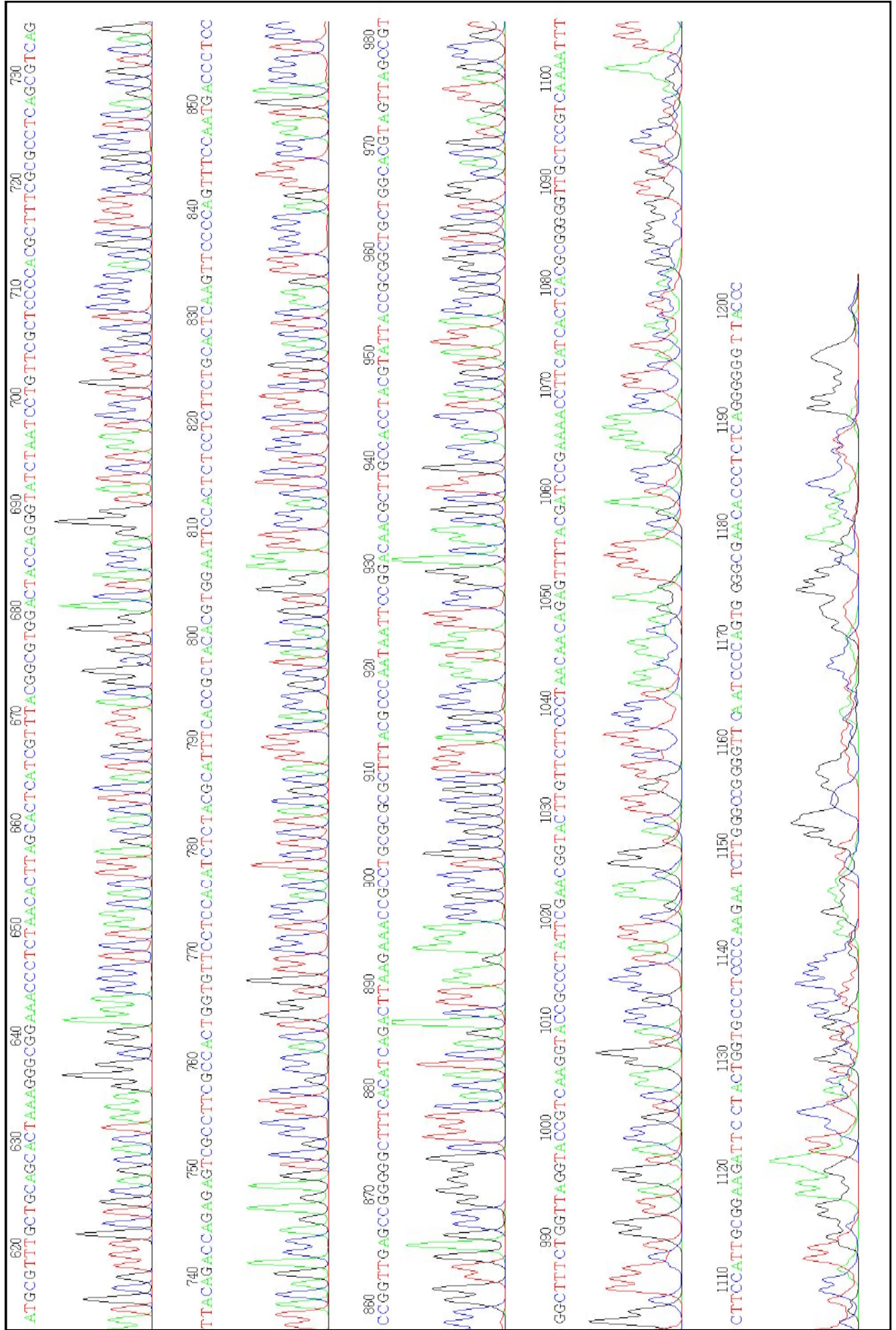




Şekil 13. Devamı.



Şekil 14. PS13 izolatının dizi analizi sonucu elde edilen Reverse kromotogramı.



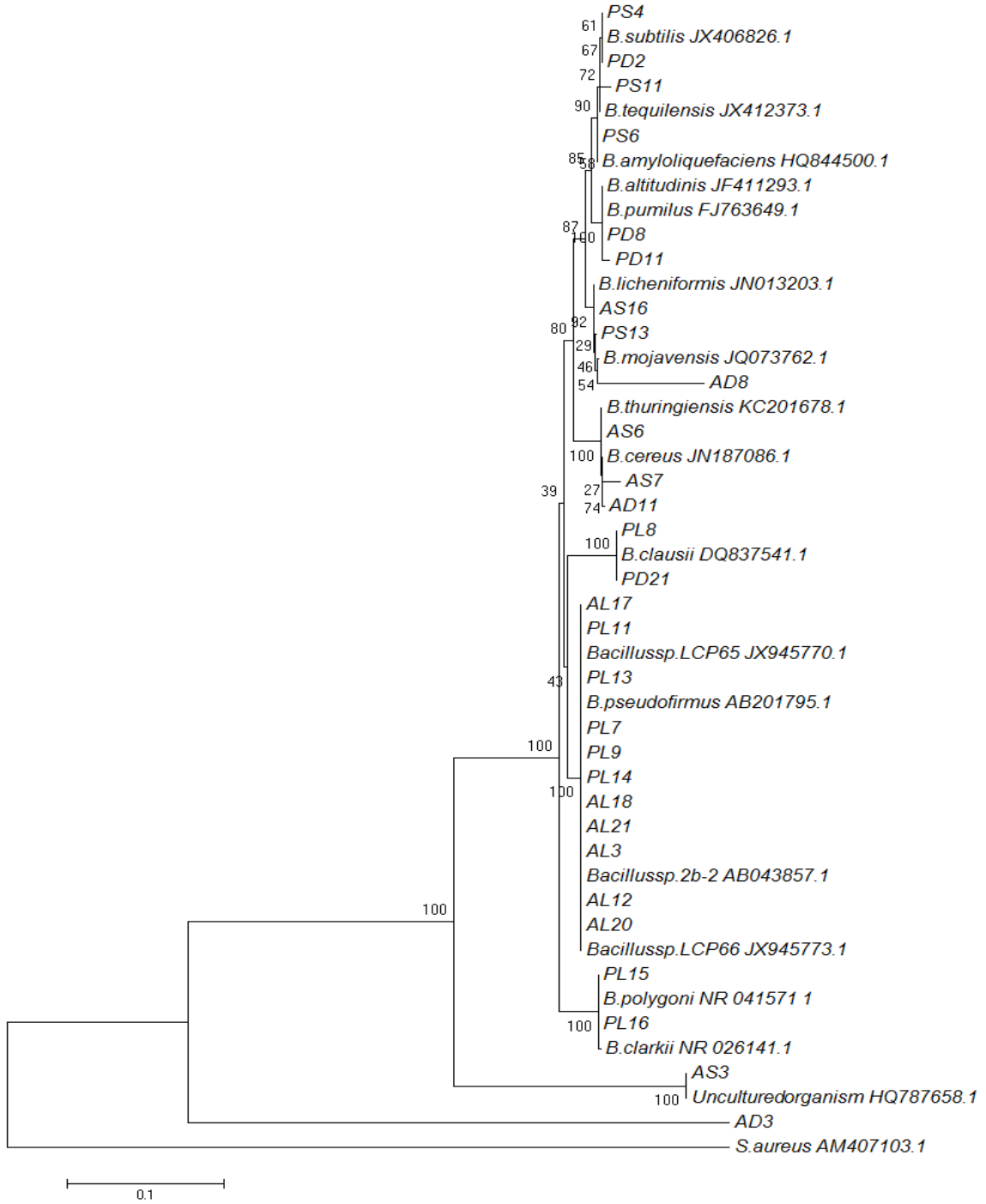
Şekil 14. Devamı.

Çizelge 38. 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırma sonuçları

İşlem basamağı	İzolot kodu	Filogenetik Olarak Benzediği Tür	Benzerlik Oranı (%)	Gelişim gösterdikleri pH aralığı
İslatma Yumuşatma	PS4	<i>Bacillus subtilis s7e</i>	99	7-9
İslatma Yumuşatma	PS6	<i>Bacillus amyloliquefaciens SZMG17</i>	99	7-9
İslatma Yumuşatma	PS11	<i>Bacillus tequilensis CGX-1</i>	99	7-10
İslatma Yumuşatma	PS13	<i>Bacillus licheniformis WAS3-5</i>	100	7-10
İslatma Yumuşatma	AS3	<i>Uncultured organism clone ELU0110</i>	100	7-11
İslatma Yumuşatma	AS6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	7-11
İslatma Yumuşatma	AS7	<i>Bacillus cereus YC-16</i>	98	7-10
İslatma Yumuşatma	AS16	<i>Bacillus licheniformis HT18</i>	100	7-11
Kireç Giderme ve Sama	PD2	<i>Bacillus subtilis DSJ6</i>	99	7-9
Kireç Giderme ve Sama	PD8	<i>Bacillus pumilus S68</i>	100	7-10
Kireç Giderme ve Sama	PD11	<i>Bacillus altitudinis M48</i>	99	8-11
Kireç Giderme ve Sama	PD21	<i>Bacillus clausii XJU-7</i>	100	8-11
Kireç Giderme ve Sama	AD11	<i>Bacillus cereus RJ1</i>	100	7-10
Kireç Giderme ve Sama	AD8	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	7-10
Kireç Giderme ve Sama	AD3	<i>Bacillus majovensis LZ013</i>	93	7-10
Kireçlik	PL7	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	99	9-12
Kireçlik	PL8	<i>Bacillus clausii BG-B15</i>	99	9-12
Kireçlik	PL9	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	99	9-12
Kireçlik	PL11	<i>Bacillus pseudofirmus APT35</i>	99	10-12
Kireçlik	PL13	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	100	9-12
Kireçlik	PL14	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	100	9-12
Kireçlik	PL15	<i>Bacillus polygoni YN-1</i>	99	9-12
Kireçlik	PL16	<i>Bacillus clarkii DSM8720</i>	99	9-12
Kireçlik	AL3	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	99	10-12
Kireçlik	AL12	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	99	9-12
Kireçlik	AL20	<i>Bacillus sp. LCP66</i>	99	9-12
Kireçlik	AL17	<i>Bacillus sp. 2b-2</i>	100	10-12
Kireçlik	AL18	<i>Bacillus pseudofirmus OF4</i>	99	9-12
Kireçlik	AL21	<i>Bacillus sp. LCP65</i>	99	9-12

\*AD3 izolatının sadece geri primeri kullanılan tek yönlü dizi analiz sonucu verilmiştir.

Tanımlanan izolatların filogenetik akrabalıklarını ortaya koymak için <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> internet adresindeki çoklu sekans hizalayıcı program kullanılarak izolat ve benzer türlere ait 16S rRNA gen dizileri hizalanmıştır. Elde edilen veriler ile Mega 4 bilgisayar programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Tanımlanan izolatların karşılaştırmalı filogenetik ağacı şekil 15’de verilmiştir.



Şekil 15. Çalışmamızda tanımlanan izolatlar ile benzer buldukları türlerin karşılaştırmalı filogenetik ağacı.

## **4.2. Tartışma**

Bu çalışmada tabaklama öncesi işlem basamaklarından ıslatma-yumuşatma, kireçlik ve kireç giderme-sama proseslerinden 50 adet proteolitik, 52 adet amilolitik ve 15 adet lipolitik özellikte toplamda 117 adet izolat elde edilmiştir. Ancak izole edilen lipolitik izolatların lipaz enzim aktivitesi yerine esteraz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Nitekim elde edilen esteraz aktivitesine sahip izolatların lipaz enzim potansiyellerinin yetersiz olduğu tespit edilmiş ve çalışmanın diğer kısımlarına dahil edilmemişlerdir.

Çalışmada 50 proteolitik ve 52 amilolitik izolatın fenotipik özellikleri belirlenmiş ve fenotipik özellikleri belirlenen 102 izolatdan moleküler tanılama için birbirinden farklı 29 izolat seçilmiştir. Öncelikle seçilen 29 izolattan en iyi nitel enzim aktivitesine sahip proteolitik özellikte 12 adet, amilolitik özellikte 10 adet toplamda 22 izolat seçilerek nicel enzim aktiviteleri belirlenmiş ve son olarak seçilen 29 izolatın 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile filogenetik tanımlamaları yapılmıştır.

Araştırmamızda elde edilen izolatların fenotipik bulguları; seçilen izolatların nicel enzim aktiviteleri ve moleküler tanılama bulguları aşağıda bir sıra dahilinde tartışılmıştır.

### **4.2.1. Proteolitik ve amilolitik izolatların fenotipik bulguları üzerine tartışma**

Çalışmada proteolitik ve amilolitik özellikteki izolatlara öncelikle Gram boyama yapılmış ve izolatların morfolojik özellikleri ile endospor oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. Daha sonra izolatlara sırasıyla oksidaz, katalaz, hareket, indol oluşumu, H<sub>2</sub>S üretim testleri yanısıra karbonhidrat kullanım testleri yapılmıştır.

Gram boyama sonuçlarına göre proteaz ve  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesine sahip izolatların tamamının endospor oluşturma yeteneğine sahip Gram pozitif basil oldukları belirlenmiştir. Biyokimyasal test sonuçlarına göre ise izolatların % 65'inin oksidaz pozitif, tamamının katalaz pozitif, % 31'inin indol pozitif, % 6,8'inin H<sub>2</sub>S pozitif ve % 57'sinin hareketli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karbon kaynağı kullanım test sonuçlarına göre 69 izolatın glikozdan, 37 izolatın mannitolden, 48 izolatın fruktozdan ve 44 izolatın maltozdan asit ürettikleri belirlenmiştir.

*Bacillus* cinsi bakteriler mezofiller ve ekstremofilleri içeren endospor formundaki gram-pozitif bakterilerdir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakındır. Tek ya da çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirirler. Endosporları olumsuz ortam koşullarına karşı oldukça dirençli, gram-pozitif, aerobik veya fakültatif anaerob bakterilerdir. Diğer biyokimyasal özelliklerine bakıldığında katalaz pozitif

oldukları, bazı suşlarının kazeini, jelatini ve nişastayı hidroliz edebildikleri görülmektedir (Claus ve Berkeley, 1986).

Yukarıda verilen bilgi dahilinde çalışmada yapılan morfolojik incelemeler ve biyokimyasal test sonuçlarına göre izolatların tamamının *Bacillus* cinsine ait bakteriler olduğu belirlenmiştir.

Diğer yandan izolatların büyüme gereksinimleri incelendiğinde NaCl içermeyen ortamlardan izole edilen bakterilerin % 55,9'unun % 5 NaCl, % 29,4'ünün % 5 - % 10 NaCl aralığında ve % 14,7'sinin % 5 - % 20 NaCl aralığında gelişim gösterebildikleri ve sahip oldukları nitel enzim aktivite bulgularının pozitif olduğu belirlenmiştir.

Halofilik mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları NaCl miktarına göre 4 gruba ayrılırlar. İhtiyaç duydukları NaCl miktarı % 1'in altındakiler halofilik olmayanlar, % 1-3 arasındakiler zayıf halofiller, % 3-15 arasındakiler ılımlı halofiller ve % 15'den fazla olanlar aşırı halofiller olmak üzere sınıflandırılırlar. Halotolerant mikroorganizmalar ise halofilik mikroorganizmalardan farklı olarak tuzun varlığında ve yokluğunda gelişebilen organizmalardır (Kushner, 1985; DasSarma ve Arora, 2001).

Çalışmada NaCl içermeyen ortamlardan izole edilen izolatların her biri araştırmacıların tanımlamaları da göz önüne alınarak halotolerant bakteri olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların pH toleransı bulgularına göre ıslatma-yumuşatma basamağından izole edilen 13 proteolitik izolatdan, PS11 ve PS13 izolatlarının pH 7-10 aralığında, diğer izolatların pH 7-9 aralığında ve 16 amilolitik izolatdan 2'sinin pH 7-10, 4'ünün pH 7-11, 10'unun pH 7-9 aralığında ürediği ve sahip oldukları nitel enzim aktivitelerini korudukları belirlenmiştir.

Kıl giderme kireçlik işlem basamağından izole edilen proteolitik 16 izolatın, 15'i pH 9-12, PL11 izolatı pH 10-12 aralığında ve amilolitik 21 izolatın 5'i pH 10-11, 6'sı pH 10-12, 10'u ise pH 9-12 aralığında gelişim göstermiş ve sahip oldukları nitel enzim aktivitelerini korudukları tespit edilmiştir.

Kireç giderme-sama işlem basamağından izole edilen proteolitik 21 izolatdan, PD2 ve PD5 izolatlarının pH 7-9, PD11, PD18 ve PD2 izolatlarının ise pH 8-11, diğerlerinin ise pH 7-10 aralığında ve amilolitik 16 izolatın tamamının pH 7-10 aralığında ürediği ve sahip oldukları nitel enzim aktivitelerini korudukları belirlenmiştir.

Mikroorganizmalar geliştikleri pH aralığına göre asidofiller (pH 1-5,5), nötrofiller (pH 5,5-8), alkalifiller (pH 8,5-10,0) ve ekstrem alkalifiller (pH 10,0-11,5) olmak üzere dört grup içinde toplanırlar (Madigan ve Martinko, 2009).

Mikroorganizmaların çoğu nötral veya buna yakın pH değerlerinde yaşarlar. Alkalifilik mikroorganizmalar ise yüksek alkali çevrelerde yaşayan farklı bir gruptur (Horikoshi, 1999; Kumar ve Takagi, 1999). Alkalifilik mikroorganizmalar, genellikle üreyebilmek için 8'in üzerinde bir pH'ya ihtiyaç duymaktadırlar. Optimum üreme pH değerleri ise 9-10 aralığındadır (Horikoshi, 1999).

Alkalifilik mikroorganizmalar kendi aralarında alkalifilik ve alkalitolerant olmak üzere iki büyük gruba ayırmışlardır. Alkalifil tanımlaması pH 10 üzerinde büyüeyebilen optimal büyüme pH'sı 9 olan pH 7 ve daha düşük pH değerlerinde büyümeleri imkansız olan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Diğer yandan pH 10 civarında büyüme yeteneğine sahip buna karşılık optimal büyüme pH'sı nötral pH civarında olan grupta alkalitolerantlar olarak tanımlanmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999).

Yine aynı araştırmacılar ekstrem alkalifilleri kendi aralarında fakültatif ve zorunlu alkalifiller olmak üzere iki alt gruba ayırmışlardır. Fakültatif alkalifiller pH 10 ve üzeri pH değerlerinde optimal büyüme gösterirken nötral pH'larda da iyi bir şekilde büyüebildikleri, zorunlu alkalifillerin ise nötral pH değerlerinde büyüme yeteneğine sahip olmadıkları ifade edilmiştir (Kumar ve Takagi, 1999).

Araştırmacıların yapmış olduğu tanımlamalar doğrultusunda çalışmamızdan elde edilen izolatların pH tolerans bulguları değerlendirildiğinde ıslatma yumuşatma işlem basamağında elde edilen izolatların tamamının alkalitolerant, kireçlik basamağından elde edilen izolatların tamamının alkalifilik (zorunlu alkalifilik), kireç giderme sama basamağından elde edilen izolatlardan 3'ünün alkalifilik; diğerlerinin ise alkalitolerant mikroorganizma oldukları belirlenmiştir

İzolatların sıcaklık tolerans bulguları incelendiğinde proteolitik izolatlardan 27'sinin 27-55 °C; 21'inin 27-50°C aralığında; amilolitik izolatların ise 15'inin 27°C'de, 6'sının 27-45°C aralığında ve 31'inin 27-55° C aralığında gelişebildikleri ve bu sıcaklık değerlerinde nitel enzim aktivitelerini koruyabildikleri tespit edilmiştir. İzolatların tamamının optimum büyüme sıcaklığı ise 37 °C olarak belirlenmiştir.

Mikroorganizmalar optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında psikrofiller (20°C altında), mezofiller (20-55°C) ve termofiller (55°C üzeri) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadırlar (Gomes ve Steiner, 2004; Aygan, 2008; Çoşkun, 2010). Çalışmada araştırmacıların ifadeleri göz önüne alınarak elde edilen izolatların % 42'sinin mezofil, % 58'sinin muhtemel termofil olduğu söylenebilir.



Sonuç olarak çalışmada, araştırmacıların tanımlamalarında dikkate alınarak, tabaklama öncesi işlem sıvılarından izole edilmiş proteolitik ve amilolitik özellikteki izolatların 39'unun alkalifilik, 63'ünün alkalitolerant *Bacillus* cinsi bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların tamamının farklı sıcaklık derecelerini tolere edebilen halotolerant bakteriler olduğu belirlenmiştir.

*Bacillus* cinsi bakteriler zor koşullarda spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkalın veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Claus ve Berkeley, 1986). Nitekim deri mikrobiyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda da tuzlanmış derilerde *Bacillus* cinslerine ait türlerin bulunduğu ve konservasyon aşamasında canlı kalan çeşitli basil (*Bacillus* ve *Clostridium*) sporlarının ıslatma yumuşatma esnasında yeniden üreyebildiği, kireçleme safhasında ise genelde sporlu mikroorganizmaların bulunduğu bildirilmiştir (Birbir, 1991, Karaboz, 1994).

Nitekim Bilgi (2007), ıslatma ve yumuşatma basamağı sonunda aerob spor sayısının  $2,0 \times 10^4$  spor/mL, proteolitik bakteri sayısının  $5,4 \times 10^4$  kob/mL ve lipolitik bakteri sayısının ise  $5,3 \times 10^4$  kob/mL değerinde olduğunu ifade etmiştir. Diğer yandan Meriçli Yapıcı ve ark. (2004), ıslatma-yumuşatma sıvısında bulunan halofilik ve halotolerant bakteri sayılarının yüksek değerlerde olduğunu ve bu bakterilerin ıslatma-yumuşatma sırasında kontrol altına alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Orlita (1968), tabakhanedeki mikroorganizmalar üzerine yaptığı bir çalışmada kireçlik basamağında spor oluşturan bakterilerin  $1,68 \times 10^2$  spor/mL düzeyinde olduğunu bildirmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise bakterisid kullanmasına rağmen 12 gibi ekstrem bir pH değerine sahip kireçlik sıvısında  $1,0 \times 10^1$  spor/mL düzeyinde, kireç giderme ve sama sıvısında ise  $1,2 \times 10^2$  spor/mL spor tespit edildiği bildirilmiştir (Bilgi ve ark., 2009).

#### **4.2.2. İzolatların nicel enzim aktivite bulgularının tartışılması**

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999). Günümüzde endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmakta ve pek çok avantaja sahip olmalarına karşın, bazı proseslerdeki ekstrem koşullara dayanıksız olmaları nedeni ile kullanımları sınırlı kalmaktadır. Ekstremofil mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) ise ekstrem koşullara daha dayanıklı olduklarından, son 20 yılda ekstremofil ve ekstremozimlere olan ilgi artmış ve ekstremozimler endüstriyel

biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Fukara, 2007; Gheorghiu Alpan, 2008).

Extrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, halofilik, alkalifilik ve psikrofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Horikoshi, 1999). Alkalifilik enzimler endüstriyel uygulamalarda büyük öneme sahiptirler. Alkalın lipaz, alkalın proteaz ve alkalın amilaz gibi alkalifilik organizmalardan izole edilen enzimler, dericilik, tekstil, gıda endüstrisi, içecek endüstrisi, kimya endüstrisi ve atıkların temizlenmesi gibi endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadırlar (Rao ve ark, 1998; Igarashi ve ark, 1998; Kumar ve Takagi, 1999; Aygan, 2008).

Nitekim çalışmamızda ıslatma-yumuşatma, kireçlik, kireç giderme-sama işlem basamaklarından izole edilen proteolitik ve amilolitik özellikteki izolatların yüksek sıcaklık aralıklarına toleranslı, halotolerant, alkalifilik ve alkalitolerant *Bacillus* cinsine ait bakteriler olduğu tespit edilmiştir.

Deri ve işlem sıvıları muhteşem bir mikrobiyal çeşitliliğe ev sahipliği yapmaktadır. Bu mikroorganizmaların enzim aktivitelerinin belirlenip endüstriyel mikroorganizma olarak değerlendirilmesi önemli sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle çalışmamızda alkalifilik ve alkalitolerant oldukları belirlenen, birbirinden farklı en iyi nitel enzim aktivitesine sahip proteolitik özellikte 12 ve amilolitik özellikte 10 adet toplamda 22 izolat seçilerek, nicel enzim aktiviteleri belirlenmiş ve izolatların enzim üretim potansiyelleri ortaya konmuştur.

Buna göre çalışmada ıslatma-yumuşatma işlem basamağından elde edilen 4 proteolitik izolatdan PS6 izolatının  $4,40 \pm 0,10$  U/mL ile; amilolitik 3 izolatdan AS6 izolatının  $0,76 \pm 0,01$  U/mL ile diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Kireçlik işlem basamağından elde edilen proteolitik PL13 izolatının  $3,74 \pm 0,04$  U/mL ile; amilolitik AL3 izolatının ise  $0,62 \pm 0,02$  U/mL ile aynı işlem basamağından elde edilen diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kireç giderme-sama işlem basamağından elde edilen proteolitik 3 izolatdan PD2 izolatının  $0,90 \pm 0,03$  U/mL ile; amilolitik 3 izolatdan AD8 izolatının  $0,37 \pm 0,01$  U/mL ile diğer izolatlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada nicel enzim aktivitesi belirlenen izolatların moleküler tanımlamaları yapılmış ve yüksek nicel enzim aktivitesine sahip izolatların benzerlik gösterdikleri türler tespit edilmiştir.

Buna göre proteolitik izolatlardan PS6 izolatının % 99 benzerlik oranıyla *Bacillus amyloliquefaciens* SZMG17, PL13 izolatının % 100 benzerlik oranıyla *Bacillus sp. LCP66*,

PD2 izolatının % 99 benzerlik oranıyla *Bacillus subtilis* DSJ6 strainlerine benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Amilolitik izolatlardan AS6 izolatının %100 benzerlik oranıyla *Bacillus thuringiensis* Fh-6, AL3 izolatının % 99 benzerlik oranıyla *Bacillus* sp. LCP66, AD8 izolatının ise % 99 benzerlik oranıyla *Bacillus licheniformis* strainlerine benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Diğer yandan çalışmada *Bacillus* sp. LCP66 strainin potansiyel proteaz ve amilaz enzim üreticisi olduğu ve her iki enzim içinde yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

*Bacillus* türleri, endüstriyel önemi büyük olan ekstraselüler amilaz ve proteaz enzimi üreticileridir (Morgan ve Priest, 1981). Endüstriyel enzimler arasında yaygın olarak kullanılan proteazların çoğunluğu *Bacillus* cinsine ait türler tarafından üretilir. Diğer bir biyoteknolojik öneme sahip  $\alpha$ -amilaz enzimide *Bacillus* cinsi bakterilerde oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Igarashi ve ark., 1998; Tekin, 2008).

Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilmektedir. Alkalın proteaz üreticisi *Bacillus* türleri; *Bacillus alcalophilus* ATCC 21522, *B. alcalophilus*, *B.alcalophilus* subsp. *halodurans* KP1239, *B. amyloliquefaciens*, *B.circulans*, *B.coagulans*, *B.firmus*, *B.intermedius*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. proteolitycus*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *Amylosacchariticus*, *B. thrungiensis*, *Bacillus* sp. Ya-B, *Bacillus* sp. NKS-21, *Bacillus* sp. B21-2, *Bacillus* sp. Y, *Bacillus* sp. CW-1121, *Bacillus* sp. KSM-K16, *Bacillus* sp. MK5-6 olarak bildirilmiştir (Kumar ve Takagi, 1999).

*Bacillus* cinsine ait türler alkalın proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cinse ait en çok tercih edilen türler *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. mojavensis*'tir (Tekin, 2008). Bu nedenle alkalifilik *Bacillus* soyları hem akademik hem de endüstriyel açıdan ilginç ve çok önemlidir.

Nötrofilik özelliğe sahip amilaz enzimleri genel olarak pH 5-7.5 aralığında aktivite gösterirken, özellikle deterjan sanayisinde kullanılan amilaz enzimleri pH 8-11 aralığında aktivite göstermekte olup, alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler. Sıvılaştırıcı  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin çoğu *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciense*'den üretilmektedir. Özellikle *Bacillus licheniformis*'den elde edilen sıvılaştırıcı  $\alpha$ -amilaz ekmek yapımı, nişasta materyalinden etanol üretimi, fruktoz ve glukoz şuruplarının üretimi ve tekstil gibi geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Igarashi ve ark., 1998).

Yapılan araştırmalara göre bakteriyal enzim üretimi açısından en büyük ilgi *Bacillus* sp. türleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte çalışmamızda potansiyel enzim aktiviteleri ortaya konmuş izolatların tamamının *Bacillus* türlerine ait strainler olduğu belirlenmiş ve yukarıda verilen literatür bilgileri bu araştırma sonuçlarımızı destekler nitelikte bulunmuştur.

Ayrıca yapılan literatür taramalarında araştırmaların çoğunun bir izolattan yada tanımlanmış bir türden izole edilen enzimin optimum aktivite koşullarının belirlenmesi ve enzim karakterizasyonu üzerine olduğu belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili elde edilen bazı çalışma bulguları aşağıda verilmiştir.

Morgan ve Priest (1981), izolasyonunu yaptıkları *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığının 70-90 °C arasında olduğunu belirlemişler ve enzimin optimum pH 7.0'de aktif, pH 7.0-10.0 arasında ise stabil olduğunu ifade etmişlerdir.

Bajpai ve Bajpai (1987), termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşunun üremesinin pH 3.0-11.0 arasında olduğunu ve besiyeri pH'sının yükseltilmesiyle üremenin azaldığını, enzim üretiminin pH 5.0-10.0 aralığında gerçekleştiği ve maksimum enzim aktivitesinin pH 6.0-9.0 arasında olduğunu ortaya koymuşlardır. Suşun enzim üretim sıcaklık aralığının 25-50 °C ve maksimum enzim üretim sıcaklığının ise 35°C olduğunu saptamışlardır.

Yapılan bir başka çalışmada *Bacillus licheniformis* MY 10 suşunun  $\alpha$ -amilaz enziminin özellikleri belirlenmiş ve enzimin 75-80 °C'de, pH 5.0-6.5'da aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca NaCl'nin enzim aktivitesine artırıcı ya da azaltıcı bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (Kumar ve ark., 1990).

Horikoshi (1999), izolasyonunu yaptığı alkalın  $\alpha$ -amilaz enziminin pH 10.0-10.5 aralığında yüksek düzeyde aktif olduğunu, pH 9.0-11.5 aralığında ise yaklaşık % 50 aktivite gösterdiğini belirtmiştir.

Duedahl-Olesen ve ark. (2000), *Bacillus clausii* BT-21 suşundan amilaz enzim izolasyonunu ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu enzimin optimum 9.5 pH'de ve 55 °C'de aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Das ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* suşundan, moleküler ağırlığı 42.8 kDa optimum aktivite sıcaklığı 52-55 °C ve pH 9.0 olan, alkali alfa-amilaz izolasyonu yapmışlardır.

Roy ve Mukherjee (2013), Kuzey-Doğu Hindistan toprak örneğinden izole ettikleri ekstretofik pH (12,5)  $\alpha$ -amilaz enzimi üretebilen *Bacillus licheniformis* AS08E straininden saflaştırılan enzimin optimum 10 pH'da ve 80 °C'de aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ayrıca alkali Lonar Gölünden izole edilen ve moleküler olarak tanımlanan *Bacillus pseudofirmusden* proteaz enzimi üretiminin optimizasyonu yapılmıştır. *Bacillus pseudofirmus* izolatının maksimum proteaz üretiminin 37 °C derecede, 120 rpm çalkalama hızında ve 72 saat sonra olduğu belirlenmiştir (Tambekar ve Tambekar, 2012).

Alkalin toprak örneğinden alkalin proteaz üreticisi yeni bir *Bacillus* suşu izole edilmiş ve 16S rRNA dizi analizine göre *Bacillus subtilis AKRS3* olarak tanımlanmıştır. İzolatın alkalin proteaz üretimi için en uygun gelişim koşulları ve büyüme eğrisi belirlenmiştir. Bakterinin enzim üretiminin gelişiminin durgun fazına denk gelen 24. saatte optimum olduğu belirlenirken; enzim verimi için en uygun pH'ın 9.0, sıcaklığın 37 °C ve çalkalama hızının 125 rpm olduğu tespit edilmiştir (Ravishankar, 2012).

Prabhavathy ve ark., 2013, *Bacillus subtilis* türünden alkalin proteaz elde etmişler ve proteaz enziminin optimum pH 7.0, 45 °C sıcaklıkta ve 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada ise zengin protein içerikli toprak örneğinden izole edilerek moleküler olarak tanımlanan *Bacillus thuringiensis*'in gelişimi ve alkalin proteaz sentezi için optimum koşullar belirlenmiştir. *B. thuringiensis* çeşitli kültür koşullarında proteolitik aktivite gösterirken, proteaz aktivitesi için en uygun koşulların 47 °C ve pH 8 olduğu tespit edilmiştir (Annapurna ve ark., 2013).

Son yıllarda gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimlerin çeşitli endüstri kollarında kullanımı, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel enzimler ülkemizde en çok tekstil ve deterjan sanayiinde kullanılmakta olup, bunu gıda ve deri endüstrisi izlemektedir (Bal, 2005). Bu durum endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir (Anvar ve Saleemuddin, 1998; Niehaus ve ark., 1999). Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda potansiyel enzim varlıkları ortaya konulan ve farklı *Bacillus* türlerine ait strainlerin sahip oldukları enzimlerin karakterizasyonu yapılarak, endüstriyel alanda kullanılabilirliklerinin incelenmesinin büyük önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır.

#### **4.2.3. İzolatların moleküler tanımlama bulgularının tartışılması**

Çalışmada fenotipik özellikleri ve nitel enzim aktiviteleri belirlenmiş 102 adet izolattan birbirinden farklı proteolitik ve amilolitik özellikte 16 adet alkalifilik, 13 adet alkalitolerant olmak üzere toplamda 29 izolat seçilmiştir. Seçilen izolatların 16S rRNA dizi analizi yapılmış ve filogenetik olarak benzer oldukları türler tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışma bulgularına göre ıslatma yumuşatma işlem basamağından izole edilen proteolitik 4 izolat *Bacillus subtilis s7e* (% 99), *Bacillus amyloliquefaciens SZMG17* (% 99), *Bacillus tequilensis CGX5-1* (% 99) ve *Bacillus licheniformis WAS3-5* (% 100); amilolitik 4 izolatın ise *Uncultured organism clone ELU 0110* (% 100), *Bacillus thuringiensis* (% 100), *Bacillus licheniformis HT18* (% 100) ve *Bacillus cereus YC-16* (% 98) strainlerine filogenetik olarak benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Islatma-yumuşatma banyolarından *Bacillus* cinslerine ait farklı türlerin izole edildiği ve klasik yöntemlerle tanımlandığı çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Pfleiderer ve Reiner, 1988; Birbir ve ark., 1996; Meriçli Yapıcı ve ark., 2004). Birbir ve Ilgaz (1996), çalışmalarında 25 adet ıslatılmış deriden *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. liquefaciens*, *B. megaterium*, *B. subtilis* türlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca Berber (2009) tuzlarda, tuzlanmış ve ıslatılmış ham derilerdeki bakteriyal popülasyonun incelendiği araştırmasında ana ıslatma sıvısından alınan örneklerden API test yöntemi ile *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. lentus* ve *B. licheniformis* izole ettiğini ve tanımladığını ifade etmiştir.

Kireçlik prosesinden izole edilen izolatların dizi analiz sonuçları değerlendirildiğinde, prosten tanımlanan izolatların 4'ünün *Bacillus sp. LCP66* (% 99), 2'sinin *Bacillus sp. LCP66* (% 100) ve diğerlerinde sırayla *Bacillus pseudofirmus* (% 99), *Bacillus pseudofirmus APT35* (% 99), *Bacillus clausii BG-B15* (% 99), *Bacillus pseudofirmus OF4* (% 99), *Bacillus polygona YN-1* (% 99), *Bacillus clarkii DSM8720* (% 99), *Bacillus sp. 2b-2* (% 100) ve *Bacillus sp. LCP65* (% 99) strainlerine filogenetik olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Litaratürlerde kireçlik işlem basamağından alkalifilik ve alkalitolerant bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak litaratür bilgilerinde kireçlik sıvısında belirli düzeylerde spor, proteolitik ve lipolitik bakteri popülasyonunun bulunduğu ifade edilmiştir (Meriçli Yapıcı ve ark., 2008; Bilgi ve ark, 2009). Ayrıca *Bacillus* sporlarının kireçlik sıvısında uzun süre canlı kaldığı ile ilgili bilgiler de yer almıştır (Karaboz, 1994). Araştırmamızda ise çalışmadan elde ettiğimiz 7 farklı *Bacillus* türü kireçlik prosesinden ilk defa izole edilmiş ve moleküler düzeyde tanımlanmıştır.

Çalışmada kireç giderme-sama işlem basamağından izole edilen proteolitik 4 izolatın *Bacillus subtilis DSJ6* (% 99), *Bacillus pumilus S68* (% 100), *Bacillus altitudinis M48* (% 99), *Bacillus clausii XJU-7* (% 97); amilolitik 3 izolatın *Bacillus cereus RJ1* (% 100),

*Bacillus licheniformis* (% 99) ve *Bacillus majovensis* LZ013 (% 93) strainlerine filogenetik olarak benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Daha önce deri mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda kireç giderme-sama işlem basamağının bakteri gelişimine açık olduğu ve belirli düzeyde sporlu bakteri popülasyonu taşıdığı ifade edilmiştir (Line, 1948; Orlita, 1968; Karaboz, 1994; Bilgi, 2007). Ancak yapılan çalışmalarda kireç giderme-sama prosesinden mikroorganizma (özellikle alkalifilik ve alkalitolerant bakteri) izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda kireç giderme-sama basamağından tanımladığımız 7 *Bacillus* strainin bu basamaktan ilk defa izole edilmiş ve moleküler düzeyde tanımlandığı ifade edilebilir.

Bununla birlikte çalışmada ıslatma-yumuşatma basamağından moleküler düzeyde tanımlanmış izolatların 2'sinin pH 7-9, 3'ünün 7-10 ve diğer 3'ünün pH 7-11 aralığında; kireçlik işlem basamağından tanımlanmış izolatların 11 tanesinin pH 9-12, 3 tanesinin pH 10-12 aralığında; kireç giderme-sama işlem basamağından tanımlanmış izolatların ise 4 tanesinin pH 7-10, 1 tanesinin pH 7-9 ve 2 tanesinin pH 8-11 aralığında gelişim gösterdikleri belirlenmiştir.

Alkalifilik mikroorganizmalar kendi aralarında alkalifilik ve alkalitolerant olmak üzere iki büyük gruba ayrılmışlardır. Alkalifil tanımlaması pH 10 üzerinde büyüeyebilen optimal büyüme pH'sı 9 olan pH 7 ve daha düşük pH değerlerinde büyümeleri imkansız olan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Diğer yandan pH 10 civarında büyüme yeteneğine sahip buna karşılık optimal büyüme pH'sı nötral pH civarında olan grubuda alkalitolerantlar olarak tanımlanmaktadır. Ekstrem alkalifiller ise kendi aralarında fakültatif ve zorunlu alkalifiller olmak üzere iki alt gruba ayrılmışlardır. Fakültatif alkalifiller pH 10 ve üzeri pH değerlerinde optimal büyüme gösterirken nötral pH'larda da iyi bir şekilde büyüebilmekte, zorunlu alkalifiller ise nötral pH değerlerinde büyüme yeteneğine sahip olmadıkları ifade edilmektedir (Kumar ve Takagi, 1999).

Araştırmacıların alkalifilik ve alkalitolerant tanımlamalarına göre ıslatma-yumuşatma prosesinden tanımlanan izolatların tamamının alkalitolerant, kıl giderme-kireçlik prosesinden tanımlanan izolatların tamamının alkalifilik (zorunlu alkalifilik) ve kireç giderme-sama prosesinden tanımlanan izolatların 5 adetinin alkalitolerant, 2 izolatın ise alkalifilik bakteri olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan çalışmada elde edilen izolatların gelişim gösterebildikleri pH aralıklarının, izole edildikleri işlem basamağı pH değerleriyle paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Deri mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar tuzlanmış ham deri ve ıslatma yumuşatma sıvılarının zengin bir bakteriyal çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Farklı araştırmacılar tarafından taze deri, tuzlanmış ham deri ve ıslatma-yumuşatma işlem basamaklarından *Bacillus* genusuna ait; *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus anthracoides*, *Bacillus liquefaciens* türlerinin izole edildiği ve geleneksel yöntemlerle tanımlandığı bildirilmiştir (Birbir, 1991; Birbir ve Ilgaz, 1996; Orlita, 2004; Aslan, 2008; Berber, 2009; Shede, 2008).

Ham deriden izole edilen ve tanımlanan *Bacillus* türlerinin daha sonraki işlem basamaklarına geçiş yaptıkları ve hidrolitik enzim aktivitelerini sürdürebildikleri bilinmektedir. Ham derinin depolanması esnasındaki hatalar yumuşatmaya yansımakta ve pH değeri 7-8 arasında değişen ıslatma ve yumuşatma sıvılarında; tuz konsantrasyonundaki azalmayada bağlı olarak ortam koşulları mikroorganizma gelişimine olanaklı hale gelmektedir. Bununla birlikte ıslatma yumuşatma sıvılarında karşılaşılan hidrolitik enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar bu basamakta kontrol altına alınmazlarsa ard arda devam eden işlem basamaklarına taşınmakta ve daha sonraki işlem basamaklarında da enzimatik aktiviteleriyle deriye zarar verebilmektedirler.

Deride delik oluşumuna neden olan *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracoides*, *Bacillus pumilus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi 6 adet bakteri türünün hem ıslatma suyundan hem de derinin bozulmuş kısımlardan izole edildiği ve tanımlandığı bildirilmiştir (Orlita, 2004).

Yukarıda verilen bilgilere dayanarak alkalifilik ve alkalitolerant *Bacillus* cinslerine ait bakteri sporlarının da ıslatma-yumuşatma sonrası kireçlik ve kireç giderme-sama proseslerine taşınarak gelişim göstermesinin ve taşındığı proses koşullarına adapte olmasının kaçınılmaz bir sonuç olduğu söylenebilir.

Nitekim çalışmamızda moleküler düzeyde tanımlanan alkalitolerant *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* türlerine ait farklı strainler hem ıslatma-yumuşatma basamağında hem de kireç giderme-sama basamağında tespit edilmiştir. Ayrıca kireçlik işlem basamağından izole edilen ve tanımlanan alkalifilik *Bacillus clausii* türünün farklı bir straini kireç giderme-sama işlem basamağından da izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

Bununla birlikte alkalifilik ve alkalitolerant aynı türe ait farklı strainlerin birbirini takip eden basamaklarda tespit edilmesi, bu türlerin farklı pH derecelerine sahip tabaklama öncesi işlem basamaklarına adapte olduğunun göstergesi ve kanıtıdır. Bu nedenle ilk işlem



basamağından itibaren deriye zarar verebilecek olan mikrobiyal yükün kontrol edilmesi kaliteli deri üretimi açısından oldukça önemlidir.

Diğer yandan çalışmamızda moleküler yöntemle tanımlanan 29 izolattan 17 farklı *Bacillus* türü tespit edilmiştir. Deri proseslerinden daha önceden klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan ve bilinen türler haricinde 11 yeni *Bacillus* türü bu çalışmada ilk kez tanımlanmıştır.

Literatür verilerine göre çalışmamızda ilk kez tanımlanan izolatların benzer buldukları *Bacillus* türleri ve bu türlere ait farklı strainler daha önceki çalışmalarda hayvan dışkısı, sodalı göller ve çöller, bazik topraklar gibi karbonat içeren alkali çevrelerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Çalışmada tabaklama öncesi işlem basamaklarından ilk kez tanımlanan İzolatların benzer bulunduğu türlerin izole edildiği ve tanımlandığı kaynaklara ait bilgiler çizelge 39'da verilmiştir.

Çizelge 39. Çalışmada ilk kez tanımlanan izolatların benzer bulunduğu türlerin izole edildikleri kaynaklar

<b>İzolatların Benzer Buldukları Türler</b>	<b>İzole Edildikleri Kaynak</b>		<b>Kaynakça</b>
<i>Bacillus clarkii</i>	Toprak	Belirtilmemiş	Nielsen ve ark. (1995)
<i>Bacillus clausii</i>	Toprak	Belirtilmemiş	Nielsen ve ark. (1995)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Toprak- Hayvan Dışkısı	Belirtilmemiş	Nielsen ve ark. (1995)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Sodali Göl	Mısır	Martins ve ark. (2001)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Sodali Lonar Gölü	Hindistan	Wani ve ark. (2006)
<i>Bacillus sp. 2b-2</i>	Sodali Lonar Gölü	Hindistan	Wani ve ark. (2006)
<i>Bacillus tequilensis</i>	Eşekarısı yuvası	Çin	Liu ve ark. (2012)
<i>Bacillus polygona YN-1</i>	İndigo balls	Japonya	Aino ve ark. (2008)
<i>Bacillus LCCP 66</i>	Sodali göl	Mısır	Mersha (2012)
<i>Bacillus LCPP 65</i>	Sodali göl	Mısır	Mersha (2012)
<i>Bacillus clausii GMBAE 22</i>	Yerel Ekosistem	Türkiye	Bal (2005)
<i>Bacillus altitudinis</i>	Nehir	Çin	Hamidin (2012)
<i>Bacillus majovensis</i>	Deniz suyu	Tunus	Haddar ve ark., 2009

Alkalifilik mikroorganizmalar doğada yaygın olarak tüm çevreye dağılmışlardır. Alkalifilik *Bacillus* türlerinin insan ve hayvan dışkılarında izolasyonu ilk kez Vedder (1934), tarafından rapor edilmiştir. Bugün alkalifilik *Bacillus* türleri özellikle biyoteknolojik uygulamalar nedeni ile oldukça önem kazanmıştır (Fritze ve ark., 1990; Kumar ve Takagi, 1999; Bal, 2005).

Nielsen ve ark. (1995), son 20 yılda alkalifilik *Bacillus* türlerinin sınıflandırmasını filogenetik ve genetik karakteristiklerine göre revise ederek yeniden oluşturmuşlardır. Sonuç olarak toprak ve hayvan dışkılarından (gübre) daha önce tarif edilen *Bacillus alcalophilus* ve *Bacillus cohnii*' ye ilave olarak *Bacillus clausii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus pseudoalkaliphilus*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus halmopalus*, *Bacillus halodurans* olmak üzere 9 yeni tür izole etmişler ve tanımlamışlardır.

Bal (2005), yapmış olduğu çalışma kapsamında yerel ekosistemlerden izole edilen 22 numaralı izolatu, *Bacillus clausii* olarak tanımlamıştır. Ayrıca *Bacillus clausii* GMBAE 22 adı ile NCIB (National Center XI for Biotechnology Information) Gen bankasına giriş yaptığını ifade etmiştir.

Wani ve ark. (2006), *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus sp. 2b-2* türlerini Hindistanda bulunan sodalı Lonar gölünden, Martins ve ark. (2001), *Bacillus pseudofirmus* ve *Bacillus cohnii* gibi alkalifilik türleri Mısırdaki bulunan sodalı göllerden izole ettiklerini ve moleküler olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Ayrıca Haddar ve ark. (2009), tarafından *Bacillus majovensis*, Tunusda deniz sularından; Aino ve ark. (2008), tarafından *Bacillus polygoni YN-1*, Japonyada indigo balls'dan izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

Ayrıca <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verilerine göre Mersha (2012), tarafından *Bacillus LCCP 66* ve *Bacillus LCPP 65* izolatları, Mısırdaki bulunan sodalı gölden; Liu ve ark. (2012), tarafından *Bacillus tequilensis* eşekarısı yuvalarından ve *Bacillus altitudinis* Çin'de bulunan bir nehirden izole edilmiş ve tanımlanmışlardır.

Son olarak çalışmamızda izole edilen amilolitik AS3 izolatu *Uncultured organism clone ELU 0110* olarak tanımlanmış ve daha önce kültüre edilmemiş bir alkalifilik bakteri ilk kez çalışmamızda izole edilerek kültüre alınmıştır. Sahip olduğumuz alkalitolerant izolatu daha ileri yöntemler kullanılarak incelenmesi ve tanımlanması hem deri endüstrisindeki bakteriyal çeşitliliğe hemde alkalifilik bakteri çeşitliliğine katkı sağlayacaktır.

Ayrıca amilolitik AD3 izolatu ise sadece geri primer analizine göre *Bacillus majovensis* olarak tanımlanmıştır. Sahip olduğumuz bu alkalitolerant izolatu da daha detaylı olarak incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

## **BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER**

Sonuç olarak çalışmamızda tabaklama öncesi işlem basamaklarından ısılatma-yumuşatma, kireçlik ve kireç giderme- samadan 50 adet proteolitik, 52 adet amilolitik ve 15 adet lipolitik bakteri olmak üzere 117 bakteri izole edilmiştir.

Ancak çalışmada elde edilen 15 adet izolatın lipaz enzim aktivitesi yerine esteraz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiş ve izolatların lipaz potansiyellerinin yetersizliğinden dolayı bu izolatların fenotipik ve moleküler tanımlamaları yapılmamıştır.

Çalışmada elde edilen proteolitik ve amilolitik izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için Gram boyama, bazı biyokimyasal testler, pH, NaCl ve sıcaklık tolerans testleri uygulanmıştır. Fenotipik özellikleri belirlenmiş ve bu izolatlardan birbirinden farklı 29 izolat seçilerek moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Ayrıca moleküler tanımlama için seçilen 29 izolattan en yüksek nitel enzim aktivitesine sahip 12 adet proteolitik, 10 adet amilolitik izolatın nicel enzim aktiviteleri belirlenmiş ve potansiyel enzim varlıkları ortaya konmuştur.

Çalışmamızda elde edilen proteolitik ve amilolitik izolatların 39'unun alkalifilik, 63'ünün alkalitolerant özellikte *Bacillus* cinsi bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tamamının farklı sıcaklık derecelerini tolere edebilen halotolerant bakteriler olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada filogenetik tanımlaması yapılan izolatların *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus majovensis*, *Bacillus sp. LCP66*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus polygoni*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus sp. 2b-2*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Uncultured organism clone ELU 0110*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sp. LCP65* türlerine ait strainlere benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Nitekim tabaklama öncesi işlem sıvılarından 17 farklı *Bacillus* türü tanımlanmıştır. Moleküler olarak tanımlanan 17 farklı *Bacillus* türünün 8'inin alkalifilik ve 9'unun ise alkalitolerant olduğu belirlenmiştir. Böylece deri proseslerinden daha önceden klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan ve bilinen türler haricinde ülkemizde 11 yeni *Bacillus* türü bu çalışmada ilk kez tanımlanmıştır.

Deri işlem basamaklarından yeni *Bacillus* türlerinin moleküler olarak tanımlanması oldukça önem arz etmektedir. Çünkü *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstremozimler

çeşitli endüstri kollarında kullanılmaktadır. Deri endüstrisinde zararlı olan bir mikroorganizma tıpta insan sağlığı için yararlı bir mikroorganizma olabilir veya bu mikroorganizma endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılacak endüstriyel mikroorganizmalar arasına girebilir ve insan refahı açısından yararlı hale gelebilirler.

Nitekim çalışmada proteolitik özellikteki PS6 izolatının *Bacillus amyloliquefaciens* SZMG17 strainine benzerlik gösterdiği ve  $4,40 \pm 0,10$  U/mL'lik enzim aktivitesi ile potansiyel proteaz enzim üreticisi olduğu tespit edilmiştir. AS6 izolatının *Bacillus thuringiensis* Fh-6 strainine benzerlik gösterdiği ve  $0,76 \pm 0,01$  U/mL aktiviteyle potansiyel amilaz üreticisi olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmada potansiyel enzim aktiviteleri belirlenen 22 izolatın 12'sinin alkalitolerant, 10'unun alkalifilik *Bacillus* genusuna ait türler olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesi gösteren ve tanımlanan alkalifilik ve alkalitolerant *Bacillus* strainlerinin sahip oldukları enzimlerin karakterizasyonu yapıp endüstriyel kullanıma kazandırılması oldukça önemli sonuçlar doğurabilir. Bu neden ile çalışmada elde edilen *Bacillus* strainlerinin sahip oldukları enzimlerin endüstriyel alanda kullanılabilirliklerinin incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Diğer yandan çalışmamızda moleküler düzeyde tanımlanan alkalitolerant *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* türlerine ait farklı strainler hem ıslatma-yumuşatma basamağında hem de kireç giderme-sama basamağında tespit edilmiştir. Ayrıca kireçlik işlem basamağından izole edilen *Bacillus clausii* türünün farklı bir straini kireç giderme-sama işlem basamağında da izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

Ham deriden izole edilen ve tanımlanan *Bacillus* türlerinin daha sonraki işlem basamaklarına geçiş yaptıkları ve hidrolitik enzim aktivitelerini sürdürebildikleri bilinmektedir. ıslatma yumuşatma sıvılarında karşılaşılan hidrolitik enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar bu basamakta kontrol altına alınmazlarsa ard arda devam eden işlem basamaklarına taşınmakta ve daha sonraki işlem basamaklarında da enzimatik aktiviteleriyle deriye zarar verebilmektedirler. Bu nedenle özellikle ıslatma aşamasında bakteri faaliyetinin kontrol edilmesi çok önemlidir. Çalışmanın bu sonucundan hareketle deri endüstrisinde hedefe yönelik önlemler alınarak bu mikroorganizmaların kontrolü üzerinde durulması deri zararlarının önlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Bununla birlikte daha önce kültüre edilmemiş bir alkalifilik bakteri ilk kez çalışmamızda izole edilerek kültüre alınmıştır. Sahip olduğumuz alkalifilik izolatının daha ileri yöntemler kullanılarak incelenmesi ve tanımlanması hem deri endüstrisindeki bakteriyal çeşitliliğe hemde alkalifilik bakteri çeşitliliğine katkı sağlayacaktır.

Son olarak daha önce deri mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda deri işlem proseslerinden alkalifilik ve alkalitolerant bakteri izolasyonu, tanımlanması veya izole edilen bakterilerin pH toleranslarının belirlenmesi ile ilgili bir araştırmaya yer verilmemiştir. Bu nedenle bu çalışma deri kalitesine zarar verebilecek hidrolitik enzim aktivitesine sahip alkalifilik ve alkalitolerant bakteri tanımlaması yapılması açısından yapılan ilk detaylı orijinal çalışma olmuştur. Böylece elde edilen sonuçların bu konu kapsamında yürütülecek olan diğer araştırmalara ve hem ülkemizdeki hem de yurtdışındaki deri sektörüne oldukça önemli katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir

## KAYNAKLAR

- Adıgüzel A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Afşar A. ve Çetinkaya F., 2008. A Research on Increasing the Effectiveness of Degreasing Process by Using Enzymes. *Journal of Textile & Apparel / Tekstil ve Konfeksiyon*, 18(4): 278-283.
- Aino K., Hirota K., Matsuno T., Morita N., Nodasaka Y., Fujiwara T., Matsuyama H., Yoshimune K. ve Yumoto I., 2008. *Bacillus polygoni* sp. nov., a Moderately Halophilic, Non-Motile Obligate Alkaliphile Isolated from Indigo Balls. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(1): 120-124.
- Andersen L.P. 1998. Method for Dehairing of Hides or Skins by Means of Enzymes. US. Patent 5,834,299.
- Annapurna S. A., Naresh S., Anand M. ve Prabhpreet M., 2013. Isolation and Molecular Characterisation of Alkaline Protease Producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 66 (1): 45-51.
- Anonim., 1988. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Edited by the Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press, Oxford.
- Anonim., 2000 May. Biocides Used as Preservatives in the Leather Industry. *Emission Scenario Document*. 14p.
- Anvar A., Saleemuddin M., 1998. Alkaline Proteases: A Review. *Bioresource Technology*, 64: 175-183.
- AOAC, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed), USA.
- Artan M.E., 1982. Atatürk Yılı Kurban Derileri Islah Çalışmaları. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8(1): 1-88.
- Artan M.E., Özcan N., Cıvık A. ve Susur M., 1981. İstanbul, Malatya ve Konya Ereğlisi'nde 1980 Yılında Toplanan Kurban Derileri Üzerinde Bir Çalışma. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 7(1):19-23.

- Aslan E., 2009. Tuzlanmış Ham Derilerde Bulanan Mikroorganizma Türlerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Atlan A., 1989. *Laboratuvar Tekniği, Tarım Ürünleri Teknoloji Kitabı*. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset ve Teksir Atölyesi, No: 36, Adana, 172 s.
- Aygan A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bailey D.G. ve Birbir M., 1993. A Study of The Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine Cured Cattle Hides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 88: 291-300.
- Bailey D.G. ve Birbir M., 1996. The Impact of Halophilic Organisms on The Grain Quality of Brine Cured Hides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 91: 47-51.
- Bajpai P. ve Bajpai K.P., 1987. High Temperature Alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 72-78.
- Bal H., 2005. Yerel Ekosistemlerden İzole Edilen ve Endüstriyel Önemi Olan Proteinleri Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması Ve İlgili Proteinlerin Taranması. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Barrow G.I ve Feltham R.K.A., 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Retrieved May 15, 2013, from <http://www.google.com.tr/books>.
- Berber D., 2009. Tuzlarda, Tuzlanmış ve Islatılmış Ham Derilerdeki Bakteriyel Popülasyonun İncelenmesi. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bilgi S.T. ve Meriçli Yapıcı B., 2008. Deri Endüstrisinde Mikroorganizmaların Kontrolü. *Biga Değerleri Sempozyumu*, Çanakkale, Türkiye. 369-380.
- Bilgi S.T., 2007. Tabaklama Öncesi İşlemlerden Bakteri ve Fungus Sayısının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

- Bilgi S.T., 2012. Ham Derilerden İzole Edilen Halofilik Arkelerin Hidrolitik Enzim Kapasitelerinin Belirlenmesi, Fenotipik ve Filogenetik Olarak Tanımlanması. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Bilgi S.T., Mericli Yapici B. ve Yapici A. N., 2009. Determination of Bacterial and Fungal Numbers in Floats of Pre-Tanning Operations. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(8): 1602-1607.
- Birbir M. ve Ilgaz A., 1996. Isolation and Identificatin of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 80: 147-153.
- Birbir M., 1991. Deri Endüstrisinde Kullanılan İşlenmiş ve İşlenmemiş Sığır Derilerinde Derinin Kalitesine Etki Eden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Birbir M., 2004. Deri Konservasyonunda Kullanılan Tuzlarda Proteolitik ve Lipolitik Bakterilerin Araştırılması. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 39-49.
- Birbir M., Kallenberger W., Ilgaz A. ve Bailey D., 1996. Halophilic Bacteria Isolated From Brine Cured Cattle Hides. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 80: 87-90.
- Birbir M., Kalli N. ve Johansson C., 2002. Examination of Salt Quality of Sereflikochisar Lake Used in Turkish Leather Industry. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 86(3): 112-117.
- Bitlisli B.O., 1992. Pentaklorfenolsüz Koruma. *Leather*, February, 20-22.
- Bitlisli B.O., Karavana H.A., Başaran B., Sarı O., Yasa I. ve Birbir M., 2004. The Effect of Conservation Defects on The Suede Quality of Double-Face. *Journal of American Leather Chemists Association*, 99(12): 494-501.
- Brandl M.T., Quinones B. ve Lindow S.E., 2001. Heterogeneous Transcription of an İndoleacetic Acid Biosynthetic Gene in *Erwinia herbicola* on Plant Surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 3454-3459.
- Chang Y. H., Shangkuan Y. H., Lin H. C. ve Liu H. W., 2003. PCR Assay of the groEL Gene for Detection and Differentiation of *Bacillus cereus* Group Cells. *Applied and Enviromental Microbiology*, 69 (8): 4502-4510.



- Claus D. ve Berkeley C.W., 1986. The Genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath pHA.
- Çoban H.S, 2004. Isolation of Haloalkaliphilic Microorganisms from Leather Industry. Master of Science. Izmir Institute Of Technology, Izmir.
- Çoşkun A., 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Dahl S., 1956. Prevention of Microbiological Deterioration of Leather. *Journal of American Leather Chemists Association*, 51(3):103-117.
- Das K., Doley R. ve Mukherjee A.K., 2004. Purification and Biochemical Characterization of a Thermostable, Alkaliphilic, Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a Strain Isolated from the Tradition Fermented Food of India. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 40: 291-298.
- DasSarma S. ve Arora P., 2001. A General Review on Halophiles. In Encyclopedia of Life Sciences. Nature publishing group (www.els.net). 1-9.
- Deng A., Wu J., Zhang Y., Zhang G. ve Wen T., 2010. Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101: 7100-7106.
- Denz W., 2009. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Life06 TCY/TR/292 HAWAMAN Projesi.
- Didato D., Bowen J. ve Hurlow E., 1999. Microorganism Control During Leather Manufacture. Leather Technologists Pocket Book. *The Society of Leather Technologists and Chemists*, East Yorkshire, U.K.
- Doğanay D. ve Meriçli Yapıcı B., 2008. Deri Endüstrisinde Karşılaşılan Mikroorganizmalar ve Zararları. *Biga Değerleri Sempozyumu*, Çanakkale, Türkiye. 381-392.
- Doğanay D., Mericli Yapıcı B. ve Yapıcı A. N., 2013. Biyosid Uygulamalı Giysilik Deri Üretiminde Tabaklama ve Sonrası Yaş İşlemlerde Mikrobiyal Yükün Tespiti Üzerine Bir Araştırma. *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 17(1): 15-21

- Duedahl-Olesen L., Kragh K.M. ve Zimmermann W., 2000. Purification and Characterisation of a Malto-Oligosaccharide-Forming Amylase Active at High pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Research*, 329: 97-107.
- Ertuğrul S., Dönmez G. ve Takaç S., 2007. Isolation of Lipase Producing *Bacillus* sp. from Olive Mill Wastewater and Improving Its Enzyme Activity. *Journal of Hazardous Materials*.149: 720–724.
- Fogarty W.M. ve Kelly C.T., 1979. Developments in Microbial Extracellular Enzymes. In: Wiseman A, editor. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, 3: 45-108.
- Fritze D., Flossdorf J. ve Claus D., 1990. Taxonomy of Alkaliphilic *Bacillus* Strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 92-97.
- Fukara G., 2007. Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gao X.A., Ju W.T., Jung W.J. ve Park R.D., 2008. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydrate Polymers*, 72(3): 513-520.
- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V. ve Jayaraman K., 1995. Production of Protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in Solid-State Fermentation and Its Application in the Unhairing of Hides and Skins. *Process Biochem.*, 30: 457-462.
- Gheorghiu Alpan L., 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gomes J. ve Steiner W., 2004. Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol*, 42 (4): 223–235.
- Gupta A., Roy I., Patel R.K., Singh S.P., Khare S.K. ve Gupta M.N., 2005. One-step Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Haloalkalophilic *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography A*, 1075: 103-108.
- Gupta R., Beg Q.K. ve Lorenz P., 2002a. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 15-32.

- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. ve Chauhan B. 2002b. An Overview on Fermentation, Downstream Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 381-395.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K. ve Chauhan B., 2003. Microbiyal  $\alpha$ -amylases: A Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616.
- Gupta R., Gupta N. ve Rathi P., 2004. Bacterial Lipases: an Overview of Production, Purification And Biochemical Properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 64:763–781.
- Haba E., Bresco O., Ferrer C., Marque's A., Busquets M. ve Manresa A., 2000. Isolation of Lipase-Secreting Bacteria by Deploying Used Frying Oil as Selective Substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 40–44.
- Haddar A., Agrebi R., Bougatef A., Hmidet N., Sellami-Kamoun A. ve Nasri M., 2009. Two Detergent Stable Alkaline Serine-Proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, Characterization and Potential Application as a Laundry Detergent Additive. *Bioresource Technology*, 100: 3366-3373.
- Hamidin M., 2011. Cultivable Bacterial Diversity of Natural Populus Euphratica of Disused Ancient Kiyik River Xinjiang, Chine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/338843341>.
- Harley J.P. ve Prescott L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology* (5th Ed). The McGraw-Hill Companies, New York.
- Harmancıoğlu M. ve Dikmelik Y., 1993. *Ham Deri Yapısı, Bileşimi, Özellikleri*. Özen Ofset, İzmir. 1-145.
- Hasan F., Aamer A.S. ve Hameed A., 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251.
- Hien N.T.P., 2006. A Rapid Quantitative Assay For Bacterial Protease Activity. MSc. Thesis. Texas Tech University, Texas, TX, USA.
- Hols P., Ferain T., Garmyn D., Bernard N. ve Delcour J., 1994. Use of Expression Secretion Signals and Vector Free Stable Chromosomal Integration In Engineering of *Lactobacillus planetarium* for Alfa Amylase and Levanase Expression. *Appl. Environ. Microb.*, 60(5) : 1401-1413.

- Horikoshi K., 1996. Alkaliphiles-From An Industrial Point Of View. *Fems Microbiology Reviews*, 18: 259-270.
- Horikoshi K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 63(4):735-750.
- Igarashi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Eumura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T ve Ito S., 1998. Enzymatic Properties of a Novel Liquefying  $\alpha$ -Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* Isolate and Entire Nucleotide and Amino Acid Sequences. *Appl. Environ. Microb.*, 64:3382-3389.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W. ve Reetz M.T., 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 315-351.
- John E.S., 2009. *Biotechnology* (5th. ed.), Retrieved Nov 25, 2013, from <http://www.google.com.tr/books>.
- Karaboz İ., 1994. Deri Mikrobiyolojisi Ders Teksiri. E.Ü. Fen Fakültesi.
- Karaboz İ., Gülümser G. ve Eke Bayramoğlu E., 2003. Tabakhanelerde Depolama Sırasında Gelişen Bazı Fungusların Koruma Piklesi ve Kromla Tabaklama Aşamasında Deride Oluşturdukları Pigmentasyonun İncelenmesi. *E.Ü. Ziraat Fakültesi Derg.*, 40(2): 129-136.
- Kaytankaş E., 2006. *Streptomyces* Tem ile Lipaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kazan D., Denizci A.A., Öner M.N.K. ve Erarslan A., 2005. Purification and Characterisation of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 335-344.
- Keçici E., 2007. Deri Endüstrisinde Kireçlik Sıvısının Yeniden Kullanımının Mikroorganizma Sayısı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ç.O.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Kerimak Öner M.N., 2008. Zorunlu Alkalifilik *Bacillus Marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

- Kıran Ö.E. ve Çömlekçioğlu U., 2003. Zeytinli Iılcası (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.
- Kırk K. ve Dostbil N., 2004. Van İli Belediye Kesimhanesinde Üretilen Sığır Ham Derisi ve Kesim-Depolama Arası İşlemlerde Mikroorganizma Üremesinin Deri Kalitesi Üzerine Etkileri. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 731-736.
- Kouker G. ve Jaeger K.E., 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied And Environmental Microbiology*, 53(1): 211-213.
- Kumar G.C. ve Takagı H., 1999. Microbial Alkaline Proteases from a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17: 561-594.
- Kumar S.U., Rehana F. ve Nand K., 1990. Production of an Extracellular Thermostable Calcium-Inhibited  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis* MY 10. *Enzyme Microb. Technol.*, 12(9): 714-716.
- Kushner D.J., 1985. The Halobacteriaceae. In: Woese C.R. ve Wolfe R.S ed.. *The bacteria. A treatise on structure and function. Archaeobacteria*. Vol 8. Academic Press, London. p. 171-214.
- Lindner W. ve Neuber H.U., 1990. Preservation in the Tannery. *International Biodeteriation*, 26: 195-203.
- Lindner W., 1998. Wet Blue Preservatives Present and Future. *World Leather*. 61p.
- Line E.C., 1948. The Society of Leather Technologists and Chemists, 32(7): 242-248p.
- Liu X.L., Wang J.J. ve Li Q., 2012. *Bacillus tequilensis* from Hornet Nest Shows High Beta-1,3-1,4-Glucanases Activity. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/407032669>
- Madigan M.T. ve Martinko J.M., 2009. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Çökmüş C. Ed. (11. Baskıdan Çeviri). Palme yayıncılık, Ankara.
- Martins R.F., Davids W., Al-Sound W.A, Levander F., Rådström P. ve Hatti-Kaul R., 2001. Starch-Hydrolyzing Bacteria from Ethiopian Soda Lakes. *Extremophiles*, 5(2): 135-144.

- Meriçli Yapıcı B., Yapıcı A.N ve Keçici E., 2008. The Effect of Re-use of Unhairing-Liming Residual Floats Through Regeneration on the Microorganism Number. *African Journal of Biotechnology*, 7(17): 3077-3081.
- Meriçli Yapıcı B., Yapıcı A.N., Karaboz İ. ve Tozan M., 2004. Deri Sektöründe Kullanılan Bazı Bakterisidlerin Etkinliğinin Tespiti Üzerine Bir Araştırma. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 77-88.
- Mersha B.S., 2012. Microbial Diversity of Ethiopian Soda Lakes Assessed by Cultivation Methods. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/428274247>.
- Miller G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Mitchel J.W., 1987. Prevention of Bacterial Damage on Brine Cured and Fresh Cattlehides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 82: 372-383.
- Morgan F.J. ve Priest F.G., 1981. Characterization of a Thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus Licheniformis* NCIB 6346. *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 107-114.
- Muthusubramania N.L. ve Mitra R.B., 2006. A Cleaner Production Method For The Synthesis of Bronopol - A Bactericide That is Useful in Leather Making. *Journal of Cleaner Production*, 14: 536-538.
- Mwatha W.E. ve Grant W.D., 1993. *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a Haloalkaliphilic Archaeon Isolated from Lake Magadi, Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3): 401-403.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. ve Antranikian G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 51: 711-729.
- Nielsen J. E. ve Borchert T.V., 2000. Protein Engineering of Bacterial Alpha Amylase. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1543: 253-274.
- Nielsen P., Fritze D. ve Priest F. G., 1995. Phenetic Diversity of Alkaliphilic *Bacillus* strains: Proposal for Nine New Species. *Microbiology*, 141: 1745-1761.
- Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar P.P., Dhakephalkar P.K. ve Sarnaik S.S., 2007. Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98: 1238-1245.

- Oppong D., Bryant S.D., Rangarajan R., Steele S., Radwell D. ve Hyllengren L., 2006. Application of Molecular Techniques to Identify Bacteria Isolated From The Leather Industry. *J. Am. Leather. Chem. Association.*, 101: 140-145.
- Orlita A., 1968. Microorganisms in the Tannery. *Biological Aspects of Leather Manufacture*. 18.
- Orlita A., 2004. Microbial Biodeterioration of Leather and Its Control: a Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 157-163.
- Özgünay H., Tozan M., Yapıcı A.N., Meriçli Yapıcı B. ve Sarı Ö., 2004. Meşe Palamutu Tanenlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Modifikasyonu Üzerine Bir Araştırma. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 281-286.
- Öztürk F., 2007. Ankara'daki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinden Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Öztürk S., Özeren Morgan M., Salman Dilgimen A., Denizci A.A., Arıkan B. ve Kazan D., 2009. Alkaline Serine Protease from *Bacillus Licheniformis* BA17. *Annals of Microbiology*, 59 (1): 83-90.
- Pandey A., 2006. *Enzyme Technology*, Retrieved Nov 25, 2013, from <http://www.google.com.tr/books>.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D. ve Mohan R., 2000. Advances in Microbial Amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135- 52.
- Pfliderer E. ve Reiner R., 1988. Microorganisms in Processing of Leather in "Biotechnology". (eds. By H.J. Rehm ve G. Reed), VCH weinheim, Germany, 66: 729-743.
- Polkade A.V., 2007. Molecular and Phylogenetic Studies on Microbial Diversity of Raw Buffalo Hide to be Used in Leather Manufacturing. Doctorate Thesis. University of Pune, Faculty of Science, India.
- Prabhavathy G., Rajasekara Pandian M. ve Senthilkumar B., 2013. Identification of Industrially Important Alkaline Protease Producing *Bacillus subtilis* by 16s rRNA Sequence Analysis and Its Applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(1): 332-338.

- Prescott L.M., Harley J.P. ve Klein D.A., 2002. *Microbiology* (5th ed.). Macgraw Hill Publishers. 18-68.
- Ramakrishna D.P.N, Gopi Reddy N. ve Rajagopal S.V., 2010. Purification and Properties of an Extra Cellular Alkaline Protease Produced By *Bacillus Subtilis* (MTTC N0-10110). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4: 493-504.
- Rangarajan R., Didato D.T. ve Bryant S.D., 2003. Measurement of Bacterial Populations in Typical Tannery Soak Solutions by Traditional and New Approaches. *Journal of American Leather Chemists Association*, 98: 477-486.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Gathe M.S. ve Deshpande W., 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635.
- Ravishankar K., Kumar P.S., Jacob B., Saravanan K., Kumar M.A. ve Jacob A., 2012. Optimal Conditions for Production of Extracellular Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* strain AKRS3. *Research in Biotechnology*, 3(5): 45-54.
- Reeder F., 1999. Modern Beamhouse Procedures Soaking and Liming Leather Technologists Pocket Book. *The Society of Leather Technologists and Chemists*, East Yorkshire, UK.
- Rosovitz M.J., Voskuil M.I. ve Chambliss G. H., 1998. *Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology* (9th Ed., Vol.2), by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, New York, 709-730.
- Roy K. ve Mukherjee A.K., 2013. Applications of a High Maltose Forming, Thermo-Stable  $\alpha$ -amylase from an Extremely Alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in Food and Laundry Detergent Industries. *Biochemical Engineering Journal*, 77: 220-230
- Sarı Ö. 2005. Tabaklama Maddeleri. Yayınlanmamış Ders Notları.
- Sarnaik S.S., Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar P.P. ve Dhakephalkar P.K. 2006. Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98: 1238-1245.



- Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Davidson W.S., Bradoo S. ve Gulati R., 1999. Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the Future Industry. *Current Science*,77: 101-115.
- Sharma R., Chistib Y. ve Banerjee U.C., 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*,19: 627-662.
- Sharphouse J.H., 1983. *Leather Technicians Handbook*. Vernon Lock Ltd, London.
- Shede P.N., Kanekar P.P, Polkade A.V., Dhakephalkar P.K. ve Sarnaik S.S., 2008. Bacterial Succession on Raw Buffalo Hide and Their Degradative Activities During Ambient Storage. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 65-74.
- Sneath P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Sneath P.H.A, Mair N.S., Sharpe M.E., Williams J.G. and Wilkins H., Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2):104-1139.
- Takami H. ve Krulwich T.A., 2000. Reidentification of Facultatively Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Extremophiles*, 4: 19-22.
- Takami H., Akiba T. ve Horikoshi K., 1989. Production of Extremely Thermo Stable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 120-124.
- Tambekar D.H. ve Tambekar S.D., 2012. Partial Characterization and Optimization of Alkaline Protease Production of *Bacillus Pseudofirmus* from Lonar Lake . *Int J Adv Pharm Biol Sci*, 2(1): 107-115.
- Tamer A.Ü., Uçar F., Ünver E., Karaboz İ., Bursalıoğlu M. ve Oğultekin R., 1989. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teksirler Serisi No:55, İzmir.
- Tatar S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tekin N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* Spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Temiz A., 2000. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri* (3th). Hatibođlu Yayınevi, Ankara, 291 s.
- Temizkan G. ve Arda N., 2008. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, İst.345s.
- Thorstensen T.C., 1993. *Practical Leather Technology* (4th.ed.). Kriger Publishing Company Krigerdrive, Malabar, Florida. 340p.
- Toptaş A., 1993. *Deri Teknolojisi*. İ.Ü. Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu. Sade Ofset, İstanbul. 1-280.
- Uçar A., 2011. *Aspergillus sp.* Tarafından Üretilen Amilaz Enziminin Safılaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Uğur G., 2006. Deri İslatma Sıvılarındaki Bakterilerin Doğru Elektrik Akımı ile İnaktivasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Uhlig H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, Retrieved May 25, 2013, from <http://www.google.com.tr/books>.
- Ulukanlı Z. ve Dığrak M., 2001. Alkaliphilic Micro-organisms and Habitats. *Turk. J. Biol.* 26: 181-191
- Ulusoy E., Özbek A. ve Eke Bayramoğlu E., 2004. Deri İşlentisinde Makinanın Yeri Ve Yapılan Yanlışlar. *I. Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 617-624.
- Vedder A., 1934. *Bacillus alcalophilus n. Sp.*; Beneves Enkele Ervaringen Met Sterk Alcalische Voedingsbodems. Antonie van Leewenhoek, *Journal of Microbioogy*, 1: 143-147.
- Wani A.A., Surakasi V.P., Siddharth J., Raghavan R.G., Patole M.S., Ranade D. ve Shouche Y.S., 2006. Molecular Analyses of Microbial Diversty Associated with the Lonar Soda Lake in India: An İmpact Crater in a Basalt Area. *Research in Microbiology*, 157(10): 928-937.
- Wiseman A., 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology* (2th ed.) Chapter 3. The Application of Enzymes in İndustry. 274-373 p.
- Yakalı T. ve Dikmelik Y., 1994. *Deri Teknolojisinde Yaş İşlemler*. Özen Ofset, İzmir.

- Yapıcı A.N. ve Meriçli Yapıcı B., 2002. Deri İşletmelerinde Karşılaşılan Mikrobiyal Olaylar ve Kullanılan Mikrobiosidler. *Teknik Bülten, Gemsan*, 34.
- Yaşa İ., Kahraman Ö., Tekin E. ve Koçyiğit A., 2008. Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 25(2): 117–121.
- Yavuztürk B., 2005. Ekstremofillerin Ülkemiz Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmesi ve Tanılanması. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yılmaz P., 2010. Tuzlanmış Derilerden İlimli ve Aşırı Halofil Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitü, İstanbul.

## **EKLER**

### **Ek 1. PS4 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1435

GCCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA  
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT  
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTGAACCGCATGGT  
TCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT  
CCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG  
TTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGA  
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAG  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAT  
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTTTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA  
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT  
GAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGGTG

## Ek2. PS6 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1429

GCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA  
CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAG  
ACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG  
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG  
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC  
GCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA  
AGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG  
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAG  
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC  
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGG  
GGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT  
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC  
AGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT  
CAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC  
CGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAGGA  
GCCAGCCGCCG

### **Ek3. PS11 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1285

CTACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG  
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC  
CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA  
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG  
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA  
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA  
CAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGAACCTAACCAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTG  
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT  
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGG  
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGCTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAA  
CGCATTAAAGCACTCCCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA  
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTAACAATCCTAGAGATAGGAC  
GTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTCTGTTAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC  
CAGCATTGAGGTGGGCAATTTAAGGGGGATGCCGGTGGCAAACCGGAGGAAG  
GGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC  
TACAATGTGAGCAGTAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAACCAATCC  
CACAAATCTGTTGTTTCATATTCGGAGATGCAGGTTTGTGACA

#### **Ek4. PS13 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1429

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTT  
CAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG  
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAG  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAAT  
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA  
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT  
GAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCGAAG

## Ek5. AS3 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1415

TGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGC  
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTAC  
TGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGAC  
CTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT  
GGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA  
CCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG  
TATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCG  
ATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGG  
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC  
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG  
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAG  
TCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC  
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTC  
CGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA  
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC  
TTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCAT  
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAG  
ACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG  
GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGA  
AGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGA  
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGG  
ATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  
CACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGA  
GGGCGCTTACCCAC



## **Ek6. AS6 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1241

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCT  
CTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAA  
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCG  
CATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG  
TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC  
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGA  
AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
AGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGC  
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCT  
CCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG  
AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC  
ATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCG

## Ek7. AS7 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1436

GCTATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGT  
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGG  
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATG  
GTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGT  
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGT  
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTAC  
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG  
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG  
GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT  
CTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGC  
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTTTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTGGCCATCATTAAAGT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAC  
CGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG  
GGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGAC

## **Ek8. AS16 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1430

GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTT  
CAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG  
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAG  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAAT  
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA  
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT  
GAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCGAAG

## Ek9. PD2 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1447

ACGGTGCTGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG  
CTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTG  
TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTG  
AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG  
ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGA  
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG  
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC  
TGTTGTTAGGGAAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGT  
ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT  
CCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG  
TTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAG  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGT  
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAT  
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTTTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA  
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT  
GAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGGTG

## Ek10. PD8 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1429

GCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTA  
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT  
AACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGT  
TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTT  
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG  
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT  
TTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGA  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTT  
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATC  
TGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGCTGGAAT  
CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTG  
AGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAA

## Ek11. PD11 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1424

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAG  
CGGCGGACGGCCCTAATCAAGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA  
CTCCCTTTTAAAGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC  
AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCA  
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA  
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA  
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTT  
AGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAAC  
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC  
TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT  
CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTT  
CCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGG  
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT  
GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTTCGGGGACAGAGT  
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA  
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGG  
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA  
CAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTG  
TTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG  
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAG  
GTAACCTTTATGAGCCAGCCGCCG

## Ek12. PD21 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1429

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGACGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCTTAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCTCCACCTGGAG  
AGAGGGTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTAGGGGATGGGCCCCGCGGCGC  
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG  
AGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGT  
GAGGGAAGAAGCGGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTC  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTT  
CTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGGGGCTCAACCCCGAGCGGCCATTGGAA  
ACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG  
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTT  
TCGATGCCCGTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC  
AGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCTTTGACCACCCAAGAGATTGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAA  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTT  
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GATGGTACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATAAAGC  
CATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAT  
TGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT  
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG  
AGGCAACCTTATGGAGCCAGCCGCCTAAG

### **Ek13. AD11 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1447

GCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTT  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGA  
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGG  
TTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTC  
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTT  
GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACC  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGT  
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG  
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGC  
GGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTC  
TGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG  
GTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG  
TCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCA  
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGG  
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAG  
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA  
ACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGA  
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGG  
TGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGAAAGGG



#### **Ek14. AD8 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1431

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA  
CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTC  
CATTCTTAAAGGGGGGTTTTAACCTCCCCTTTACGAAGGGCCCCCGCCC  
CTTTACCTATTGGGGAAGGAACCGCTCCCCAGGGCAACAATCCTTACCC  
AACTTAAAAGGGGAACCGCCCCCTGGGAATGAAACCCCGGCCAAATTC  
TTCCGGAAGGCACCATTAGGAATCCTCCCCATGGAACAAAGTCTGACGG  
AACCACCCCCCTGGGTAAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAATCTTTTTT  
TAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATTAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCAGGCGG  
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG  
GAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT  
CTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT  
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGC  
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGGCAGAACAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAA  
ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGG  
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCGAA

### **Ek15. AD3 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 783 R 'ye göre

TGGCTCCAGAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGA  
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGC  
GATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAC  
TGAGAACGGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGCTTGGCTGCCCTTTGTTC  
TGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCATAAGGGGCATGATGACTTGAC  
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAAC  
TGAATGCTGGCAACTAAAATCCAGGGTTGCGCTCGTTGCCGGACTTAACCCAA  
CATCTCAACACACCAACTGAACAACACCATGCACCACCTGGCACTCTACCCCC  
CAAGGGGAAGCCTTATCTCTAGGGTTGTTCTAAGATGGCAAGAGCTGGGAAAG  
GTCTTCCCGTTGCTTCCAATTTAAACACATGGTCCACCGGTTGGGGGGGCCCC  
CTCAATTTCTTTGAATTTCAAACCTTGGCACCGGACTCCCCAAGGGGAGTGATTA  
ATGCGGTTGCTGGCGCACTAAAGAGCGGAAAGACTCTAACACTTAGCACACAT  
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTC  
GCGCCTCAGCGTCAGTATCAGACCAGATAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC  
CACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGAAA

**Ek16. PL7 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1431

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAGTAACCCGCTTCCACCTCATGG  
GTGGAACGGGTGAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCC  
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCG  
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC  
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC  
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGG  
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG  
CGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA  
TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC  
TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTA  
GGGGTTTTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCT  
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC  
ACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC  
CAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGG  
GGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA  
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC  
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG  
CTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCC  
CATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA  
GCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC  
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGA  
AGTCGGTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGC

## Ek17. PL8 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1434

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTT  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCTTAGACTGGGA  
TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCTCCACCTGG  
AGAGAGGGTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTAAGGGATGGGCCCGCGGC  
GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTT  
GTGAGGGAAGAAGCGGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC  
TCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC  
TTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGGGGCTCAACCCCGAGCGGCCATTGG  
AAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC  
GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC  
TGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGG  
TTTCGATGCCCGTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA  
GCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG  
TCTTGACATCCTTTGACCACCCAAGAGATTGGGCTTCCCCTTCGGGGGCA  
AAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGG  
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAG  
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATAAA  
GCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGA  
ATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC  
TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG  
TGAGGCAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGGAC

## **Ek18. PL9 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1429

GCCTAATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGGTT  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA  
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGG  
TGGAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGG  
CGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT  
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTAC  
CTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG  
TCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG  
GAAACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT  
CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGG  
GTTTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACA  
AGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
GTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGG  
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT  
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCAT  
AAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCC  
GGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT  
CGGTGAGGTAACCTTTTGAGCCAGCCGCT

**Ek19. PL11 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1417

TGCAAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA  
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG  
GAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTGGAACGGT  
AAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCCGATTAGC  
TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA  
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC  
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA  
AGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA  
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGTCTCTTAAG  
TCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGG  
AGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT  
AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGAT  
GCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCAGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  
ATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTG  
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG  
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT  
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAT  
GGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATAAAGCCAT  
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATTGC  
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA  
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGG  
TAACCTTTTGGAGCCAG

**Ek20. PL13 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1430

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTG  
GAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGGC  
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT  
TTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CAGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGAC  
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATAA  
AGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAA

**Ek21. PL14 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1410

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTG  
GAGCGGTA AAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT  
TTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAG  
CAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGAC  
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATAA  
AGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAA



**Ek22. PL15 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1427

CCTATACTGCAGTCGAGCGCAGGAACAGGCTGATCCCTTCGGGGTGATGC  
CTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTTA  
CAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGATCAGAAG  
AACCGCATGGTTCTGCTGTAAAAGTTGGGACTTGTTCCTAACACTGTAAG  
ATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAG  
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCATCCGCAATGG  
GCGAAAGCCTGACGGTGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATT  
GTAAAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAACACGTGCCGTTTGAACAGGGCGGCA  
CCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC  
GCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT  
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGGA  
TTCCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGACTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTG  
CTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTAGTGCCGCAGTTAACACATTAAG  
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA  
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTGGAGACAGAGCGT  
TCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTT  
AGTTGCCAGCATTCTGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC  
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAAGGGCAGCAAAGCCGCGAGGCC  
GAGCGAATCCATAAAGCCACTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCG  
CCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGCTTG  
TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCT

**Ek23. PL16 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1426

CTATACATGCAGTCGAGCGCAGGAACAGGATGATCCCTTCGGGGTGACGC  
CTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTTA  
CAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGACCAGAAG  
AACCGCATGGTTCTGCTGTAAAAGTTGGGACTTGTTCCTAACACTGTAAG  
ATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA  
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCATCCGCAATGG  
GCGAAAGCCTGACGGTGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATT  
GTAAAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAACACGTGCCGTTCGAACAGGGCGGCA  
CCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGTAGGGGGCCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
CGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG  
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGG  
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGACTTTCTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG  
CTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTAGTGCCGCAGTTAACACATTAAG  
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA  
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTGGAGACAGAGCGT  
TCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTT  
AGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC  
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAAGGGCAGCAAAGCCGCGAGGCC  
GAGCGAATCCATAAAGCCACTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCG  
CCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGCTTG  
TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

## Ek24 AL3 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1429

GCTATACTGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA  
CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTGG  
AGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGC  
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG  
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT  
TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCT  
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAA  
ACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG  
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTT  
TCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
AGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGACA  
AAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG  
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAG  
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCATAAA  
GCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGA  
ATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG  
TGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAA

**Ek25. AL12 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1430

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTG  
GAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT  
TTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CAGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGAC  
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATAA  
AGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAA

**Ek26. AL20 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1426

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTTCACCTCATGGTG  
GAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT  
TTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CAGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGAC  
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATAA  
AGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGC

**Ek27. AL17 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1420

GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA  
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT  
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGT  
GGAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGC  
GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT  
GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACC  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGT  
CTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGG  
AAACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC  
GGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC  
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGG  
TTTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGG  
AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA  
GCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG  
TCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGA  
CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT  
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCATA  
AAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG  
GAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG  
CCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTC  
GGTGAGGTAACCTTTTGGAGC

**Ek28. AL18 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1430

GCCTAATAATGCAAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA  
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGG  
TGGAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGG  
CGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT  
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTAC  
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG  
TCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG  
GAAACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT  
CTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGG  
GTTTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
GTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGG  
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT  
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCAT  
AAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCC  
GGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT  
CGGTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAAG

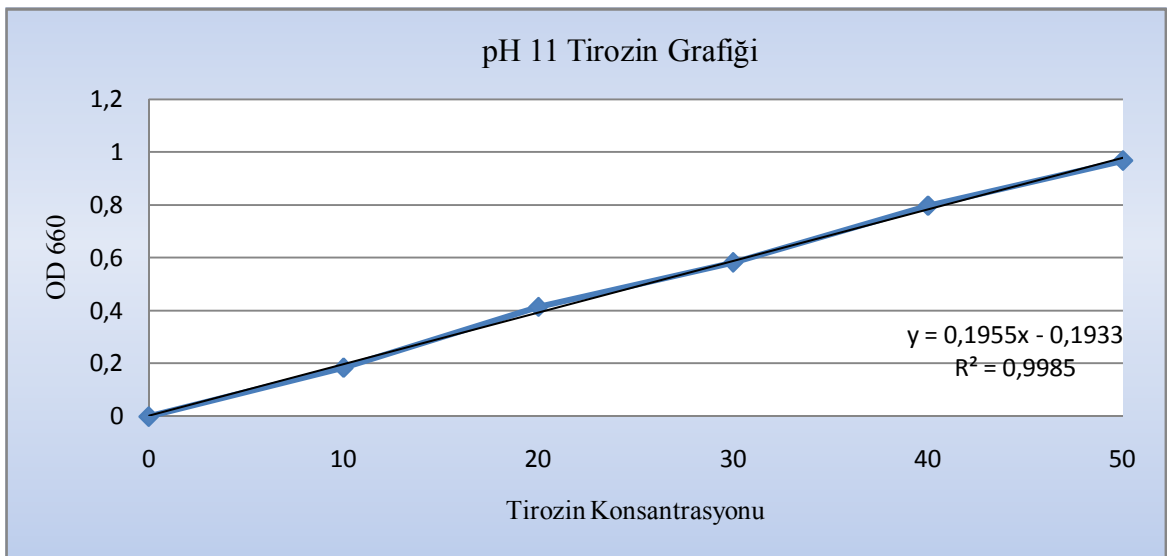
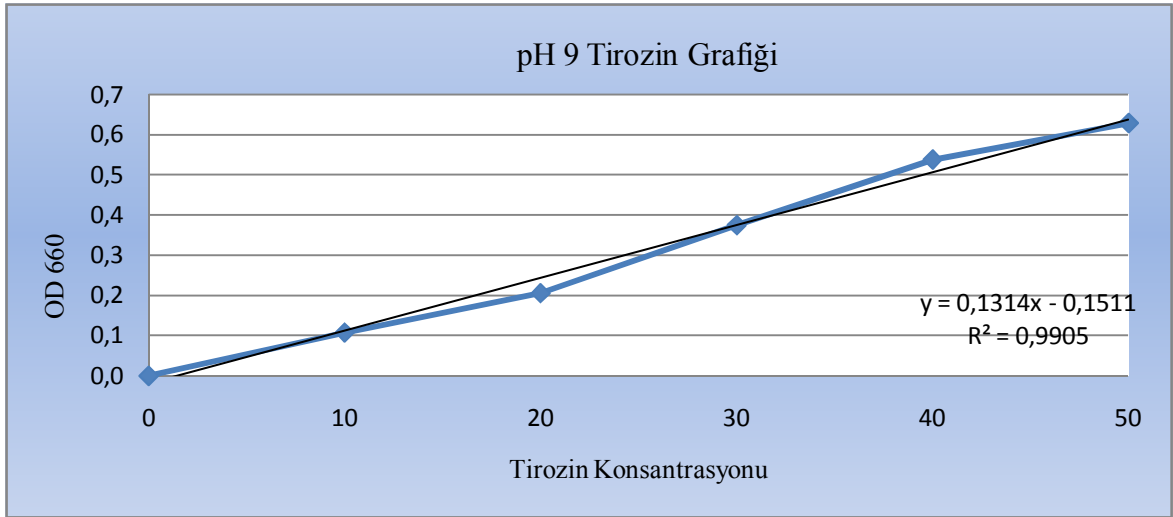
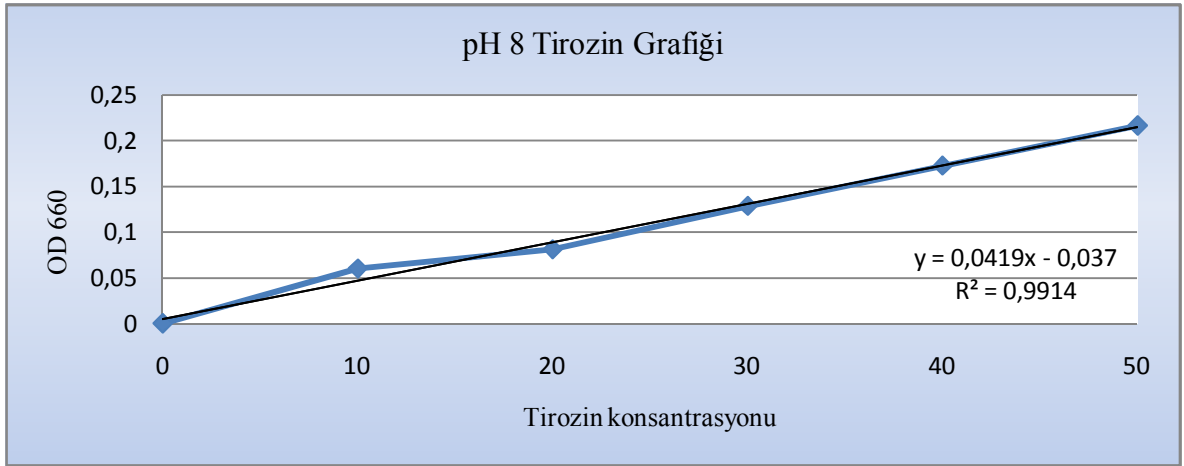
## Ek29. AL21 İzolatının 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1427

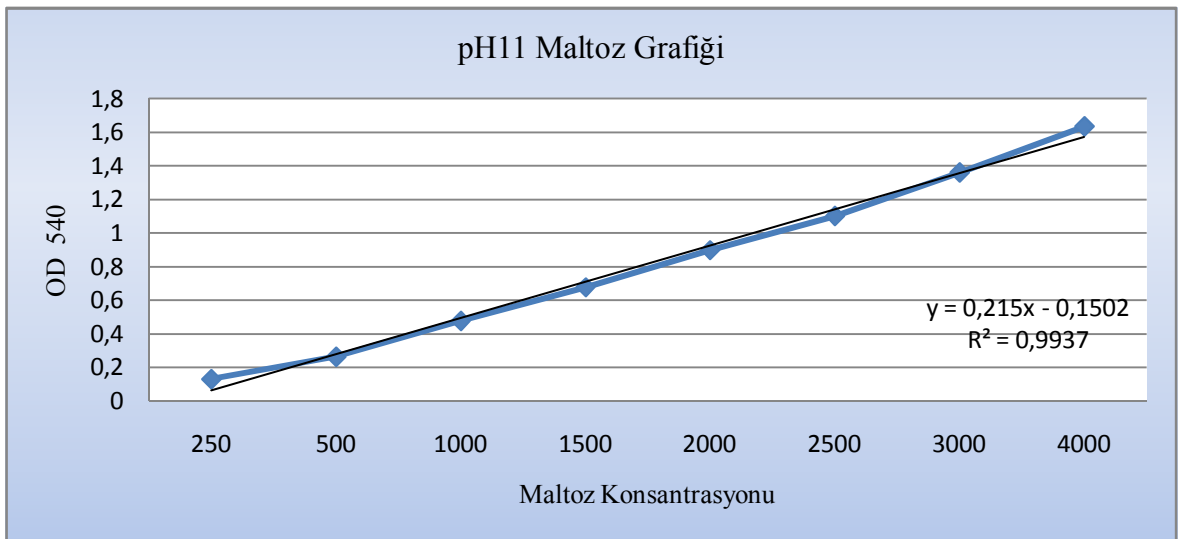
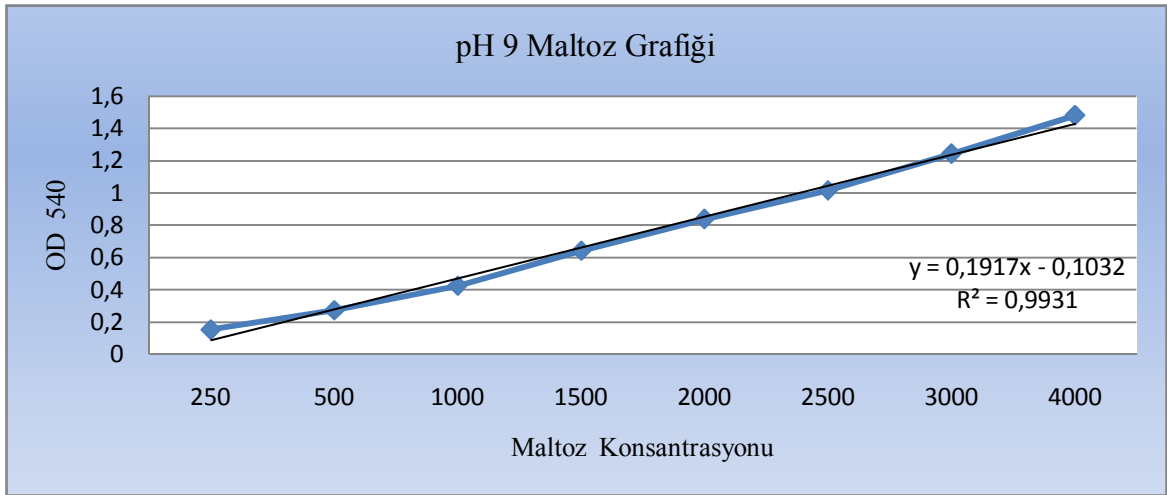
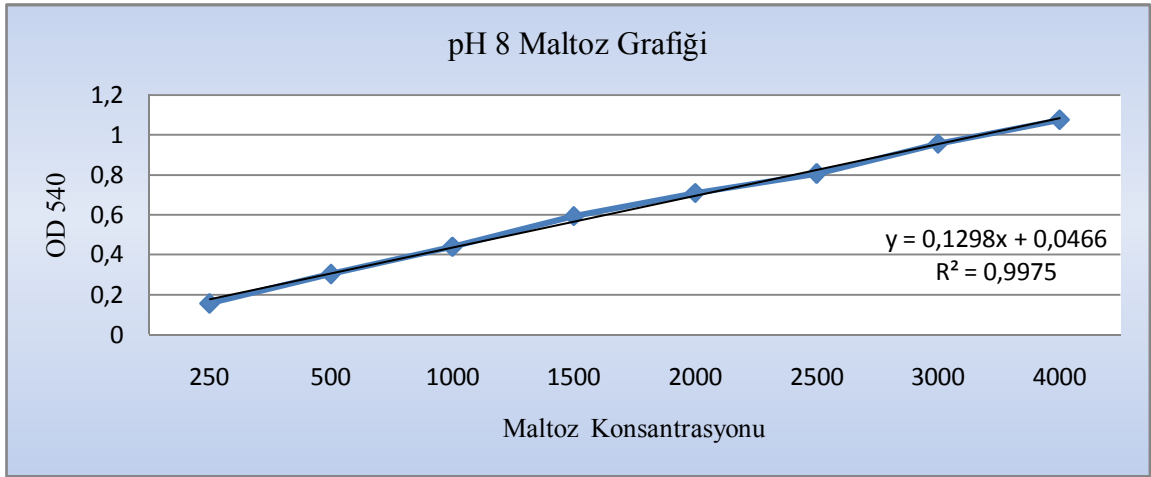
GCTATACATGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTCAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCCGTTCCACCTCATGGTG  
GAGCGGTAAAAGATGGCCTCTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCG  
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGGCACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT  
TTCGATGCCCTTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG  
CAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGAC  
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG  
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTC  
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTTGAGCGAATCCCATA  
AAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG  
GAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG  
CCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTC  
GGTGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGC



### Ek 30. Standart Tirozin Grafikleri



### Ek 31. Standart Maltoz Grafikleri



## ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1. Horikoshi I agar besiyeri.....	33
Çizelge 2. Horikoshi II agar besiyeri.....	34
Çizelge 3. Rodamin- B agar.....	34
Çizelge 4. Tributyrin agar.....	35
Çizelge 5. Tween 80 agar.....	35
Çizelge 6. SIM besiyeri.....	36
Çizelge 7. Kristal viole boyası.....	37
Çizelge 8. Gram iyodür çözeltisi.....	37
Çizelge 9. Safranin boyası.....	38
Çizelge 10. Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi.....	38
Çizelge 11. % 3'ük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi.....	38
Çizelge 12. Kovaks ayırıcı.....	38
Çizelge 13. Potasyum- fosfat tamponu.....	39
Çizelge 14. 10X TAE tamponu.....	40
Çizelge 15. 6x jel yükleme boyası.....	41
Çizelge 16. 400x syber green I jel boya çözeltisi.....	41
Çizelge 17. Deri işleme yöntemi.....	42
Çizelge 18. Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü.....	51
Çizelge 19. Thermalcyler protokolü.....	51
Çizelge 20. Islatma yumuşatma işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	55
Çizelge 21. Kireçlik işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	55
Çizelge 22. Kireç giderme-sama işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	56
Çizelge 23. Proteolitik özellikteki izolatların biyokimyasal test sonuçları.....	58
Çizelge 24. Proteolitik özellikteki izolatların karbonhidrat kullanım test sonuçları.....	60
Çizelge 25. Proteolitik özellikteki izolatların tuz toleransları.....	62

Çizelge 26. Proteolitik özellikteki izolatların pH toleransları .....	63
Çizelge 27. Proteolitik özellikteki izolatların sıcaklık toleransları .....	64
Çizelge 28. Proteaz aktivitesi ölçüm bulguları .....	65
Çizelge 29. Islatma yumuşatma işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	69
Çizelge 30. Kireçlik işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	69
Çizelge 31. Kireç giderme ve sama işlem basamağından elde edilen izolatlar.....	70
Çizelge 32. Amilolitik özellikteki izolatların biyokimyasal test sonuçları .....	71
Çizelge 33. Amilolitik özellikteki izolatların karbonhidrat kullanım test sonuçları.....	72
Çizelge 34. Amilolitik özellikteki izolatların tuz toleransları .....	74
Çizelge 35. Amilolitik özellikteki izolatların pH toleransları.....	75
Çizelge 36 . Amilolitik özellikteki izolatların sıcaklık toleransları .....	76
Çizelge 37. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi ölçüm bulguları .....	77
Çizelge 38. 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırma sonuçları.....	85
Çizelge 39. Çalışmada ilk kez tanımlanan izolatların benzer bulunduğu türlerin izole edildikleri kaynaklar.....	98

Şekil 1. Küçükbaş ve büyükbaş hayvan giysilik deri işlentisi genel akım şeması.....	4
Şekil 2. Proteaz enzim aktivitesine sahip bazı izolatlar. ....	53
Şekil 3. PS4 izolatının ışık mikroskobu görüntüsü (10X100). ....	54
Şekil 4. Bazı izolatlara ait indol pozitif ve negatif sonuçları.....	57
Şekil 5. Bazı izolatlara ait SIM besiyerindeki hareketlilik testleri. ....	57
Şekil 6. Bazı proteolitik izolatlara ait karbonhidrat kullanım test sonuçları. ....	59
Şekil 7. PS6 izolatının büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesinin 3'er saatlik değişimi. ....	66
Şekil 8. Amilaz enzim aktivitesine sahip kolonilerin petri görüntüsü. ....	67
Şekil 9. AS6 izolatının ışık mikroskobu görüntüsü (10X100).....	68
Şekil 10. Bazı amilolitik izolatlara ait karbonhidrat kullanım test sonuçları. ....	73
Şekil 11. AS6 izolatının büyüme eğrisi ve $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin 3'er saatlik değişimi. ....	78
Şekil 12. Bazı izolatlara ait saflaştırılmış PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	80
Şekil 13. PS13 izolatının dizi analizi sonucu elde edilen Forward kromotogramı. ....	81
Şekil 14. PS13 izolatının dizi analizi sonucu elde edilen Reverse kromotogramı.....	83
Şekil 15. Çalışmamızda tanımlanan izolatlar ile benzer buldukları türlerin karşılaştırmalı filogenetik ağacı. ....	86

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Derya Doğanay

Doğum Yeri: Mut/ MERSİN

Doğum Tarihi: 24.01.1980

### EĞİTİM DURUMU

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı

Yabancı Dil : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar-SCI–Diğer

**Doğanay D.**, Mericli Yapıcı B. ve Yapıcı A. N., 2013. Biyosid Uygulamalı giysilik Deri Üretiminde Tabaklama ve Sonrası Yaş İşlemlerde Mikrobiyal Yükün Tespiti Üzerine Bir Araştırma. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 17(1): 15-21

#### b) Bildiriler-Uluslararası–Ulusal

**Doğanay D.**, Yapıcı B.M., Meydani I., Bilgi S.T. Bazı Ticari Biyosidlerin Kireçlik Basamağından İzole Edilen Alkalifilik Bakteriler Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir.

Bilgi S.T., Yapıcı B.M., Turhan G., **Doğanay D.** Ham Deri Kaynaklı Aşırı Halofilik Arkeler Üzerine Bazı Ticari Biyosidlerin Etkinliğinin Araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir.

Mericli Yapıcı B., **Doğanay D.**, Bilgi S.T., 2011. Islatma Ve Yumuşatma Basamağındaki Alkalifilik Mikroorganizmaların Sayımı Ve İzolasyonu. X. Ekoloji ve Çevre Kongresi, 4-7 Ekim 2011, Çanakkale.

Mericli Yapıcı B., Bilgi S.T., **Doğanay D.**, 2011. Islatma-yumuşatma Basamağından İzole Edilen Bazı Mikroorganizmaların pH ve Tuz Toleranslarının İncelenmesi. X. Ekoloji ve Çevre Kongresi, 4-7 Ekim 2011, Çanakkale.

**Doğanay, D.** ve Meriçli Yapıcı, B., 2008. Deri Endüstrisinde Karşılaşılan Mikroorganizmalar ve Zararları. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumları, Biga Değerleri Sempozyumu, Çanakkale-Türkiye. 382-392.

**c) Katıldığı Projeler**

Tabaklama ve Sonrası Yaş İşlemlerde Mikrobiyal Yükün Tespiti Üzerine Bir Araştırma. Araştırmacı (Ç.O.M.Ü.-BAP).

**İLETİŞİM**

E-posta Adresi: derya2904@hotmail.com