DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE BULUNAN SU KAYNAKLARINDAN SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ENZİM ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selman MUSLU

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2019
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE BULUNAN SU KAYNAKLARINDAN SOĞUĞA ADPTE OLMUŞ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ENZİM ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selman MUSLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE BULUNAN SU KAYNAKLARINDAN SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ENZİM ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Selman MUSLU tarafından yapılan bu çalışma 27.../06.../2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~** (.../...) ile kabul edilmiştir.

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

Üye : Prof.Dr. Mesut TAŞKIN *İmza* :

Üye : Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25.../07.../2019... tarih ve 30.../...66..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE BULUNAN SU KAYNAKLARINDAN SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ENZİM ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selman MUSLU

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

Danışman: Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada Erzurum ve Van çevrelerinden toplanan su örneklerinden psikrofilik veya psikrotolerant özellik gösteren toplam 60 bakteri izole edildi. rep-PCR ve 16S rRNA analizleri sonucu farklı olduğu tespit edilen *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Exiguobacterium*, *Glutamicibacter* cinslerine ait 9 örneğin konvensiyonel ve moleküler karakterizasyona devam edildi. Psikrofilik özellik gösteren izolatların pH, tuz ve sıcaklık ihtiyaçları için testler yapıldı. İzolasyonu yapılan örneklerin, $SM^{01}12^{E}$ hariç diğerlerinin %2-10 aralığında tuz konsantrasyonlarında büyüyebildiği gözlemlendi. İzolatların tümünün gelişebildikleri en uygun pH aralığı 5-7 olarak belirlenirken $SM^{01}12^{E}$ hariç tüm izolatların 25-30°C aralığında da gelişim gösterebildikleri gözlemlendi. İlginç bir şekilde $SM^{01}2^{D}$ suşunun %15 tuz yoğunluğunda gelişim gösterebildiği, $SM^{01}8^{A}$ suşunun ise 4-30°C gibi geniş bir sıcaklık ve pH: 4-9 gibi geniş bir pH aralığında gelişim gösterdiği tespit edildi. Tüm test izolatlarının 16S rRNA sekans analizleri gerçekleştirildi. Bu analizler sonucunda 16S rRNA dizileme ve biyoinformatik çalışmaları sonrasında bakterilerin; $SM^{01}1^{A}$: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*'e %99,93; $SM^{01}2^{D}$: *Psychrobacter faecalis*'e %99,42; $SM^{01}5^{A}$: *Rahnella aquatilis*'e %99,21; $SM^{01}8^{A}$: *Shewanella putrefaciens*'e %99,86; $SM^{01}8^{F}$: *Pseudomonas putida*'ya %99,93; $SM^{01}10^{A}$: *Pseudomonas lactis*'e %99,28; $SM^{01}12^{E}$: *Flavobacterium chryseum*'a %98,33; $SM^{01}17^{A}$: *Exiguobacterium mexicanum*'a %99,86 ve $SM^{01}18^{A}$: *Glutamicibacter arilaitensis*'e %98,69 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Elde edilen izolatlar proteaz, lipaz, amilaz ve selülaz enzimleri açısından değerlendirildi. $SM^{01}1^{A}$ ve $SM^{01}10^{A}$ olarak kodlanan izolatların güçlü multi enzim aktivitesi gösterdiği ve hiçbir izolatın selülaz enzimi üretemediği saptanmıştır.

2019, 87 sayfa

Anahtar kelimeler: Psikrofilik bakteri, 16S rRNA sekans analizi, $(GTG)_5$-PCR, proteaz, lipaz, amilaz, selülaz

ABSTRACT

Master Thesis

EXAMINING THE ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND RESEARCH OF POTENTIALS OF ENZYME PRODUCTION OF COLD ADAPTED BACTERIA FROM WATER RESOURCES IN EASTERN ANATOLIA

Selman MUSLU

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

Supervisor: Prof.Dr. Ahmet ADIGUZEL

In this study, a total of 60 bacteria which have psychrophilic or psychrotolerant characteristics were isolated from water samples that collected from Erzurum and Van environments. The conventional and molecular characterization of 9 samples belonging *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Exiguobacterium*, *Glutamicibacter* genus which were found to be different as a result of rep-PCR and 16S rRNA analyses, were continued. Tests were carried out for the pH, salt and temperature requirements of the isolates that psychrophilic characteristics. It was observed that the isolated samples could grow at salt concentrations in the range of 2-10% except $SM^{01}12^{E}$. The most suitable pH range was determined as 5-7 for all isolates, and all isolates except $SM^{01}12^{E}$ were able to develop in 25-30°C temperature range. Interestingly enough, the $SM^{01}2^{D}$ strain was able to grow at a salt concentration of 15%, and the $SM^{01}8^{A}$ strain developed over a wide temperature range of 4-30°C and a wide pH range as 4-9. 16S rRNA sequence analysis of all isolates were performed. As a result of these analyzes $SM^{01}1^{A}$: 99.93% to *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, $SM^{01}2^{D}$: 99.42% to *Psychrobacter faecalis*, $SM^{01}5^{A}$: 99.21% to *Rahnella aquatilis*, $SM^{01}8^{A}$: 99.86% to *Shewanella putrefaciens*, $SM^{01}8^{F}$: 99.93% to *Pseudomonas putida*, $SM^{01}10^{A}$: 99.28% to *Pseudomonas lactis*, $SM^{01}12^{E}$: 98.33% to *Flavobacterium chryseum*, $SM^{01}17^{A}$: 99.86% to *Exiguobacterium mexicanum*; $SM^{01}18^{A}$: 98,69% to *Glutamicibacter arilaitensis* were determined as similar. The obtained isolates were evaluated for protease, lipase, amylse and cellulase enzymes. It was observed that two isolates, coded as $SM^{01}1^{A}$ and $SM^{01}10^{A}$, showed strong multi enzyme activity and none of these isolates could produce cellulase enzyme.

2019, 87 pages

Keywords: Psychophilic bacteria, 16S rRNA sequence analysis, $(GTG)_5$-PCR, protease, lipase, amylase, cellulase

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen, tüm çalışmamız boyunca her türlü imkanı sağlamaktan kaçınmayan çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan ve yol göstericim olan, bana hem bilimsel hem de hayata karşı çok çeşitli bakış açıları kazandıran Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI'ya ve Sayın Arş. Gör. Sumeyya AKBULUT'a,

Hoş sohbetleri ile tüm bürokrasi için bizlere yol gösteren, hiçbir sorumuzu yanıtsız bırakmayan ve içtenliği ile gönüllere taht kuran Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Doğan DİKBAŞ'a

Tüm üniversite hayatım boyunca desteğini esirgemeyen ve yol gösterici konuşmalarıyla hayatıma farklı bir anlam katan Ayşegül KAYAR'a,

Çok değerli çalışma arkadaşlarım olan ve tüm bilgilerimizi paylaştığımız Elif ERKAYA'ya, Esra ÖZTÜRK'e, İkra ÖZKAN, Ahmet Emin BABAT, Fatma ALTINOK, Ayşe VAROL ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve gelecekte dahi ellerini omuzlarımda hissedeceğim çok değerli babam Osman MUSLU ve sevgili annem Müjgân MUSLU'ya ve çok değerli ağabeylerim Burak MUSLU ve Fatih MUSLU'ya, sevgili ve çok değerli ablam B. Betül HARBO'ya, beni bugünlere getirdikleri için,

…canı gönülden teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Geldikleri günden beri tüm hayatlarımızı renklendiren canım yeğenlerim
Elif Yağmur ve Asel Ayşe'ye…

Selman MUSLU

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
1 . GİRİŞ 1
1.1. Morfolojik Olarak Bakteriler 2
1.2. Bakteriyel Hücre Yapısı 2
1.3. Mikrobiyal Ekosistemlere Bakış 4
1.4. Yaşadıkları Ortamların Sıcaklıklarına Göre Mikroorganizmaların Adlandırılması 5
1.4.1. Termofil mikroorganizmalar (Termofilikler) 5
1.4.2. Mezofil mikroorganizmalar (Mezofilikler) 6
1.4.3. Psikrofilik mikroorganizmalar (Psikrofiller) 7
1.4.3.a. Zorunlu psikrofil mikroorganizmalar 8
1.4.3.b. Psikrotolerant mikroorganizmalar 9
1.5. Bakteri Sistematiği 9
1.5.1. Bakteri sistematiğinde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler 11
1.5.1.a. 16S rRNA gen lokusu dizileme yöntemi 11
1.5.1.b. Restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi (RFLP) 12
1.5.1.c. Rasgele amplifiye olan polimorfik DNA (RAPD-PCR) 13
1.5.1.d. Genomik parmak izi analizi (GF=Genomic Fingerprint) 14
1.5.2. Bakteri sistemetiğinde sıklıkla kullanılan genotipik yöntemler 15
1.5.2.a. DNA baz kompozisyonunun belirlenmesi (%GC) 15
1.5.2.a. DNA-DNA homolojisi (Hibridizasyon) 16
1.5.3. Bakteri sistematiğinde kulanılan diğer kemotaksonomik yöntemler 17
1.6. Enzim 18
1.6.1. Mikrobiyal enzimler 20

1.6.2. Endüstriyel bağlamda enzimler 21
1.6.3. Psikrofilik enzimler ve adaptasyonları 25
1.6.4. Endüstriyel açıdan psikrofilik enzimler 25
2 . KURAMSAL TEMELLER 28
3 . MATERYAL ve YÖNTEM 33
3.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar 33
3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Kitler 33
3.3. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanışı 34
3.4. Örneklerin Toplanması 36
3.5. Psikrofilik Bakterilerin İzolasyonu 36
3.6. Seçilen İzolatların Klasik Tekniklerle Tanısının Yapılması 37
3.6.1. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi 37
3.6.1.a. Gram özelliklerinin belirlenmesi 37
3.6.1.b. Endospor oluşumu testi 38
3.6.2. Fizyolojik özelliklerin belirlenmesi 39
3.6.2.a. Bakteriyel hareketlilik testi 39
3.6.2.b. Tuz konsantrasyonun bakteri büyümesi üzerindeki etkisinin araştırılması 39
3.6.2.c. Sıcaklık değişimlerinin bakteri büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması 39
3.6.2.d. pH değişimlerinin bakteri büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması 40
3.6.3. Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi 40
3.6.3.a. Katalaz testi 40
3.6.3.b. Oksidaz testi 40
3.7. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu 41
3.7.1. Genomik DNA izolasyonu 41
3.7.2. DNA yoğunluğunun belirlenmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması 43
3.7.3. DNA örneğinin ve çalışma solüsyonun derişimlerinin belirlenmesi 43
3.7.4. rep-PCR yöntemi ile bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi 44
3.7.5. 16S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi 46
3.7.6. Klonlama deneyleri 47
3.7.6.a. Kompetent hücrelerin hazırlanması 47
3.7.6.b. Ligasyon 49
3.7.6.c. Vektörün alıcı hücrelere aktarılması (Transformasyon) 49

3.7.6.d. Koloni seçimi 50
3.7.6.e. Koloni-Polimeraz Zincir Tepkimesi 50
3.7.6.f. Koloni-Polimeraz Zincir Tepkimesi sonuçlarının kontrolü 51
3.7.6.g. Plazmit izolasyonu 52
3.7.6.h. Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve sekansa gönderilecek plazmit miktarının belirlenmesi 53
3.7.7. DNA dizi analizi (Sekans) sonuçlarının işlenmesi 53
3.7.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi 53
3.8. İzolasyonu Yapılan Bakterilerin Endüstri Açısından Değerli Bazı Enzimleri Üretebilme Yeteneğinin Araştırılması 54
3.8.1. Proteaz aktivesinin tayini 54
3.8.2. Lipaz aktivitesinin tayini 54
3.8.3. Amilaz aktivitesinin tayini 55
3.8.4. Selülaz aktivitesinin tayini 56
4 . ARAŞTIRMA BULGULARI 57
4.1. Psikrofilik/Psikrotolerant Bakterilerin İzolasyonu 57
4.2. İzolatların Geleneksel Yöntemler İle Tanısı 57
4.2.1. İzolatların morfolojilerinin belirlenmesi 57
4.2.1.a. İzolatların hücre şekillerinin belirlenmesi 57
4.2.1.b. İzolatların Gram özelliklerinin belirlenmesi 58
4.2.1.c. İzolatların endospor özelliklerinin belirlenmesi 58
4.2.2. İzolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi 59
4.2.2.a. İzolatların hareketliliklerinin belirlenmesi 59
4.2.2.b. İzolatların gelişim gösterebildikleri sıcaklık değerlerinin araştırılması 59
4.2.2.c. İzolatların gelişim gösterebildikleri pH aralıklarının araştırılması 60
4.2.2.d. İzolatların gelişim gösterebildikleri tuz yoğunluklarının araştırılması 61
4.2.3. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 62
4.2.3.a. Katalaz testi 62
4.2.3.b. Oksidaz testi 62
4.3. İzolatların Moleküler Tanılama Yöntemleri İle Karakterize Edilmesi 62
4.3.1. Genomik DNA izolasyonu 62
4.3.2. $(GTG)_5$ -PCR yöntemi ile izolatların gen profillerinin belirlenmesi 62

4.3.3. 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir tepkimesi 63
4.3.4. Klonlama deneyleri 64
4.3.4.a. Koloni PCR 64
4.3.4.b. Plazmit izolasyonu 64
4.3.4.c. DNA dizi analizi 64
4.4. İzolatların Endüstri Açısından Değerli Enzimleri Üretebilme Potansiyellerinin Belirlenmesi 65
4.4.1. Proteaz aktivitesinin tayini 66
4.4.2. Lipaz aktivitesinin tayini 66
4.4.3. Amilaz aktivitesinin tayini 66
4.4.4. Selülaz aktivitesinin tayini 66
5 . TARTIŞMA ve SONUÇ 68
KAYNAKÇA 74
EKLER 85
EK 1 85
EK 2 86
ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bç	: baz çifti
bs	: biyogüvenlik seviyesi
BSA	: Bovin Serum Albumin
DMSO	: dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
gr	: Gram
IPTG	: İzopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
M	: Molar
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
RE	: Restriksiyon endonükleaz
Rep-PCR	: repetitive polymerase chain reaction
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat derece

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Sık kullanıma sahip bazı enzimler ve kullanım alanlarını gösterir çizelge. 23
Çizelge 1.2. Ticari olarak kullanımda olan bazı psikrofilik enzimler ve kullanım alanlarını gösterir çizelge. 27
Çizelge 3.1. $(GTG)_5$ -PCR programı. 45
Çizelge 3.2. 16S rRNA-PCR programı. 47
Çizelge 3.3. Koloni-PCR programı. 51
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik özelliklerini gösteren çizelge 58
Çizelge 4.2. İzolatların sıcaklık değişimlerine göre büyümelerine ilişkin çizelge 60
Çizelge 4.3. İzolatların gelişim gösterebildikleri pH değerlerini gösterir çizelge. 60
Çizelge 4.4. İzolatların gelişim gösterebildikleri tuz yoğunluklarını gösterir çizelge 61
Çizelge 4.5. 16s rRNA dizisi benzerlik oranları ve GenBank erişim numaraları. 64
Çizelge 4.6. İzolatların enzim aktivitesi sonuçlarını gösteren çizelge. 67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. 9 izolata dair $(GTG)_5$-PCR sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. 63
Şekil 4.2. Test izolatları ve tip türlerine ait Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı.....65

1. GİRİŞ

Canlı adı verilen kavram, yaşayan bir birim olarak tanımlanmaktadır. Yaşam ise canlı varlıkların cansız ortamlardan veya ölmüş varlıklardan ayrımının yapılması olarak ifade edilir. Yaşamsal faaliyetler, organizmalar adı verilen canlılar tarafından sergilenir. Organizmalar ise, canlıların temel ortak özelliklerinden olan metabolizma, üreme, farklılaşma, iletişim, hareket ve evrimleşme gibi temel faaliyetleri bireysel olarak yerine getirebilen canlılara verilen isimdir. En küçük organizmalar, tek hücreler, en gelişmiş organizmalar, çok hücreli karmaşık yapılar dahil tüm organizmalar bu ortak özellikleri sergilerler ve böylece yaşamın temelini oluştururlar. Tüm türlerin, cinslerin ve daha üst taksonların buluştuğu son nokta canlılar alemi olarak adlandırılır ve bu canlılar alemi kendi içerisinde büyük taksonlara ayrılır. Yaşamın üç domaini olarak adlandırılan bu yapı, Bacteria, Archaea ve Eukarya (Bakteriler, Arkeler, Ökaryotlar) olarak isimlendirilir (Emmeche 1997; Hine 2008; Madigan and Martinko 2009).

Bakteriler kısaca, biyolojik bir tür hücredir. Filogenik olarak prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir kısmını oluştururlar. Genellikle birkaç mikron boyutlarında olup, çubuk, küre veya spiral şekil gibi farklı hücre morfolojisine sahip olabilirler. Bakteriler yaklaşık 4,5 milyarlık canlı yaşamının ilk formları olarak kabul edilir ve günümüzde de geniş habitatlarda yaşam faaliyetlerini sürdürürler. Canlıların yaşam alanlarının içerdiği canlı türlerinin genellikle %50'den fazlası prokaryotiktir ve koşulların optimal olduğu durumlarda bu yüzdeliğin hemen hepsini bakteriler oluşturur. Bakteriler suda, toprakta, asidik ortamlarda, bazik ortamlarda, radyoaktif faaliyetlerin yoğun olduğu ortamlarda, toprakların derin bölgelerinde, derin deniz sedimentlerinde, bitkilerin veya hayvanların üzerinde parazit veya simbiyont olarak yaşayabilir (Rappé and Giovannoni 2003; Fredrickson *et al.* 2004).

1.1. Morfolojik Olarak Bakteriler

Bakteriler çok çeşitli yapılar, şekiller ve boyutlarda olabilir. Genellikle bakteriler, 0,5-5,0 µm (mikrometre) boyutlarındadır. İstisnai durumlardan birisi olan *Thiomargarita namibiensis* neredeyse gözle görülebilir bir boyuttadır ve boyutu yaklaşık olarak 0,5-0,6 milimetredir (Schulz *et al.* 2001). *Epulopiscium fishelsoni* türü ise 0,7 mm'ye kadar büyüklüklerde görülebilir (Williams 2011). Bakterilerin en küçük üyelerini ise *Mycoplasma* cinsleri ve *Ultramicrobacteria* cinsleri oluşturur (Robertson *et al.* 1975). *Ultramicrobacteria* üyeleri 0,1 µm veya daha küçük bakterileri içerir. Bu sebeple *Ultramicrobacteria* üyeleri üzerinde çok fazla çalışma yapılamamıştır (Janssen *et al.* 1997; Velimirov 2001).

Çoğu bakteriyel tür ya kok şekilli (küre şekilli) ya da basil şekilli (çubuk şekilli) canlılardır. Vibrio adı verilen hafif kıvrık şekilli ya da başka bir söylemle virgüle benzeyen bir şekle de sahip olabilirler. Geniş çubuk, yıldız şekilli, helikal şekilli veya flament yapıda bakteriler de az sayıda da olsa tanımlanmıştır. Bakterilerin bu çok sayıdaki şekilleri onların yaşam koşullarıyla doğrudan ilişkilendirilebilir. Bakteriler bulundukları ortamlarda hayatta kalmak için bu şekilsel yapılardan da faydalanır. Yüzeylere tutunma, pasif veya aktif hareketlerde bulunma, ortamdaki herhangi bir olumsuz durumdan kaçınma, besin ihtiyacını karşılama veya yüksek-düşük sıcaklık, yüksek-düşük basınç, aşırı tuzlu ortamlarda yaşamlarını devam ettirme gibi özellikleri kazanabilirler (Young 2006; Yang *et al.* 2016,).

1.2. Bakteriyel Hücre Yapısı

Bakteri hücreleri, genel sitoplazmik zar özelliğinde, çift tabakalı fosfolipitten oluşan hücre zarı ile çevrilidir. Bu zar hücreleri dış ortamdan ayırır ve hücre içeriğinin istikrarlı olmasını sağlar, bu sayede hücre içi moleküller, DNA, RNA, proteinler ve intraselüler diğer maddeler, hücre dışına çıkamaz. Fosfolipit tabakalar hidrofilik ve hidrofobik uçlara sahip olup genellikle 14-20 karbonludurlar. Bu fosfolipitler çift bağ içerirler ve bu sayede

hücre zarına belirli bir oranda akışkanlık kazandırırlar. Fosfolipitlerin ihtiva ettiği çift bağ sayısı organizmaların yaşadığı ortamın sıcaklıklarıyla doğrudan ilişki içerisindedir. Mezofil mikroorganizmaların zarlarında genel olarak 3-5 çift bağ bulunurken, termofilik mikroorganizmalarda daha az sayıda çift bağ bulunur ve yağ asidi zincirleri daha uzundur ki bu özellik de yağın donma ve erime noktalarına direkt etki eder. Psikrofilik mikroorganizmalar ise çok daha fazla sayıda çift bağ içerirken aynı zamanda da çok sayıda kısa yağ asidi zincirlerine sahiptir, bu şekilde soğuk ortamlarda hatta sıfırın altındaki sıcaklıklarda bile bu yağlar akışkanlığını koruyabilirler (Collins *et al.* 2019).

Prokaryotik organizmalar (Bakteriler ve Arkeler) zarlı organel içermezler. Bakteriler, hücre içerisinde proteinlerin, nükleik asitlerin yerleşimini belirlemek ve hatta hücre bölünmesini düzenlemek için çok bileşenli hücre iskeletine sahiptirler (Gitai 2005; Shih *et al.* 2006). Bakterilerin hücrelerinde genetik materyali çevreleyen bir zar yapısı yoktur. Bakteri hücrelerinde genetik materyal nükleoid adı verilen düzensiz şekilli, tek bir halkasal DNA kromozomu olarak sitoplazmada yer almaktadır (Thanbichler *et al.* 2005).

Bakteriler de tüm canlı organizmalar gibi ribozama sahip olup protein üretimi yapar. Ancak bakteriyel ribozomlar Arke ve Ökaryot ribozomlarından farklıdır. Bu ribozomal alt birimlerin üretiminden sorumlu gen bölgeleri bakterilerin sistematiğinde de önemli bir rol oynar (Poehlsgaard *et al.* 2005).

Bakteriler hücre zarını dıştan çevreleyen bir dış hücre duvarına sahiptirler. Bakteriyel hücre duvarı, D-alanin, L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin veya yapısal benzerlik taşıyan diaminopimelik asit (DAP) aminoasitleri ile bağ yapmış N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit şeker türevlerini içeren, peptidoglikan olarak adlandırılan moleküllerden oluşur. Peptidoglikan yapısında, şekerler glikan dizilerine β(1,4) bağlarıyla kovalent olarak, aminoasitler ise peptid çapraz bağlarıyla birbirlerine bağlanırlar. Bu sayede peptidoglikan tabaka çok yönlü sertlik kazanmış olur. Gram-pozitif bakterilerde aminoasitler arasındaki çapraz peptid bağları ara köprü adı verilen bir takım aminoasitlerin oluşturduğu yapı ile sağlanırken, Gram-negatif bakterilerde ara köprü oluşumu gözlenmez (Madigan *et al.* 2015).

1.3. Mikrobiyal Ekosistemlere Bakış

Organizmalar ve bulunduğu ortamlardaki bileşenler (fiziksel, kimyasal, biyolojik) bütününe ekosistem adı verilir (Madigan *et al.* 2015). Sucul ortamlar (akarsu, göl, deniz vb.), karasal ortamlar (toprak, kumullar, yüzeyaltı derinlikler), yüksek organizmalar (çok hücreli mantarlar, bitkiler, hayvanlar) önemli mikrobiyal ekosistemlerdir. Metabolik süreçler ile ekosistemden besin alımı ve atık ürünlerin tekrar ekosisteme salınması, yeni hücrelerin oluşması ve bu olayların yeni hücreler tarafından da tekrar edilmesi ekosistemi önemli ölçüde etkilemektedir. Bu şekilde değişen ekosistemler kaynak yeterliliği bakımından genişleyip daralabilirler, diğer başka organizmalara açık hale gelebilir veya başka organizmaların gelişmesini tamamıyla engelleyebilir.

İlk mikrobiyal ekosistem çalışmaları, diğer bir deyişle modern mikrobiyal ekoloji, Robert Hungate ve arkadaşları tarafından anaerobik mikroorganizmaların kültüre edilmesi ile olmuştur. Hungate ve ark. rumen ekosistemi çalışmışlar ve modern mikrobiyal ekolojinin temellerini atmışlardır (Konopka 2009).

Mikroorganizmalar neredeyse tüm ekosistemlerde bulunur ve hemen tüm ekosistemlerin belkemiği konumunda yer alırlar. Kemosentetik mikroorganizmalar ışığın olmadığı ve fotosentezin olanaksız olduğu ilkel dünya koşullarında ve günümüzde bu tip bölgelerde oksijen üretebilir ve diğer mikroorganizmalara karbon kaynağı sağlayabilirler. Bazı mikroorganizmalar çok etkin geri dönüşüm yeteneklerine sahiptir ve diğer organizmaların atık olan ürünlerini kendilerine ve diğer organizmalara geri kazandırabilirler. Bazı mikroorganizmalar ise azot fiksasyonu ile kullanışsız serbest azot gazını organizmaların kullanabileceği formlara dönüştürebilir. Yukarıdaki örnekler insanlar dahil çoğu organizmanın içerisinde bulunduğu kalabalık ekosistemlere örnektir (Fenchel *et al.* 2012).

1.4. Yaşadıkları Ortamların Sıcaklıklarına Göre Mikroorganizmaların Adlandırılması

1.4.1. Termofil mikroorganizmalar (Termofilikler)

Termofil mikroorganizmalar (termo; kimya alanında sıcaklık anlamında kullanılan ön ektir ve yunanca termotita ısı anlamına gelir.) 44-122°C gibi geniş ve yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmalardır. Termofilik organizmaların çoğu üyesi Arke'dir, fakat genellikle 40-70°C gibi, nispeten düşük kalan sıcaklıklarda genel olarak bakterilere rastlanır (Madigan *et al.* 2006). Hatta termofilik Öbakteri'lerin en eski yaşam formlarından birisi ve en yaşlı bakteriler oldukları 2009 yılında Horiike ve ark. tarafından ileri sürülmüştür.

Termofilik mikroorganizmalar, kaplıcalarda, derin deniz hidrotermal bacalarda, organik gübre ve bataklık kömürü bulunan jeotermal olarak ısınmış yeryüzü bölgelerinde sıklıkla bulunmaktadır.

Termofilik mikroorganizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamlarını devam ettiren organizmalar olup, bu sıcaklıklarda yoğun enzimal aktivite gösterebilirler. Dolayısıyla bu organizmaların enzimleri sıcaklığa karşı diğer çoğu organizmadan daha dayanıklıdır ve stabilitesi uzun süreler değişmeyebilir. Madigan ve ark. tarafından 2006 yılında yazılan Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi kitabında da yer verildiği üzere, termofilik organizmalar özel protein katlanmaları içerebilirler ve bu organizmaların ısı-şok proteinlerinin diğer organizmalarınkinden daha iyi çalıştığını söylemek mümkündür.

Termofilikler genel olarak üç ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar:

Basit termofiller: 50-64°C

Aşırı termıofiller: 65-79°C

Hipertermofiller: 80°C ve üzeri

Bu gruplara dahil edilmeyen fakat farklı bir gruplandırmada yer alan, zorunlu termofillller, fakültatif termofiller gibi isimler de mevcuttur. Zorunlu termofiller genellikle 50°C sıcaklıkların altında gelişemezler ve daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaçları vardır. Bu zorunlu termofiller genellikle aşırı termofiller grubunda yer alır ve optimal olarak 65-80°C sıcaklıklara gereksinim duyarlar. Fakültatif termofiller ise her gruba dahil olabilen termofillerdir. Belirli bir optimal sıcaklığa ihtiyaç duysalar da bu sıcaklık değerleri bu organizmalar için zorunlu değildir (Stetter 2006).

1.4.2. Mezofil mikroorganizmalar (Mezofilikler)

Mezofil mikroorganizmalar (mezo; yunanca orta, ortada bulunan anlamlarına gelmektedir) orta sıcaklıklar olarak tanımlanan genellikle 20-45°C sıcaklıklarda optimal (en uygun) gelişme gösterebilen mikroorganizmalardır. Günlük insan hayatının hemen her yerinde olan mezofil organizmalar, sıklıkla peynir, yoğurt, bira, şarap gibi insanların tüketiminde olan bazı gıdalarda da sıklıkla bulunur. İnsan mikrobiyomunu oluşturan organizmaların ve patojenlerin çoğu insan vücut sıcaklığında yaşayabilen ve gelişim gösterebilen mezofilik organizmalardır (Willey *et al.* 2008).

Mezofillerin sahip olduğu proteinler daha az kararlı yapıya sahip olup hücre bileşenlerinin esnekliği zayıftır (Vijayabaskar and Vishveshwara 2010). Tüm bu sebeplerden ötürü mezofillerin büyük bir çoğunluğu yüksek sıcaklıklarda yapısal işlevlerini yitirir ve düşük sıcaklıklarda hücresel aktivite gösteremezler. Hücre yapılarından hücresel moleküllerine kadar, mezofiller sıcaklık değişimlerine karşı çok hassastır. Hücre zarının ihtiva ettiği yağ asitleri fazla akışkan olamaz, bu sebeple yüksek sıcaklıklarda bozulan hücre zarı, düşük sıcaklıklarda herhangi bir faaliyette bulunamaz (Li *et al.* 1993).

Mezofilik mikroorganizmaların büyük çoğunluğu, soğukla indüklenen proteinlere sahiptir ki bu proteinler soğuk ortamlarda aktifleşerek soğuk şok proteinlerinin üretimini aktive eder. Soğuk şok proteinleri organizmayı donmaktan ve DNA'sını kırılmaktan

korur. Bu sayede mezofilik organizmalar soğuk ortamlarda ölmez ve uygun şartların tekrar sağlanması halinde yaşamlarını sürdürebilirler (Perrot *et al.* 2000).

1.4.3. Psikrofilik mikroorganizmalar (Psikrofiller)

Psikrofilik mikroorganizmalar genel olarak -20; +28 ^{0} C aralığında büyüyebilir ve üreyebilirler (Neufeld *et al.* 2013; Niederberger 2016). Bu mikroorganizmalar, kutup bölgeleri ve derin deniz bölgeleri gibi kalıcı olarak soğuk olan ortamlarda bulunabilir. Ayrıca bu organizmalar yüksek tuzluluk oranına sahip derin deniz buzullarının cep adı verilen oluklarında da bulunabilirler (D'Amico *et al.* 2006). Hatta -39 ^{0} C'nin altında donmuş toprakta bile belirli ve az bir miktarda mikrobiyal aktivite ölçülmüştür (Panikov *et al.* 2006). Tüm bunların yanında psikrofilik bakterilerin özellikle patojen (hastalık yapıcı olanları) olanları, 50 ^{0} C'ye kadar aktivite gösterebilmektedirler (Rogers *et al.* 2018)

Psikrofilik mikroorganizmalar donmaktan, yaşadıkları ortam yavaşça serinleştiği sürece korunurlar. Serbest yaşayan hücreler -26 ^{0} C'ye kadar aktivite gösterirken, birlikte yaşayan hücreler -50 ^{0} C'ye kadar aktivite gösterebilir. Hücreler bu sıcaklıkların altına kadar belirli bir ölçüde hücre dışı sıvıda bir miktar metabolik aktivite gösterebilir ve normal yaşam sıcaklıklarına döndüklerinde büyümeye ve üremeye devam edebilirler (Neufeld *et al.* 2013).

Ayrıca bu hücreler hayatta kalabilmek ve işlevsellik adına birtakım lipit adaptasyonları geçirmişlerdir (Collins *et al.* 2018). Psikrofilikler yüksek oranda kısa ve doymamış yağ asitleri içeren bir membrana sahiptir. Daha uzun yağ asitleri ile karşılaştırıldığında bu tip yağ asitleri düşük erime noktası oluşturur ve membrandaki akışkanlığı arttırır (D'Amico *et al.* 2001; Chattopadhyay *et al.* 2003). Ek olarak psikrofilik mikroorganizmaların çoğunun hücre zarında karotenoidler bulunur ki bu moleküller de özellikle düşük sıcaklıklarda akışkanlığa yardımcı olur (Dieser *et al.* 2010; Pandey *et al.* 2018; Shen *et al.* 2018). Antifriz proteinler sentezleyebilen psikrofilik organizmalar sitoplazmalarını bu proteinler ile doldurur ve sıcaklıkları suyun donma noktasının altında, hatta suyun buz

formunda olduğu durumlarda bile hücre içeriğini ve DNA'larını, soğuğun verebileceği zararlardan, dehidrasyondan, özellikle ozmotik stres ve diğer stres durumlarından korurlar (Fonseca *et al.* 2016).

Psikrofillerin taksonomik genişliği oldukça fazla olabilmektedir. Aşırı soğuklara dayanıklı olabilen *Psychrobacter* sp. ve *Halomonas, Pseudomonas, Hyphomonas, Sphingomonas* ve *Arthrobacter* cinslerinin bazı türleri, psikrofilik bakterilerin bulunduğu taksonomik kollardandır (Siddiqui *et al.* 2013).

Soğuk ortamların mikroorganizmaları genellikle öldürmediği, ancak metabolik aktivitelerini durdurduğu ya da çok düşük seviyelere kadar indirdiği bilinmektedir. Bu bağlamda, psikrofilik mikroorganizmalarda ayrım vardır. Bazı fakültatif bakteri türleri düşük sıcaklıklarda orijinal psikrofilikler kadar olmasa da aktivite gösterebilir ve bu sayede, normal yaşam sıcaklıkları daha yüksek olan organizmaların bazı üyeleri, düşük sıcaklıklarda da yaşayabilir. Bu organizmalar psikrotolerant olarak adlandırılır (tolerant: dayanmak, müsamaha göstermek anlamındadır). Bazı soğuk seven mikroorganizmalar ise, bu sıcaklıkların dışında yaşayamaz ve çoğu zaman ölürler. Bu tip organizmalara ise zorunlu psikrofil denir. Zorunlu psikrofil bakterilerde hücresel ve genetik adaptasyonlar çoğu zaman birkaç derecelik sıcaklık değişimlere karşı ilgisiz kalabilir ve bu bakterilerde sıcaklık dedğişimlerinde bozulabilen, parçalanabilen ve etkisini yitirebilen hücre içi yapılar bulunur. Bu durum ise, bu bakterilerin yaşam sıcaklıklarının çok fazla değişmemesi gerektiğini göstermektir.

1.4.3.a. Zorunlu psikrofil mikroorganizmalar

Genellikle 10-15 ^{0} C kadar sıcaklık değişimlerinden etkilenen, soğuk ortamlar olarak adlandırılıan 7-15 ^{0} C aralığında ve daha düşük sıcaklıklarda yaşamsal faaliyetlerini sürdüren mikroorganizmalardır. Bilinen zorunlu psikrofiller Antarktika'da bulunan buzullardan izole edilmiş bazı türlerdir. Bu bakterilerin optimal yaşam sıcaklığı 7 ^{0} C dolaylarındadır. Bu bakteriler eğer (yaklaşık olarak) 20 ^{0} C sıcaklıklara maruz

bırakılırlarsa yaşamsal aktivitelerini kaybederler (Nozhevnikova *et al.* 2001; Rogers *et al.* 2018).

1.4.3.b. Psikrotolerant mikroorganizmalar

Psikrotolerant bakteriler ana grup olarak psikrofilik bakteriler grubunda sıralanmazlar. Psikrotolerant bakteriler, normal yaşam sıcaklıklarından çok daha düşük sıcaklıklara inildiğinde de yaşamsal faaliyet gösterebilen bakterilere denir ve esasen orijinal psikrofilik bakterilerden daha geniş bir alanda yayılım gösterirler. Bu konu hakkında bilinen en iyi örneklerden birisi *Trichococcus patagoniensis* PmagG1 suşudur. Optimal yaşam sıcaklığı 28-30 ^{0} C olan bu bakteri, -7 , -5 ^{0} C gibi sıcaklıklarda da yaşamsal aktivite gösterebilmektedir. *Trichococcus patagoniensis* PmagG1 suşu Şili'de Guano Penguenlerinden izole edilmiştir (Pikuta *et al.* 2006).

1.5. Bakteri Sistematiği

Sistematik, organizmaların düzgün bir biçimde karakterize edilip sıraya konulduğu bilimsel bir çalışmadır (Madigan and Martinko 2009). Sınıflandırma sistematiğin ilk adımı olup, organizmaların benzerliklerine veya farklılıklarına göre taksonomiksel gruplara ayrılması ve belirli bir düzenin oluşturulmasıdır. İki taksonomik grubun birbirleriyle olan akrabalık ilişkilerini gösteren en iyi yol olan sınıflandırma, sabit bir isim ve güvenli bir tanımlama için ön koşuldur (Trüper and Schleifer 2006).

Taksonominin iki bileşeninin dikkatli olarak ele alınması gerekir. Bunların ilki, türlerin veya ana taksonomik birimlerin tanımlanması veya kimliklendirilmesi ve bu birimlerin sıralanıp kataloglanmasıyla düzenli bir ilerlemenin planlanmasıdır. İkinci olarak isimlendirme taksonomiksel bir astlık ve üstlük düzeninin oluşturulmasında kullanılan bir takım kurallar ve terimlerden oluşur.

Doğru bir şekilde isimlendirme yapılması için International Nomenclature of Bacteria'da yer verilen tanımlanmış isimler ve uluslararası kurallar kullanılmalıdır. 01.06.1980

tarihinde uluslararası literatüre eklenmiş olan bakterilerin tanınması için "Approved lists of bacterial names" (Bakteri isimlerinin onaylı listesi) adlı kaynakta yayımlanma zorunluluğu gelmiştir. Ayrıca günümüzde yeni tür, cins veya daha büyük taksonomik grupların ancak IJSEM'de (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology eski ismi ile International Journal of Systematic Bacteriology - IJSB) yayımlandıktan sonra literatüre kazandırılacağı belirtilmiştir (Goodfellow and Fiedler 2010).

Tanımlama ise, incelenen canlının önceden belirlenmiş bir taksonomik gruba ait olup olmadığının araştırılması işlemidir. Bir organizmanın tanımlanmasında nümerik taksonomik, kemotaksonomik, moleküler sistematik uygulamalarının kullanılmasına polifazik taksonomi adı verilir ve bu uygulama daha kaliteli veri setleri eldesi amacıyla Colwell ile 1970 yılında literatüre kazandırılmıştır (Vandamme *et al.* 1996.)

Evrimsel olarak son derece korunmuş, organizmalar arası çok az değişiklik gösteren 16S rRNA gen bölgesi gibi, makromoleküllerin dizilenmesi, cins dahil olmak üzere, üst taksonomik grupların filogenisinin düzenlenmesinde ve belirlenmesinde çok büyük ve önemli bilgiler sağlamıştır (Rosselló-Mora *et al.* 2001). Tüm bunlarla birlikte tür ve alt tür düzeyinde sınıflandırmalara olanak sağlamış moleküler parmak izi, DNA-DNA homolojisi (benzerlik) ve fenotipik teknikler de filogeni belirlemede büyük katkılar sağlamıştır (Bassam *et al.* 1992; Tindall *et al.* 2010).

Prokaryotik türler için de bir standart oluşturmak adına, 2002 yılında Ad-Hoc komitesinin almış olduğu kararla, prokaryotik tür tanımlamasında %70 ve daha fazla DNA-DNA hibritleşmesi, %97'den daha fazla 16S rRNA gen bölgesi dizisinin özdeşliği ve belirlenmiş ölçüde fenotipik tutarlılıkların temel alınması önerilmiştir. Bunlara ek olarak, yeni tür tanımı yapılan bakterinin en az iki büyük, uluslararası kültür koleksiyonunda depolanması kararı verilmiştir (Coenye *et al.* 2005).

1.5.1. Bakteri sistematiğinde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler

Prokaryot taksonomistleri, son zamanlarda, güvenilir bir sınıflandırmanın sadece çok yönlü sistematik olarak adlandırılan teknikler ile yapılabileceği konusunda hemfikirdirler. Çok yönlü sistematik, prensipte tüm genotipik ve fenotipik özelliklerin birleşmesidir. Hücre yapısındaki nükleik asit makromoleküllerinden genetik bilgi, fiziksel ve biyokimyasal karakterlerden ve genomun ekspresyonuyla elde edilen diğer özelliklerden de fenotipik bilgi elde edilir. Bu yöntemler ile genotipik ve fenotipik özellikler derinlemesine araştırılabilir ve bakteriler farklı sistematik düzeylerde sınıflandırılabilir.

Bakterilerin genotipik karakteristiklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden bazıları aşağıda verilmiştir.

1.5.1.a. 16S rRNA gen lokusu dizileme yöntemi

Bakterilerin filogenetik ilişkilerinin aydınlatılmasında, herhangi ortamlardan izole edilmiş bakterilerin tanımlanmasında kullanılan 16S rRNA gen lokusu dizileme yöntemi, 1980'li yıllarda özellikle de PCR'nin (Polimeraz Zincir Tepkimesi – *ing*: Polymerase Chain Reaction - PCR) icadı ile kullanılan en güçlü yöntemlerden birisi haline gelmiştir (Busse *et al.* 1996).

Bu gen bölgesinin bakteriler için evrensel ve işlevlerinin sabit oluşu, evrimsel olarak korunmuş bölgelerin yanı sıra türe özgü değişen bölgeler de içermesi, tür veya cins seviyesinde açık veritabanları kullanarak bakterilerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

16S rRNA gen dizilemesinin karşılaştırmalı analizleri, 2000'li yılların başlarında PCR kullanımının çok daha fazla yaygın hale gelmesiyle birlikte, modern taksonominin elzem bir tekniği haline gelmiştir. 16S rRNA gen dizisinin kullanımının avantajları olmasına rağmen, yalnızca bu tekniğin uygulandığı filogenetik ağaçların kullanımı bazı sorunları

da beraberinde getirebilir. rRNA dizilerinin karakteristikleriyle temellendiren filogenetik ağaçlarda, benzer dizilerin sıklığı, farklı konumlardaki tekrar bölgelerinin bağımsız olmayışları, uzak akrabalar arasındaki DNA hizalamalarındaki anlamsızlıklar, nesiller arasında tekrarlı bölgelerin oranlarında varyasyonlar sebebiyle, türler normalde olduğundan daha yakın akrabalar olarak görünmelerine sebebiyet verebilmektedir. Bu da düşük filogenetik mutasyon oranının olmasına, birbirleriyle ilişkili veya yakın akraba olan türlerin arasındaki ayırt ediciliğin azalmasına, filogenetik işaretçi sebebiyle 16S rRNA dizilerinin kullanımında azalmaya sebep olabilmektedir. 16S rRNA dizilemesini temel kabul eden filogenetik ağaç, bu genlerin evrimsel olarak geçmişini doğru olarak yansıtsa dahi, türün geçmişini bütünüyle doğru olarak yansıtamayabilir (Coenye *et al.* 2005).

Sonuç olarak, 16S rRNA gen bölgelerinin bakterilerin hemen hepsinde çok sayıda kopyalarının bulunduğu bilinmektedir. Bu sebeple filogenetik ağaçların oluşturulmasında ve düzenlenmesinde, her ne kadar yeni teknikler veya farklı uygulamalar bulunsa da, 16S rRNA gen lokusu dizileme yöntemi, araştırmacılar tarafından sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.

1.5.1.b. Restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Özgün DNA dizilerini tanıyan ve bu dizilerden DNA'nın her iki zincirini birden, bu tanıma bölgelerinin yakın bir yerinden, dizinin başından ve sonundan veya dizinin içerisinden bir yerden kesen enzimlere "restriksiyon enzimleri" veya "restriksiyon endonükleaz" (endonükleaz, baz çıkartan enzimler, bazın fosfodiester bağını kesen enzimler olarak tanımlanır) denilir. Moleküler ve genetik analizlerde sıklıkla tercih edilen RE'ler arasında; *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Not*I, *Sma*I sayılabilir. RE'lerin isimlendirilmesi, Smith ve Nathans tarafından öne sürülmüş, basit bir yönteme göre yapılmaktadır. Buna göre, büyük harfle enzimin izolasyonunun yapıldığı cinsin ilk harfi, daha sonra küçük harflerle türün tanımlayıcı adının ilk iki harfi bazen bunlara ek olarak izole edilen suşu tanımlayan bir harf veya soya ait tanımlayıcı bir harf ile birlikte, enzimin o suştan izole edilen kaçıncı enzim olduğunu gösterecek şekilde roma rakamıyla sayı

verilir. RE isimlendirmesine örnek olarak: *Escherichia coli* RY13 suşundan izole edilen ilk enzim olan; ***E***(*scherichia*)+***co***(*li*)+**R**(Y)+**I** = ***Eco*RI**. RE isimlendirmesi bu şekilde yapılmaktadır. RE'lerin isimleri, bu enzimlerin DNA'yı tanıdığı bölgeye veya DNA'da kesim yaptığı bölgeye dair herhangi bir bilgi vermez (Sambrook *et al.* 2001).

DNA'nın bu RE'lerden birisi veya bazılarıyla kesilmesi ve ardından agaroz jel elektroforezi ile yürütülmesi sonucu etidyum bromür ile boyanmış jeldeki DNA parçalarının yeri ve sayısı kıyaslanır. Bu yöntem ile çıkarılan çeşitliliğe "Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP" adı verilir (Stackebrandt 2006).

RFLP analizi yöntemi ile bakteriyel DNA'ların, fazladan-kromozomal DNA'ların, viral genomların (DNA veya RNA) restriksiyon profilleri oluşturulabilir.

RFLP analizi yöntemi sırasıyla;

i. Toplam DNA izolasyonu
ii. Hedef bölgenin veya tüm genomun Polimeraz Zincir Tepkimesi kullanılarak çoğaltılması
iii. Çoğaltılmış DNA'nın saflaştırılması
iv. RE'ler ile kesim
v. Kesimi yapılan DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi

basamaklarından oluşur (Stackebrandt 2006).

1.5.1.c. Rasgele amplifiye olan polimorfik DNA (RAPD-PCR)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) yöntemi bakteri sistematiğinde yaygın olarak DNA yapılarındaki polimorfizmleri tespit etmek için kullanılan yöntemdir. RAPD, nükleotit dizileri rasgele seçilen, genellikle 8-10 baz uzunlukta tek çeşit primer kullanılarak, nükleotit dizi bilgisini dikkate almaksızın polmorfizmin ortaya çıkartıldığı yöntemdir (Bassam *et al.* 1992). Nükleotit dizilimlerinin canlıdan canlıya değişmesi, bu

yöntemde kullanılan primerin bağlandığı yerin değişmesine ve bu sebeple de PCR ürünlerinin arasında özgün bantlaşmaların olmasına yol açar. Elde edilen ürünler jel elektroforezi ile analiz edilir ve görüntülenir. Görüntüleme sonucu ortaya çıkan bant profilleri benzerlik/farklılık oranlarına göre incelenir ve bu sayede polimorfizm hakkında bilgi edinilir (Temizkan vd 2004).

Diğer metotlara göre, ucuz kolay ve hızlı bir teknik olmasına karşın, RAPD-PCR analizlerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Sonuçların güvenilebilirliğinin belirlenmesi için farklı zamanlarda, aynı laboratuvar şartlarında aynı DNA izolatı ile yapılan denemelerin sonuçlarının da aynı olması gerekmektedir. Ayrıca RAPD-PCR yönteminde kullanılan DNA'nın da oldukça saf olması, DNA veya RNA kirliliği içermemesi gerekmektedir.

1.5.1.d. Genomik parmak izi analizi (GF=Genomic Fingerprint)

Tüm organizmalar genomlarında belirli uzunluklarda tekrar dizileri bulundurmaktadır. Prokaryotlar az kopya sayılı tekrar dizileri bulunmaktadır (tRNA genleri, insersiyon sekansları, rRNA operonları, vb.). Prokaryotlarda bu tekrar dizileri ilk olarak *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de tanımlanmış REP (repetitive extragenetic palindrome) ve PU (palindromic unit) sekanslarıdır (Rademaker and Savelkoul 2004). Bir başka tekrar dizisi ise ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) dizisidir. Bu diziler kromozomlarda kodlaması yapılmayan bölgelere lokalize olmuş şekilde bulunurlar ve bu yerleşim gösterdikleri bölgeler türden türe değişiklik arz eder. ERIC ve REP sekanslarına yönelik primerler kullanılarak bakteriyel genomların parmak izi şekilleri ilk olarak 1991'de belirlenmiştir. BOX ve GTG_5 dizileri de bir diğer tekrar dizileridir. REP, ERIC1, ERIC2, BOX ve GTG_5 –PCR'ların tümü rep-PCR tekniği olarak adlandırılır.

rep-PCR yöntemlerinde bakteri genomlarında çok sayıda kopyalı halde bulunan, doğal olarak mevcut olan, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş, tekrarlayan DNA dizilerinin tamamlayıcısı olan primerler kullanılmaktadır ve bu sayede rep-PCR yöntemi

ile karmaşık ve yüksek oranlı spesifik genomik parmak izleri oluşturulabilir. Suşlar arasında bile tekrar bölgelerinin sayısı ve yerleşim yerlerinin farklılığı, moleküler tiplendirme için gereken tipe özgü bant profilini oluşturur. Bakteri izolatlarından elde edilen rep-PCR sonuçları (genomik parmak izleri) tür, alt-tür ve suş seviyesinde ayrım sağlayabilmektedir. rep-PCR ile tiplendirmenin kolay uygulanır olması, fazla sayıda bakteriyel izolat ile çalışılabilmesinden ve ayrım gücünün yüksek olmasından dolayı, bakteriyel popülasyonlarda filogenetik yapıların ve taksonomik farklılıkların hızlı ve güvenilir bir biçimde belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Rademaker and Savelkoul 2004).

1.5.2. Bakteri sistemetiğinde sıklıkla kullanılan genotipik yöntemler

1.5.2.a. DNA baz kompozisyonunun belirlenmesi (%GC)

Tüm canlıların DNA'ları Adenin, Timin, Guanin ve Sitozin (sırasıyla; A, T, G, C) adı verilen azotlu organik bazlardan oluşan nükleik asitlerden meydana gelmektedir. DNA zincirlerinin aşleşmesinde A-T ile G-C ile eşleşir ve adenin ve timin arasında iki, guanin ve sitozin arasında ise üç hidrojen bağı bulunur. Bu eşleşmelerden dolayı genellikle A/T ve G/C oranları 1'dir. Lakin (G+C)/(A+T) oranları genomdan genoma farklılık gösterir. Bir DNA molekülünde baz oranı G+C baz çiftinin miktarı veya bolluğu olarak tanımlanır ve genellikle GC içeriği veya %GC olarak adlandırılır. DNA'daki GC içeriği yüzdelik olarak: $\frac{G+C}{A+T+G+C} \times 100$ hesaplanır. Bu oran genomdaki genotipik faaliyetler hakkında bilgi vermezken, tür içi veya cins içi yakınlık/akrabalık belirlemede kullanılabilir. Aynı zamanda bu teknik prokaryotik sistematiğinde kullanılan ilk nükleik asit tekniğidir ve ayrıca bu yöntem başlangıçta fenotipik olarak benzer fakat genotipik olarak farklı suşları ayırt etmede faydalı bir yol olarak kanıtlanmıştır. (Rosselló-Mora and Amann 2001; Madigan and Martinko 2009).

Prokaryotlar arasında GC içeriği %19-81 gibi geniş bir aralıkta dağılım gösterebilir (Tamaoka 1994). GC oranı tür için özeldir fakat seçici değildir, yani benzer GC içeriğine sahip iki organizma aynı türe ait olabilir, fakat GC oranları arasındaki farkın %5'ten fazla

olduğu durumlarda “bu iki organizma aynı türden değildir” yorumu yapılır. Kesinleşmiş kuralları olmamakla beraber genellikle %10’dan daha az farklılık gösteren organizmalar aynı cinsin üyesi sayılabilirken, heterojenikliğin fazla olduğu gruplarda bu oran %15-17’ye kadar çıkabilir (Goodfellow and Manfio 1997).

1.5.2.a. DNA-DNA homolojisi (Hibridizasyon)

Tüm bir genomun DNA-DNA benzerliğinin saptanması bugün hala tür tanımlaması için standart bir tekniktir. DNA ve RNA’nın karakteristik bir özelliği de yeniden birleşme veya hibridizasyondur. Denatürasyon işleminden sonra uygun koşullar altında DNA’nın tamamlayıcı zincirleri yeniden birleşir ve doğal çift zincirli yapılarını yeniden biçimlendirebilir. Bu yeniden birleşme olayındaki spesifik eşleşmeler A-T ve G-C arasında olur. Standart koşullarda farklı organizmalardan gelen DNA’lar dizilimlerinin benzerliğine bağlı olarak yeniden birleşir ve böylece “% benzerlik” veya “homoloji” adı verilen ilişki derecesinin nicelendirilmesi olanaklı hale getirilebilir (Stackebrandt and Goebel 1994).

Gerçek dizileme kimlikleri ile hibridizasyon arasında doğrusal bir bağlılaşım ilişkisi yoktur, fakat hibridizasyon tekniği genomlar arasındaki nispi benzerliği verir. DNA homolojisini ölçmek için birkaç yöntem tanımlanmıştır fakat bu yöntemlerin hepsi aynı prensibe dayanır. İki farklı organizmanın çift ipkilli DNA’ları karıştırılır ve denatüre edilir. Kontrollü deneysel koşullar ile DNA’ların yeniden birleşmesine izin verilir. Bu yeniden birleşme esnasında DNA hibrit molekülleri oluşur ve bu iki organizmanın ne kadar çok ortak baz dizilimi varsa o kadar çok hibrit oluşumuyla sonuçlanır. DNA’ların karışımları ve bu organizmalara ait saf DNA’lar (homodublex DNA) ile elde edilen sonuçlar arasında karşılaştırma, bu organizmalar arasındaki genomik benzerliği verir (Rosselló-Mora and Amann 2001).

1.5.3. Bakteri sistematiğinde kulanılan diğer kemotaksonomik yöntemler

Kemotaksonomik tanılama terimi, bakteri hücrelerini farklı taksonomik derecelerde gruplandırmak veya taksonomik derecelerde düzenleme yapmak amacıyla bakteri hücrelerinin kemotaksonomik belirteçlerine ilişkin verileri toplamak amacıyla analitik yöntemlerin kullanılmasını ifade eder. Kemotaksonomi ilkesi, belirteçlerin farklı mikroorganizma grupları arasındaki eşit olmayan dağılımına dayanmaktadır. Bu analitik yöntemlerin tercihi, organizmanın hangi grupta olduğuna bağlı değişiklik göstermektedir. Bu bağlamda yaygın olarak kullanılan yöntemler, diaminopimelik asit izomerlerinin belirlenmesi, şeker ve şeker türevlerinin analizleri, yağ asitleri analizleri, polar lipit analizleri ve proteinlerin profillenmesi olarak sıralanabilir (Vandamme *et al.* 1996; Rosselló-Mora and Amann 2001; Prakash *et al.* 2007).

Diaminopimelik asit (DAP) izomerlerin belirlenmesi: DAP'lar Gram (-) bakterilerin peptidoglikan yapısında bulunan bir şeker türevidir ve N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit şekerleri arasında bağ yapar. DAP izomerlerinin belirlenmesi yöntemi liyofilize hücre örneklerinin HCl ile hidrolizi sonucu oluşan özütlerinin ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Choromatography; TLC) ile ayrımına dayanır (Staneck and Roberts 1974; Seltmann and Holst 2002).

Şeker analizleri: bu yöntem hücrelerin H_2SO_4 ile hidrolizi sonucu elde edilen hücre özütlerinin TLC ile ayrımına dayanır. TLC plakalarında test edilen hidrolizatlar standart şeker örneklerinin TLC sonuçları ile karşılaştırılır. Bu sayede izolatların içerdiği şeker türevleri tiplendirilmiş olur (Staneck and Roberts 1974).

Hücresel yağ asitlerinin analizleri (CFA): Bakteriyel hücrelerin yağ asidi kaynakları hücre zarında fosfolipitler olarak bulunan lipitler veya Gram (-) bakterilerde lipopolisakkaritlerin yapısında bulunan lipit A molekülleri ve Gram (+) bakterilerde bulunan lipoteikoik asitlerdir. Tüm lipitlerin yağ asidi içeriği farklı organizmaların nispeten farklı biyosentetik yolaklarındaki belirli enzimatik tepkimelerle gerçekleşir. Dallanmış zincirli ve siklopropan içeren yağ asitleri sırasıyla Gram (+) ve Gram (-)

bakterileri karakterize etmede kullanılır. Bakteriler dallanmış zincirli, düz zincirli, çoklu veya tekli doymamış zincir gibi kendilerine has, bulundukları ortamlara uyum sağlamak adına, çeşitli yapılarda ve özelliklerde yağ asidi ürettikleri için bu yağ asitlerinin profilleri sistematikte belirli bir öneme sahiptir (Welch 1991).

Yağ asitlerinin metil esterleri (FAME): her mikroorganizmanın kendine özgü FAME profilleri vardır. Gaz kromatografisinin kullanıldığı bu yöntemde, trigliseritlerin ardından bazı lipitler ve yağ asitleri yeteri uçuculuğu sağlamak için esterleştirilir. Gaz kromatografisi ile yapılan tayinler sonucu bir FAME profili oluşturulur. Oluşturulan bu FAME profilleri diğer mikroorganizmaların FAME profilleri ile karşılaştırılır. Mikroorganizmaya özgü oluşan bu FAME profilleri bakteriyel yeni tür tanımlamada kullanıbilir (Duran *et al.* 2006).

Polar lipit analizleri: Bu yöntemde liyofilize örnekler metil hidroksit ve metil klorür kullanılarak hidroliz edilir ve ardından saflaştırılan polar lipit ekstraktları iki boyutlu silika TLC plakalarına yüklenerek lipitlerin ayrımları sağlanır. İki boyutlu silika jeldeki ilk yön kloroform:metanol:su ikinci yön ise kloroform:metanol:asetik asit:su kullanılarak geliştirilir. TLC ile ayrımları yapılan lipitler standart lipitlerle karşılaştırılır (Tindall *et al.* 2007).

Protein profillleme: Bu yöntemde bakteriyel izolatların karışık içeriğinin kütle spektrumu ile ölçülmesi esastır. Kütle spektrumu ile yapılan protein ağırlıklarının ölçümleri ve bu ölçümlerin sonuçları bir mikroorganizma için diğerlerinden farklı ve ayrıt edici bir protein profili oluşturur (Sauer *et al.* 2008). Genetik testlerin yanı sıra, bakteriyel tanılamada kullanılan alternatif yöntemlerden birisidir.

1.6. Enzim

Biyolojik makromoleküler katalizör olarak kısa bir şekilde tanımlanan enzimler, farklı katlanma biçimlerinde ve formlarda olan, her birisi farklı görevler üstlenmiş, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda aktivite gösterebilen, protein birimleri veya "ribozim" olarak

adlandırılan katalitik RNA molekülleridir. Tüm katalizörlerin işlevlerinde görüldüğü gibi, enzimler de aktivasyon enerjisine etki ederek bu gerekli enerjinin düşmesini ve bu sayede tepkime oranının artmasını sağlar (Stryer *et al.* 2002). Enzimlerden bazılarının doğada kendiliğinden milyonlarca yıl sürebilmesi muhtemel bir tepkimeyi milisaniye sürelerine indirebilir. Buna örnek olarak Orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz (Enzyme Commission number, EC: 4.1.1.23) enzimi verilebilir. Evrimsel olarak da incelediğimizde oluşan ilk nükleotitlerin doğada kendiliğinden milyonlarca yıl içerisinde oluştuğu söylenmektedir ve buradan yola çıkılarak bu enzimin milyonlarca yıl sürebilecek bir tepkimeyi çok hızlı bir şekilde meydana getirebildiği muhtemeldir (Radzicka and Wolfenden 1995).

Enzimler, diğer tüm katalizörlerde de görüldüğü gibi, bir tepkimeye dahil olur, aktivasyon enerjisi gereksinimini azaltır, tepkimeye bir bileşen gibi girmez, tepkimelerin sonunda ilk halinin aynısı olarak değişmeden çıkar ve tepkimelerin iki yönlü herhangi dengesine etki etmez. Fakat, enzimlerin diğer tüm kimyasal katalizörlerden ayrıldığı yönü ise, tepkimelere hatta bazen bir molekülün sadece bir adet küçük bir bağına etki edebilecek kadar spesifik olmalarıdır.

Enzimler, bulundukları ortamlar tarafından etkilenmeye açık moleküllerdir. Kimi moleküller enzimlerin aktivitelerine pozitif yönde etki ederler ve enzim işlevini arttırırlar ki bu tip ajanlara aktivatör denilmektedir; diğer bir yandan enzimlerin işlevlerini baskılayan ve enzimal aktiviteye negatif yönlü etki eden ajanlara ise inhibitör adı verilir. Bir örnek olarak, ökaryotlarda glikoliz için çok önemli bir transferaz enzimi olan fosfofruktokinaz-1 (Phosphofructokinase-1, EC: 2.7.1.11) enzimi, yoğun ATP ve ADP varlığında inhibisyona uğrarken, insülin hormon mekanizmasına cevap olarak miktarı artan ortamdaki fruktoz 2,6-bifosfat molekülleri, bu enzimin substratı olan fruktoz 6-bifosfat'a ilgisini arttırarak, enzimi aktive eder, bu sayede enzim regülasyonu sağlanmış olur (Lange 2010; Lenzen 2014).

1.6.1. Mikrobiyal enzimler

Enzimler günlük hayatımızın hemen her yerinde karşımıza çıkmaktadırlar. Klasik fermantasyon dönemlerinden ekmek, peynir ve alkollü içeceklerden modern fermantasyon zamanlarında antibiyotiklerin üretimleri veya teröpatik ajanların biyoteknolojik olarak üretimlerine kadar yayılmıştır. Günümüzde özellikle hazır tüketime uygun hale getirilmiş yiyecek-içeceklerde yahut ev temizliğinde kullanılan malzemelerde dahi enzimler yer alabilir. İnsanoğlunun uğraştığı besin azlığı sorunu gibi bazı sorunlar nticesinde enzimler kendilerine daha geniş bir alan bulmuştur. Bu bağlamda enzimler öncelikle sorunu çözmeye ve sonrasında ise endüstriyel alanların ihtiyaçlarına göre farklı çeşitlikte ve miktarlarda üretilirler. Günümüzde kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mikrobiyal kaynaklı olup gerek enzimlerin doğal üreticileri gerekse rekombinant yöntemlerle enzimlerin ürettirildiği mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Barredo 2005; Koç 2013).

Bugün mikroorganizmalar metabolik ve enzimatik çeşitlilikleriyle önemli bir endüstriyel potansiyel oluştururlar. Önceleri, mikrobiyoloji biliminin kısıtlılığı, mikroorganizmaların çok sınırlı kullanımları ve mikrobiyal çeşitliliğin de az olması nedenleri ile endüstriyel enzimlerin gelişimi çok yavaş ilerlemiştir. Lakin özellikle 2000'li yılların başında gelişen ve halen gelişmeye devam eden gen mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi ile endüstriyel enzimler çok hızlı gelişmiş ve bugün hemen her alanda kulanılmaya başlanmıştır. 1980'lerin başında henüz yeni gelişmeye başlayan enzim teknolojisi 1992 yılında 1.2 milyar dolar pazar payına ulaşmıştır. 1998 yılında açıklanan verilere göre 1.6 milyar dolar pazar payına ulaşan enzim teknolojisi 2000 yılında 2 milyar dolar ve 2017 yılında ise yaklaşık 6.3 milyar dolar gibi nispeten büyük bir pazar payına ulaşmıştır. Öngörülen verilere göre ve günümüz mikrobiyal çalışmalarına bakılarak 2023-2024 döneminde ise bu pazar payının %6,8 oranında artması beklenmektedir (Barredo 2005; Verma 2017).

Endüstriyel alanlarda mikrobiyal enzimler, hayvansal veya bitkisel kökenli enzimlere göre daha az maliyetli ve daha kolay üretilebilir olup günümüzde sıklıkla tercih

edilmektedir. Endüstriyel anlamda üretim değeri adı verilen bu olgu mikrobiyal enzimlerin önemini bir kat daha arttırmaktadır. Lakin endüstriyel enzim teknolojisinde mikroorganizmaların kullanımlarının tek nedeni bu değildir. Mikroorganizmaların enzim teknolojisinde kullanılmasının bazı önemli nedenleri aşağıdadaki gibidir:

i. Yüzey alanı/hacim oranının büyük olması metabolizma ve biyosentezin desteklenmesi için besin alımını kolaylaştırır.
ii. Mikroorganizmalar doğal olarak, hayatta kalmak için çok çeşitli adaptasyonlar geliştirebilen canlılar olup bu adaptasyonları kontrollü bir şekilde geliştirmek yani manipülasyonlar (güdümlü yönlendirme) gerçekleştirmek için çok uygun canlılardır. Ayrıca bu yetenekleri, mikroorganizmaları doğadan direkt olarak laboratuvar ortamına alınmasını kolaylaştırır.
iii. Mikroorganizmalar fermantasyon ortamlarında daha az bileşen ile daha çok ve çeşitli reaksiyonlar gerçekleştirebilir.
iv. Mikroorganizmalar için kullanılan tarama teknikleri kolay uygulanabilir olup kısa zaman dilimlerinde incelenmeleri oldukça basittir.
v. Çok geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarından ötürü aynı tepkimeleri farklı yollarla katalizyebilen farklı organizmalar bulunabilir ve bu da fermantasyon için hali hazırda bir alternatif oluşturur (Barredo 2005).

1.6.2. Endüstriyel bağlamda enzimler

Enzimler, *in vitro* olarak da çalışabilmeleri ve yine aynı katalitik aktiviteleri göstermeleri sayesinde bugün endüstriyel alanlarda da kullanıma uygundur ve bazı endüstriyel uygulamalarda enzimlerin üreticisi olan organizmaları kullanmaktan daha ekonomiktir. Enzimler, onlara uygun ortamlarda arzu edilen bir ürünü sentezlemek veya sentezlenmiş bir ürünün içerisindeki arzu edilen bölgenin çıkarılıp alınmasında küçük bir kilit açıcı rol üstlenmektedir. Enzimlerin bugünkü kullanımları, geleneksel kimya ile başarılamayan zorlu, genellikle kofaktörlere ihtiyaç duyulmayan katalitik işlemlerdedir. Kofaktörlerin kullanılmasını zorunlu kılan bazı reaksiyon çeşitlerinde ise, bu enzimi üreten veya

rekombinant olarak bu enzimlerin ürettirilebildiği organizmalar, bir bütün halde kullanırlar. Geleneksel kimyanın yetersiz olduğu durumlarda enzimler veya enzimin üreticisi konumundaki organizma, bir başvuru konusu haline gelmektedir (Schmid *et al.* 2001).

Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı enzimlerin kullanım alanları Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Sık kullanıma sahip bazı enzimler ve kullanım alanlarını gösterir çizelge.

Enzimin Adı	Enzimin Kullanım Alanları	Açıklama
Amilaz	Detarjan endüstrisi, gıda endüstrisi, biyoremediyasyon	Amilaz enzimi, gıda sanayide özellikle nişasta endüstrisi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Deterjan endüstrisinde, deterjanlar ile birlikte çamaşırlardaki nişasta kaynaklı lekelerin gideriminde kullanım alanı mevcuttur. Bitkisel çevre kirliliğinin gideriminde de kullanılmaktadır.
Asetolaktat Dekarboksilaz	Biyofermantasyon işlemleri bakımından zengin endüstriyel alanlar	Özellikle bira sanayiinde kullanımı yaygındır. Fermantörün verimini azaltan ve fermantör ortamını değişikliğe uğratan bazı maddelerden birisi olan diasetil oluşumunu azalatarak fermantasyon işlemlerinin verimini arttırmada kullanılır.
Glukanaz	İçecek endüstrisi	Özellikle bira endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İçeceklerde polisakkaritlerin ayrıştırılması işlemlerinde kullanılır.
Hemiselülaz	Kağıt endüstrisi	Kağıt hamuru oluşumunda ve kağıt hamurlarının işlenmesinde kullanılır. Yaygın olarak ligninazlar veya peroksidazlar ile birlikte kullanımı mevcuttur.
Ligninaz	Biyoyakıt endüstrisi, kağıt endüstrisi, biyoremediyasyon	Biyoyakıt üretiminde, ham biyokütlenin ön arıtım işlemlerinde ve biyoyakıt üretimi proseslerinin bazı noktalarında kullanılır. Kağıt endüstrisinde lignini kağıt hamurundan eleme işlemlerinde kullanılır.
Lipaz	Gıda endüstrisi, deterjan endüstrisi, biyoremediyasyon	Gıda endüstrisinde, peynir üretimi, süt işleme alanları gibi alanlarda kullanılırlar. Detarjan endüstrisinde, yağlı lekelerin çıkarılması için deterjanlar ile birlikte kullanımı mevcuttur. Tüm bunlara ek olarak, endüstriyel atık yağlardan veya evsel atık yağlardan oluşan çevresel kirliliklerin giderilmesinde de kullanılırlar.
Mannanaz	Deterjan endüstrisi	Sakız lekeleri gibi veya yapışkan maddelerin temizlenmesi amacıyla deterjan endüstrisinde kullanımı mevcuttur.

Çizelge 1.1. (Devam)

Nükleaz	Moleküler biyoloji	Rekombinant DNA teknolojisi ve DNA veya RNA'nın kullanıldığı çok çeşitli moleküler biyoloji araştırma alanlarında kullanımı mevcuttur.
Pektinaz	İçecek endüstrisi	İçeceklerin daha berrak bir hale getirilmesinde kullanılır. Meyve suları için, yaygın olarak selülazlar ile birlikte kullanımı mevcuttur.
Polimeraz (DNA, RNA)	Moleküler biyoloji, adli bilimler	Rekombinant DNA teknolojisi alanında, laboratuvarlar için rutin haline gelmiş sayılan PCR işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.
Proteaz	Gıda endüstrisi, deterjan endüstrisi, biyoremediyasyon, kişisel bakım ve medikal ürünler, moleküler biyoloji	Un gibi, bazı protein içeriğinin yüksek olmasının istenmediği gıdalarda protein miktarının azaltılmasında, süt işlemelerinde ve peynir üretiminde kullanım alanları mevcuttur. Protein içerikli kirlenmelerde deterjanlar ile birlikte kullanılır. Yüksek yoğunlukta organizmasal çevre kirliliğinin oluşumunu azaltmada kullanım alanı mevcuttur. Lenslerdeki gibi enfeksiyonayol açabilecek proteinlerin, lens solüsyonu gibi maddeler ile temizlenmesinde kişisel bakım veya medikal alanlarda kullanılır. Proteinlerin oluşturduğu safsızlıkların giderilmesi gibi bazı alanlarda da moleküler biyolojide kullanılır.
Selülaz	Biyoyakıt endüstrisi, deterjan endüstrisi, içecek endüstrisi, tekstil endüstrisi	Biyoyakıt üretiminde selülozik alkol üretmek için kullanılır. Deterjanlar ile birlikte kullanılarak, çamaşırların daha uzun süre kullanılabilir olmasını ve yıkamaların ardından çamaşırların yumuşak olmasını sağlayarak yumuşatıcı adı verilen kimyasalların kullanımını azaltmak için deterjan endüstrisinde kullanılır. İçecek endüstrisinde pektinazlar ile birlikte içeceklerin daha berrak ve çekici olmasını sağlamakta kullanılır. Teksil endüstrisinde, kumaşların yumuşatılmasında ve yıkamasında kullanımları mevcuttur.

1.6.3. Psikrofilik enzimler ve adaptasyonları

Psikrofilik bakteriler tarafından üretilen ve soğuk ortamlarda yüksek aktivite gösterebilen enzimlere psikrofilik enzim denir. Psikrofilik enzimler soğuk çevresel koşullara uyum sağlar ve yüksek aktiviteli işlemleri soğuk ortamlarda gerçekleştirmeye devam edebilir (Collins and Gerday 2017). Ancak çoğu soğuğa uyum sağlamış enzim, yine orta sıcaklık seviyesi olarak adlandırılan 15-35°C derece aralığında daha yüksek katalitik aktivite gösterebilir (Oswald *et al.* 2014).

Düşük sıcaklıklardaki stres durumları ve sıcaklık değişimleri gibi mevcut zorluklara rağmen, psikrofilik organizmaların genel olarak, hemen tüm yapısal proteinlerin ve enzimlerin özel bölgelerinin veya proteinin tamamının esnekliğini arttırarak düşük sıcaklığın üstesinden geldikleri kabul edilmektedir. Bu esneklik, hidrojen bağlarının, halojen köprülerinin, disülfit bağlarının vb. polipeptitler arası bağlarının zayıflatılması veya bu bağların gücünün ya da etkinliğinin azaltılması ile sağlanır. Bu esneklik kazanımı psikrofilik mikroorganizmalarda, proteinlerin ve özellikle enzimler gibi aktif yapıların istikrarının azalması gibi bir dezavantaj oluşumuna sebebiyet verir (Collins and Margesin 2019). Bu sebeple psikrofilik veya psikrotolerant organizmalarda, soğukla indüklenen transkripyonel ve translasyonel mekanizmaların çok sayıda olduğu ve diğer sıcaklıklarda optimal gelişen organizmalara nazaran bu süreçlerin psikrofiliklerde daha sık olduğu düşünülmektedir.

1.6.4. Endüstriyel açıdan psikrofilik enzimler

Son yıllarda soğuğa adapte olmuş yeni enzimler bulmak veya var olan enzimlerin kullanım alanlarını genişletmek için çok sayıda endüstriyel faaliyette bulunulmuştur. Soğukta çalışabilen enzimler, düşük sıcaklıklardaki işlem kapasitesi ve yüksek aktiviteleri sebebiyle moleküler biyoloji alanlarından deterjan endüstrisine kadar çok çeşitli alanlarda kullanılabilmektedirler. Bu sebepledir ki, bugün psikrofilik enzimler çoğu mezofilik enzimin yerini almaktadır (Feller 2013; Sarmiento *et al.* 2015).

Soğuğa adapte olmuş enzimlerin, en uygun koşullarda çalışabilen mezofilik ve termofilik homologlarıyla karşılaştırıldıklarında çok sayıda yararları sayılabilmektedir. Uygun koşullar altında psikrofilik enzimlerin daha az miktarları, mezofilik ve termofilik homologlarına nazaran aynı iş kapasitesine ve yüksek aktivitelere sahiptir. Bunlara ek olarak, psikrofilik enzimlerin kullanıldığı tepkime sistemleri, sıcaklığın belli bir miktar arttırılmasıyla basitçe kontrol işlemlerine olanak verir. Tüm bu özellikleri ise belirli tepkimelerde para ve zaman kazancı olarak geri dönüş sağlamaktadır. Geniş kullanım alanları ve çeşitli özellikleriyle psikrofilik enzimler, kullanıldığı sistemlerin maliyetini düşürdüğü gözlemlenmiştir ve bu enzimler kullanılarak daha fazla düşük maliyetli sistemler yapılmaktadır. Bu soğukta çalışabilme gibi özel yeteneklerinden ve maliyeti azaltıcı etkilerinden dolayı psikrofilik enzimler bugün enzim-deterjan endüstrisinde en çok dikkat çeken enzim grubudur. A++ ve üzeri enerji tasarruflu çamaşır makinesi teknolojik aygıtları için en gözde enzim sınıfı, düşük sıcaklıklarda lekeler için bir çözüm olarak görülen psikrofilik enzimlerdir (Sarmiento *et al.* 2015).

Bazı yüksek ticari öneme ve paylara sahip, ticari olarak açık pazarda bulunan psikrofilik enzimler ve kullanım alanları Çizelge 1.2'de gösterilmiştir. Çizelgede de görüldüğü üzere A++ ve üzeri enerji tasarrufu alanında psikrofilik enzimler ile alakalı çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

Çizelge 1.2. Ticari olarak kullanımda olan bazı psikrofilik enzimler ve kullanım alanlarını gösterir çizelge.

Enzim Adı	Kullanım Alanı	Açıklama
Alkalin fosfataz	Moleküler biyoloji	Doğrusal hale getirilmiş DNA'nın 5' ucunda defosforilasyon işlemleri için kullanılmaktadır.
Amilaz	Deterjan endüstrisi, tekstil	Nişasta içerikli kirlenmelerin giderilmesinde ve tekstilde dokuma kumaşlarda kullanılan haşıl maddelerin çıkarılmasında kullanılmaktadır.
Katalaz	Kozmetik	Saç ve cilt hastalıklarında, muhtelif olarak kullanımları mevcuttur.
Lipaz	Deterjan endüstrisi	Yağ içerikli kirletici maddelerin temizlenmesinde kullanılmaktadır.
Mannanaz	Deterjan endüstrisi	Sakız gibi yapışkan maddelerin oluşturduğu kirliliğin giderilmesinde kullanılmaktadır.
Nükleaz	Moleküler biyoloji	Tüm çeşit DNA ve RNA'ların sindiriminde tercih edilen bir ajandır.
Pektat lizaz	Deterjan endüstrisi	Pektin lekesi çıkarma işlemlerinde kullanılmaktadır.
Pektinaz	Gıda ve içecek endüstrisi	Bira-şarap fermantasyon işlemlerinde, ekmek yapımı işlemlerinde ve meyve sularının berraklaştırılması gibi içecek işlemlerinde kullanılmaktadır.
Proteaz	Deterjan endüstrisi	Protein içerikli lekelerin temizlenmesi işlemlerinde kullanılmaktadır.
Selülaz	Tekstil, deterjan endüstrisi	Selülozik kumaşların boyanmasında ve işlenmesinde ve pamuklu kumaşların zarar görmeden yıkanması ve yumuşak kalması için yumuşatıcı kimyasal maddelerin kullanımının azaltılması amacıyla kullanılmaktadır.
Urasil-DNA N-glikozilaz	Moleküler biyoloji	Urasil kirliliği olan DNA'lardan serbest urasillerin uzaklaştırılması işlemlerinde kullanılan bir ajandır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Chan *et al.* (1971) yaptıkları çalışmada temofilik, mezofilik ve psikrofilik bakteriler arasındaki yağ asidi farklılığını göstermiş olup termofiliklerin doymuş uzun zincirli, psikrofiliklerin doymamış nispeten kısa zincirli yağ asitleri bulundurduklarını belirtmişlerdir. Yağ asitleri konformasyonlarının canlıların yaşadığı sıcaklıklar ile doğrudan ilişkili olduğunu ve yağ asidi analizlerinin sistematik açısından önemi yine bu çalışmada gösterilmiştir.

Maruyama *et al.* 2000 yılında deniz seviyesinden 5000-6000 metre derinliklerdeki Japonya Çukurları adı verilen bölgelerde optimum %3 tuz oranında gelişen *Psychrobacter pacificensis* bakterisini izole etmişler ve diğer *Psychrobacter* türlerinin izole edildiği ortamları da dikkate alarak kutup buzullarının batması sonucu derin deniz bölgelerine yayılan, güçlü adaptasyon yetenekleri sayesinde birçok ortamda bulunabilecek psikrofilik bakteri türlerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Kämpfer *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada *Psychrobacter faecalis* türünü güvercin dışkısından köken alan biyoaeresolden izole etmişler ve polifazik tanılama yöntemlerinden hücresel yağ asidi analizleri, polar lipit analizleri ve 16S rRNA gen bölgesi analizlerinin *Psychrobacter* cinsinin üyeleri üzerinde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermişlerdir.

Kirk ve Christensen (2002) psikrofilik lipazların çeşitli farmasötik alanlarda organik çözücüler veya organik molekülleri degrede eden kimyasalların yerine; yaşlanma karşıtı kremler, beyazlatıcı ürünler ve güneş kremleri gibi fonksiyonel kozmetikler adı verilen bazı kozmetik ürünlerinde ve gıda alanlarında lezzet arttırımına yönelik çalışmalarda kullanıldığını belirtmişlerdir.

Romanenko *et al.* 2002 yılında *Psychrobacter submarinus* ve *Psychrobacter marincola* iki yeni psikro ve halofilik türü soğuk deniz sularından polifazik karakterizasyon

yöntemleri kullanarak tanımlamışlar ve *Psychrobacter* cinsi için yapılan önceki çalışmalara (Rossau *et al.* 1991) bakarak cins içi heterojenikliğin olmadığı, bu sayede %GC içeriğinin çok değişmediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada hücresel yağ asidi analizlerinin *Psychrobacter* cinsinin üyelerinde başarlı bir şekilde uygulanabileceği gösterilmiş ve yağ asidi yapılarındaki farklılıkların psikrofilik bakteriler için ayırt edici olabileceği belirtilmiştir.

Spring *et al.* 2003 yılında ortaya koydukları çalışmada *Clostridium frigoris*, *Clostridium lacusfryxellense*, *Clostridium bowmanii* ve *Clostridium psychrophilum* türlerini tanımlamışlar ve *Clostridium laramiense*'yi *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* olarak yeniden sınıflandırmasını kullandıkları karbon kaynaklarının ve %GC içeriğinin farklılığını tanımlayarak gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada psikrofilik bakterilerin %GC oranının genellikle düşük olduğu gösterilmiştir.

Tamaki *et al.* (2003) organik polimerleri degrede edebilen (parçalayabilen) ve doğaya daha az zararı olan yapılara dönüştüren psikrofilik *Flavobacterium limicola* türünü literatüre kazandırmışlar ve %GC içeriğinin psikrofilik bakteriler için genel olarak düşük olduğunu desteklemişlerdir.

Reddy *et al.* 2004 yılında yaptıkları çalışmada Antarktika'dan donuk bir yüzeyden toplamda 31 bakteri izole etmişler ve psikrofilik *Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas meridiana* ve *Pseudomonas proteolytica* türlerini literatüre kazandırmışlardır.

Van Trappen *et al.* 2004 yılında sıcaklıkları suyun donma noktasının altında olan Vestfold Dağı, Larsemann Dağı ve McMurdo Kuru Vadisi'ndeki Antarktik sulardan 36 bakteri izole etmiş olup yaptıkları 16S rRNA analizleri ve DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda elde ettikleri veriler doğrultusunda izole ettikleri tüm bakterilerin 3 ana gruba dahil olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile *Flavobacterium degerlachei*, *Flavobacterium frigoris* ve *Flavobacterium micromati* türlerini literatüre kazandırmışlardır.

López-Cortés *et al.* 2005 yılında ham inek sütünden 20-40°C arası gelişim gösterdiğini belirledikleri *Exiguobacterium mexicanum* türünü izole etmişlerdir. Ayrıca bu çalışma ve *Exiguobacterium* cinsine ait diğer çalışmalar da bu bakterilerin proteaz aktivitesine dikkat çekmiş ve biyoteknolojik alanlarda kullanımlarına ışık tutmuştur.

Joseph *et al.* (2006) deniz balıklarından izole ettikleri *Staphylococcus epidermidis* bakterisinden elde edilen ekstra selüler soğuğa adapte olabilen lipazın aktivitesini düşük ve orta sıcaklıklarda göstermiş olup deterjan endüstrisinde kullanımının olabileceğini öne sürmüşlerdir. Fakat literatürde *S. epidermidis* bakterisine ait çok fazla patojen tanımlaması yapıldığını da belirtmiş olup rekombinant DNA teknolojisinde kullanım potansiyeline ışık tutmuşlardır.

Vandieken *et al.* 2006 yılında yaptıkları çalışmada Kuzey Kutup Bölgesi'ndeki sedimentlerden Fe(III) indirgeyen psikrofilik *Desulfuromonas svalbardensis* ve *Desulfuromusa ferrireducens* türlerini tanımlamış, 16s rRNA dizilerinin arasındaki anlamlı farklılıkların önemine işaret etmişler ve yağ asidi analizlerinin aynı cinsin mezofilik ile psikrofilik olan türleri için farklılıklarını göstermişlerdir.

Zhao *et al.* (2006) Kanada'da, optimal büyüme sıcaklığı 10°C olan ve denitrifiye edici (azot salan) bakteri olan *Shewanella halifaxensis*'i izole etmişler ve literatüre kazandırmışlardır.

Cousin *et al.* (2007) Kuzey Almanya'da bulunan bir göldeki buz çatlaklarından gelen soğuk tatlı sudan *Flavobacterium aquidurense* ve *Flavobacterium hercynium* olarak adlandırdıkları iki yeni türü ve bu türlerle beraber 8 farklı suş izole etmişlerdir.

Metpally ve Reddy 2009 yılında yaptıkları çalışma ile psikrofilik bakterilerin mezofilik bakterilerden daha çok protein ürettiklerini ve protein miktarları arasındaki önemli farklılığı göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışma soğuk şok proteinleri, soğukla indüklenen bazı proteinler ve kriyoproteinlerin varlığını göstermiş olup taksonomik çalışmalarda protein profillerinin kullanımı için de bir altyapı oluşturmaktadır.

Margesin ve Feller (2010) yaptıkları çalışmalarla psikrofilik bakterilerin termofilik bakterilerden daha umut verici olduğunu, dünyanın çok sayıda bölgesinin soğuk ortamlar olarak adlandırılıp dolayısıyla daha çok sayıda psikrofilik organizma bulunabileceğini, psikrofilik mikroorganizmalar ile yapılan uygulamaların daha çevreci ve enerji tasarrufuna katkılarının çok daha fazla olacağını açıkça belirtmişlerdir.

Brady *et al.* 2014 yılında yaptıkları çalışmada *Rahnella woolbedingensis, Rahnella victoriana, Rahnella bruchi, Rahnella variigena* ve *Rahnella inusitata* türlerini tanımlamışlar ve bu cinse ait türlerin tatlı sularda bulunduğunu ve soğuk veya sıcak tatlı sularda da bulunabileceğini ifade etmişlerdir.

Fan *et al.* (2015) *Rahnella sp.* R3'e ait bir enzim olan soğuğa adapte olmuş β-Galaktosidaz enzimine ait geni *E. coli* BL21 suşuna aktararak *E. coli* BL21'de soğuğa adapte olmuş ve laktozsuz süt üretiminde kullanılabilecek β-Galaktosidaz üretmişler ve bu sayede soğukta çalışabilen bir enzim olduğu için laktozsuz süt üretiminde maliyetin azaltılabileceği fikrini öne sürmüşlerdir.

Sarmiento *et al.* 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada psikrofilik hidrolazların deterjanların düşük sıcaklıklarda etkisinin arttırılması amacıyla kullanıldığını ve bazı psikrofilik enzimlerin markalar halinde ticari olarak satışta olduğunu belirtmişlerdir.

Venkatachalam *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada Himalaya Dağları'nın yüksek ve alçak bölgelerinden topladıkları 13 örnekten toplamda 406 farklı morfolojik özelliklerde bakteriyi izole etmişlerdir. Bu bakteriyel çeşitliliğin *Arthrobacter, Exiguobacterium, Bacillus, Cedecea, Erwinia* ve *Pseudomonas* cinsleri tarafından baskın olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada soğuğa adapte 6 farklı enzim (selülaz, pektinaz, amilaz, fitaz, proteaz ve lipaz) incelenmiş olup *Exiguobacterium, Erwinia, Mycetecola, Cedecea, Pantoea* ve *Trichococcus* cinslerinin bazı üyelerine ait ekstra selüler hidrolitik enzim aktiviteleri gösterilmiştir. *Exiguobacterium mexicanum, Exiguobacterium sibiricum, Micrococcus antarcticus* ve *Bacillus simplex* türlerinin selülaz hariç 5 farklı

enzim için multi enzim aktivitesini göstermişler ve bu türlerin soğuğa adapte olan enzimlerinin endüstriyel bağlamda oluşturduğu büyük bir potansiyelden bahsetmişlerdir.

Xu *et al.* (2016) kentsel ve endüstriyel atıklar tarafından kirlenmiş sulardan izole edilen *Shewanella putrefaciens*'lerin kanalizasyon kollarında baskın tür olduğunu göstermişlerdir. Metabolik ve proteomik çalışmaları sonucunda tatlı sulardan izole edilen *S. putrefaciens*'lerden farklı olarak, 12 protein ve NMR taramaları sonucunda 27 farklı metabolitin bulunduğunu ve bu bileşenlerin atık su arıtımında veya biyoremediyasyonda kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Barroca *et al.* 2017 yılında yaptıkları çalışmada psikrofilik bakteriler tarafından üretilen bazı enzimlerin ekmek kalitesini arttırmak için kullanılabileceğini belirtmiş olup yine aynı çalışmada psikrofilik bakterilerden izole edilen çeşitli enzimlerin moleküler biyoloji açısından öneme sahip olabileceğini ve homologlarına kıyasla herhangi bir inkübasyona gerek duymadan hücresel proteinleri parçalayabilen proteazlar gibi kullanım alanlarının bulunduğunu açıkça ifade etmişlerdir.

Zieliński *et al.* 2017 yılında psikrofilik bakterilerin düşük seviyede organik madde bulunan ortamlarda biyohidrojen üretiminde kullanılabileceklerini ve peynir altı suyundan bu şekilde biyohidrejen üretilebileceğini göstermişlerdir.

de la Cueva *et al.* 2018 yılında *Pseudorhodobacter* cinsinin üyelerine oldukça yakın akrabalık gösteren psikrofilik bir suş olan N92'yi biyohidrojen üretiminde optimizasyon amaçlı kullanmışlar ve psikrofilik bakteri kullanımının biyohidrojen üretimine olan etkilerini göstermişlerdir.

Kralova *et al.* (2018) yaptıkları çalışmalarda *Flavobacterium chryseum* türünü literatüre kazandırmışlar, rep-PCR yöntemlerinden olan $(GTG)_5$-PCR yönteminin psikrofilik bakteriler ve *Flavobacterium* cinsinin üyeleri için başarılı ve ayrıntılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kullanılan su örnekleri, Erzurum ve Van'a bağlı yerleşim yerlerinde bulunan su kaynaklarından temin edilmiştir.

3.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (Vestel NF520), Buz makinesi (Scotsman AF-20), çoklu blok ısıtıcısı (Lab-Line™), deep-freeze (Glacier), elektroforez (Bio-Rad™ ReadyAgarose®), elekroforez güç kaynağı (1-Bio-Rad™ Power Pac 3000), hassas terazi (Geg, Avery), inkübatör (BINDER™ BD53), inkübatör (BINDER™ KB23 Cooled Incubator), inkübatör (Termo Fisher Scientific™ Heraus Incubator), manyetik karıştırıcı (Stirrer HS31), mikropipet takımı (Eppendorf™), mikroskop (Leica™), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific™), otoklav (Hirayama™ HVE-50), PCR cihazı (ProFlex™ PCR Systems), PCR cihazı (SensoQuest™ Labcycler), pH metre (Metler Toledo), saf su cihazı (Bamstead Pure Easy), santrifüj (Hettich), Spektrofotometre (Beckman Coulter DU‟730 Life science UV/Vis spectrophotometer), Steril kabin (Telstar AV -100), Su banyosu (Grant 6G), Vilber™ Fusion® (Solo S) görüntüleme cihazı, Vorteks (WiseMix) ve 3 ml'lik Kuvarz küvet

3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Kitler

Agaroz (A4718 - Sigma-Aldrich™), Amfisilin (Sigma-Aldrich™), $CaCl_2$ (449709 - Sigma-Aldrich™), DMSO (D8418 - Sigma-Aldrich™), dNTP (Thermo Fisher Scientific™), EtBr (Sigma-Aldrich™), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich™), EtOH ≥%99,8 (Sigma-Aldrich™), Gliserol (Sigma-Aldrich™), HCl (Sigma-Aldrich™), H_2O_2 (Sigma-Aldrich™), hexametil pararosalin metil ($C_{25}H_{30}ClN_3$ – Kristal Viyolet) (Sigma-Aldrich™), izopropil β-D-1-tiyogalaktopironazid (IPTG) (Sigma-Aldrich™), İzopropanol (Sigma-Aldrich™), KOH (Sigma-Aldrich™), Lizozim (Sigma-

Aldrich™), Lügol (Sigma-Aldrich™), $MgCl_2$ (invitrogen™), Promega Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega™), Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™), NaCl (Sodyum klorür) (Sigma-Aldrich™), NaOH (Sigma-Aldrich™), Tris-HCl (Sigma-Aldrich™), Tris Asetat EDTA (TAE) (Sigma-Aldrich™), Taq DNA Polimeraz Kit (Taq DNA Pol.+ Mg + Buffer) (Thermo Fisher Scientific™), X-gal (5-Brom-4-Klor-3-İndolil β-D-Galaktopiranozid) (Sigma-Aldrich™), Tripton Soy Agar (TSA - Merck™ 1.05458), Tripton Soy Broth (TSB - Merck™ 1.05459), Luria Bertani Medium (LB Broth - Sigma-Aldrich™ L3522), Luria Bertani Medium + Agar (LB Agar - Sigma-Aldrich™ L3027)

3.3. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanışı

a. TSA (Tripton Soy Agar): İçeriğinde; 15gr/L tripton, 5gr/L soya pepton, 5gr/L NaCl ve 15gr/L agar bulunan ticari olarak satılan TSA besiyerinden 40gr alınıp üzerine 1 litre saf su eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

b. TSB (Tripton Soy Broth): İçeriğinde; 3gr/L soya pepton, 17gr/L kazein, 2,5gr/L dipotasyum fosfat ve 2,5gr/L glukoz bulunan ticari olarak satılan TSB besiyerinden 30gr alınıp üzerine 1 litre saf su eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

c. LB Agar (Luria Bertani Agar): İçeriğinde 10gr/L tripton, 5gr/L maya ekstraktı, 10gr/L NaCl ve 15gr/L agar bulunan ticari olarak satılan LB Agar besiyerinden 35gr alınıp üzerine 1 litre saf su eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

ç. LB Broth (Luria Bertani Broth): İçeriğinde 10gr/L tripton, 5gr/L maya ekstraktı ve 10gr/L NaCl bulunan ticari olarak satılan LB Agar besiyerinden 20gr alınıp üzerine 1 litre saf su eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

d. Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl Çözeltisi): 1 litre distile suyun üzerine 9 gr NaCl tuzu eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

e. Lügol Çözeltisi: 1 litre suyun üzerine 10 gr iyot ve 20 gr KCl eklendi ve çözelti saklama koşullarına uygun bir şekilde kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

f. KOH (Potasyum hidroksit) Solüsyonu: 1 litre suyun üzerine 30 gr KOH tuzu eklendi ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı.

g. EtOH %70: %70'lik EtOH aşağıdaki formüle göre hazırlandı:

$$Kullanılacak\ stok\ hacmi\ = \frac{Son\ konsantrasyon}{Stok\ konsantrasyonu} \times Son\ hacim$$

ğ. 50mM EDTA Solüsyonu: 100ml distile suyun üzerine 1,46 EDTA eklendi ve son pH: 8'e ayarlandı, kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

h. 1X TAE Solüsyonu: 50X TAE kullanılarak aşağıdaki formüle göre 1X TAE solüsyonları hazırlandı:

$$V_1 = 0{,}02 \times V_2$$

denklemde V_2 değeri istenilen hacimde 1X TAE olup, V_1 ise Sigma-Aldrich™ firmasına ait 50X TAE solüsyonundan alınan hacimi göstermektedir.

ı. 100mM $CaCl_2$ Solüsyonu: $M = \frac{\frac{m}{M_A}}{V}$ formülüne göre hesaplanmış 11,098 gr $CaCl_2$ (M_A: 110,98 gr/mol) hassas terazi yardımıyla tartılıp 1 litre distile suyun üzerine eklendi, 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

i. Amfisilin Süspansiyonu: 20 mg Amfisilin tartıldı ve 20 ml suyun içerisinde çözdürüldü. Daha sonra 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

j. X-gal Solüsyonu: Solüsyonun oranı 40 mg/ml olacak şekilde X-gal hassas terazi yardımıyla tartıldı ve bu orana uygun miktarda distile suyun üzerine eklendi. Ardından çözelti, ışık alması önlenecek şekilde alüminyum folyo ile etrafı kapatılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

k. IPTG Solüsyonu: Son konsantrasyon 23,8 mg/ml olacak şekilde, IPTG hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtre yardımıyla filtre edildi arınık hale getirildi. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

l. Kongo Kırmızısı (Congo-Red) Çözeltisi %1: 1 gram Kongo kırmızısı (molar kütle: 696,665 g/mol) hassas terazi yardımıyla tartıldı ve 100 ml dH_2O içerisinde dikkatli bir şekilde çözdürüldü.

m. Gitschier Solüsyonu (G-Buffer): 8,3 ml 1M $(NH_4)_2SO_4$, 33,5ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 3,35ml 1M MgCl, 0,65ml 1:100'lük dilüsyona yapılmış 0,5M EDTA (pH: 8,8), 1,04ml β-mercaptotanol Fun ticari solüsyonundan alındı ve toplam hacmi 46,84ml olan karışımın üzerine son hacim 100ml olacak şekilde 53,16ml distile su eklendi. Oluşturulan solüsyon 1,5ml'lik Eppendorf tüplerine dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4. Örneklerin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılan su örnekleri Erzurum ve Van çevresinde bulunan su kaynaklarından temin edildi ve aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi.

3.5. Psikrofilik Bakterilerin İzolasyonu

Psikrofil bakteri izolasyonu için toplanan su örnekleri 100 ml olarak ayrıldı ve üzerlerine TSB eklenerek çalkalamalı inkübatörde 4°C'de 3-10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı (Bowman 2001).

Süre sonunda Erlenmeyerler inkübatörden çıkarıldı, 10^{-1} – 10^{-9} arasında değişen seyreltme tüplerine Aneja (2005) tarafından belirtilen yönteme göre inoküle edildi. Daha sonra bu tüplerden 0,1ml alınarak TSA besiyerlerine yayma ekim yapıldı ve inkübatörde 5 güne kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 30-300 arasında koloni veren 10^{-3} – 10^{-9} seri dilüsyonları içeren petrilerden farklı koloni morfolojisine sahip olanlar seçilerek saf kültrüleri elde edildi ve stok kültürleri hazırlandı. Kullanılıncaya kadar -86 °C'de muhafaza edildi.

3.6. Seçilen İzolatların Klasik Tekniklerle Tanısının Yapılması

3.6.1. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin morfolojik özellikleri, boyutlarının birkaç mikrometreyi aşmaması sebebiyle, ancak mikroskop ile yapılabilir. Bu sebeple uygun ortamlarda saf olarak elde edilen bakterilerin, basit boyama yöntemi kullanılarak, hücre morfolojisi belirlendi (Baltacı 2015). Ayrıca binoküler mikroskop kullanılarak bakterilerin koloni morfolojileri belirlendi.

3.6.1.a. Gram özelliklerinin belirlenmesi

Bu yöntem kullanılarak bakterilerin hücre duvar yapıları belirlendi.

Bu amaçla, geliştirilen iki farklı yöntem kullanılmıştır:

Bu yöntemlerden ilki hızlı ve güvenilir olan KOH (potasyum hidroksit) testidir. Bu testte, temiz plaklar üzerine yaklaşık 10-20 µl kadar %3'lük KOH çözeltisi damlatıldı. Katı besiyerinde büyütülmüş olan saf kültürden bir öze dolusu bakteri alınarak çözelti içerisine aktarıldı ve homojen hale gelmesi sağlandı. Daha sonra öze yukarıya ve aşağıya doğru hareket ettirilerek uzama (viskozite) olup olmadığı gözlemlendi. Eğer belirgin bir şekilde

uzama varsa, bakteriyel suş Gram (-), uzama olmaması durumunda ise Gram (+) olarak kabul edildi. (Buck 1982).

Yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem ise, Danimarkalı bakteriyolojist Hans Christian Gram'ın 1884 yılında bulduğu ve geliştirdiği Gram boyama yöntemidir. Gram boyama yöntemi, KOH testinden çok daha yavaştır fakat tüm işlemler eksiksiz ve iyi bir şekilde yapıldığında sonuçları kesindir (Colco 2005). Bu yöntemde, temiz bir lam üzerine bakteri izolatlarından bir miktar alınarak bir smear (ince bir yayma, lekeleme) hazırlandı. Ardından bu smear kristal viyolet ile 1 dakika süre ile boyandı. Süre sonunda hem Gram (-) hem de Gram (+) tüm hücreler hücreleri maviye boyandı. Preparatlardaki fazla boya saf su ile uzaklaştırıldı ve daha sonra bir mordan olan lügol ile preparatlar yeniden 1 dakika süre ile muamele edildi. Daha sonra preparatlar %96'lık EtOH ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Bu yıkamanın ardından kalın bir peptidoglikan tabakaya sahip olan bakteriler, boyayı bırakmadıklarından dolayı mavi-mor boyandı. Alkol ile yıkama işleminin ardından ince peptidoglikana sahip bakteriler, alkol ile temas ettiklerinde dış membran yapıları bozulduğu için boyayı tutamaz ve renksizleşirler. Tüm bu işlemlerin ardından bu boyalara maruz bırakılmış bakteriler safranin ile 20 saniye kadar tekrar boyama işlemine tabi tutuldu. Mavi-mor renkte boyananlar Gram (+), pembe renkte boyananlar ise Gram (-) olarak adlandırıldı. (Beveridge and Davies 1983; Black 1993; Holt *et al.* 1994).

3.6.1.b. Endospor oluşumu testi

İzolatların endospor içerip içermediğini tespit etmek için bakteriler TSA besi ortamına ekildi. Ardından bu bakterilerden bir miktar alınarak lam üzerinde smear (lekeleme) preparat hazırlandı. Bu lam kaynayan su banyosu üzerine yerleştirildi. Preparatların üzeri tamamen Malaşit yeşili ile kaplandı ve üzerlerinin sürekli nemli kalması sağlanarak 7 dakika süre ile boyandı. Süre sonunda fazla boya saf su ile yıkandı ve uzaklaştırıldı. Ardından preparatların üzerine safranin çözeltisi eklendi ve yaklaşık 30 saniye kadar muamele edilmeleri sağlandı. Bu karşıt-boyama işleminin ardından preparatlar saf su ile dikkatlice yıkandı ve fazla safranin uzaklaştırıldı, ardından preparatlar kurutuldu. Tüm bu

işlemlerin ardından preparatlar mikroskopta, immersiyon yağı ile 100'lük objektifte incelendi ve endospor mevcudiyetine bakıldı (Baltacı 2015).

3.6.2. Fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

3.6.2.a. Bakteriyel hareketlilik testi

İzolasyonu yapılmış bakterilerin saf kültürlerinden bir miktar alınarak, içerisinde %0,6 oranında agar (yarı katı) bulunan besi ortamına steril iğne öze yardımıyla aktarıldı ve 3-5 gün süre ile 15°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler gözle incelendi, ekim çizgisi dışına doğru bir gelişimin olup olmadığı incelendi. Olanlar hareket açısından pozitif, olmayanlar ise negatif kabul edildi (Temiz 2000).

3.6.2.b. Tuz konsantrasyonun bakteri büyümesi üzerindeki etkisinin araştırılması

Bakteriyel izolatların gelişim gösterebildikleri veya gösteremedikleri tuz yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla, farklı oranlarda tuz içeren (%2, %4, %6, %8, %10) TSB besiyerleri hazırlandı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı. Hazırlanan bu besiyerlerine izolatlardan 100'er µl alınarak inoküle edildi ve 15°C'de 3-5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler inkübatörden çıkarılarak spektofotometrede (OD_{600}) ölçümler gerçekleştirildi ve bakterilerin gelişim gösterebildikleri tuz yoğunlukları hakkında bilgiler elde edildi (Harley and Prescott 2002).

3.6.2.c. Sıcaklık değişimlerinin bakteri büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması

Bakteriyel izolatların gelişim gösterebildikleri sıcaklık aralığının belirlenmesi amacıyla bakteriler steril TSB besiyerlerine sabit miktarlarda (100µl) inoküle edildi ve +4, +10, +15, +20, +25, +30, +35°C'lerde inkübasyona bırakıldı. 3-5 günlük inkübasyon sürelerinin ardından izolatların minimum, optimum ve maksimum gelişim sıcaklıkları spektrofotometre (OD_{600}) ile belirlendi (Harley and Prescott 2002).

3.6.2.d. pH değişimlerinin bakteri büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması

Bakteriyel izolatların gelişim gösterebildikleri minimum, optimum ve maksimum pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, farklı pH'larda (pH:3, pH:5, pH:7, pH:9, pH:11) TSB hazırlandı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı. Hazırlanan besiyerlerine bakteriler belirli miktarlarda (100µl) inoküle edildi ve +15°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından izolatların gelişimleri spektrofotometrik (OD_{600}) olarak değerlendirildi ve pH değişimlerinin bakteri gelişimi üzerine etkileri ortaya konuldu (Baltacı 2015).

3.6.3. Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

3.6.3.a. Katalaz testi

Katalaz (E.C. 1.11.1.6) "$2\,H_2O_2 \xrightarrow{katalaz} O_2 + 2\,H_2O$" tepkimesini katalizleyen bir oksidoredüktaz enzimidir. Bu test, tepkime sonucu yüzeyde kabarcık oluşup oluşmadığının gözlemlenmesi esasına dayanır. Bu enzim elektron taşınım sisteminde son olarak ortaya çıkan H_2O_2'yi (hidrojen peroksit) parçalar. Oksidatif solunum yapan veya fakültatif bakteriler bu enzime sahiptirler (Nicholls and Schonbaum 1963).

Katalaz varlığının tespiti amacıyla, genç bakteri kültürlerinden bir miktar alınarak, içerisinde %3 H_2O_2 bulunan petri plaklarına aktarıldı ve iyice homojen hale gelmesi sağlandı. Kabarcık oluşumu gözlenenler katalaz (+) pozitif, gözlenmeyenler ise katalaz (-) negatif olarak değerlendirildi.

3.6.3.b. Oksidaz testi

Bu test, üzerinde çalışılan organizmanın Sitokrom c Oksidaz (veya; kompleks IV) (E.C. 1.9.3.1) ihtiva edip etmediğini belirlemek için kullanılan testtir. Kompleks IV aşağıdaki tepkimeyi katalizlemektedir ve elektron taşınım sistemindeki en elzem elektron taşıyıcısı

olan sitokrom c proteinini yükseltgeyerek ve indirgeyerek elektron taşınım sisteminde bir pozitif şarj oluşturur (Cowan and Steel 1993).

$$4\,Fe^{+2}\,Sitokrom\,C + 4\,H^{+} + O_2 \xrightarrow{kompleks\,IV} 4\,Fe^{+3}\,Sitokrom\,C + 2\,H_2O$$

Bu test organizmada sitokrom C oksidaz (kompleks IV) enziminin mevcudiyeti esasına dayanır. Bu enzim varlığında, kullanılan kit ile tepkime verip koyu mavi renk oluşumuna sebep olur. Bu test için %1'lik Tetrametil-*p*-fenilendiamin diklorit (TMPD-Cl^-) hazır kit diskler kullanıldı. Bu diskler deiyonize su kullanılarak ıslatıldı ve eküvyon çubuğuyla genç kolonilerden bir miktar alındı, kitin üzerine bırakıldı. Mavi renk oluşturanlar oksidaz (+) [Sitokrom c Oksidaz içerir] renk oluşumu gözlenmeyenler ise oksidaz (-) olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

3.7. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu

3.7.1. Genomik DNA izolasyonu

TSA besiyerinde büyütülen izolatlardan tek bir koloni alınarak TSB besiyerine aktarıldı ve 3-5 süre ile 15°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda büyüyen bakterilerden Promega™ Wizard® Genomic DNA Purification Kit prosedürüne göre genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Promega™ Wizard® Genomic DNA Purification Kit Yöntemi

- TSB ortamında büyüyen bakterilerden 2 ml kadar alınarak Eppendorf tüplere konuldu.
- 13000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve bakteriler çöktürüldü.
- Çöken bakteri miktarının az olması durumunda ilk iki işlem tekrarlandı.

- Süpernatant dikkatli bir biçimde uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 480 µl 50 mM pH:8 EDTA eklendi ve karışımın pipetaj işlemiyle homojen hale gelmesi sağlandı.
- Ardından Gram (+) bakteriler için bu karışımın üzerine 120 µl 10 mg/ml Lizozim eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Oluşan bu homojenat 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 600 µl Nuklei Lysis Solution eklendi ve hafifçe pipetajlanarak homojen hale gelmesi sağlandı.
- Ardından karışım 80°C'de 5 dakika süreyle bekletildi ve oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Oda sıcaklığına ulaşan karışımın üzerine 3 µl RNase A eklendi ve RNase'ın karışmasını sağlamak için birkaç defa alt-üst edildi ve 37°C'de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından oda sıcaklığına gelmesi sağlanan karışımın üzerine 200 µl Protein Precipitation Solution eklendi ve 20-25 saniye kadar vortexlendi. Vortex işleminin hemen ardından buza alınan Eppendorflar, 5 dakika süre ile buzda bekletildi.
- Soğutma işleminin ardından Eppendorflar 13000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edildi (çökelme işlemi istenilen gibi olmadığı taktirde, çöktürme işlemi 10-15 saniye kadar yeniden yapıldı).
- Çöktürme işleminin ardından süpernatant, içersinde 600 µl 2-Propanol (İzopropanol) bulunan yeni Eppendorflara aktarıldı.
- İzopropanollü Eppendorflar, yoğun pellet oluşumu (gözle görünür DNA) gözlemlenene kadar alt-üst edildi.
- Eppendorflar 13000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Ardından Eppendorflara 600 µl %70 EtOH eklendi ve birkaç defa yavaşça alt-üst edildi.
- EtOH'lu Eppendorflar 13000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant dikkatlice dökülerek EtOH'un tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Son olarak, Eppendorflara, 70-100 µl arası değişen DNA Rehidration Solution eklendi ve 65°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu işlem esnasında DNA'nın solüsyon içinde çözünmesi için tüplere ara ara hafifçe vuruldu.
- Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.7.2. DNA yoğunluğunun belirlenmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA yoğunluğu direkt olarak 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile belirlenirken, ortamdaki safsızlıklar (RNA, protein gibi) 280 nm dalga boyunda elde edilen absrobans verileriyle belirlenir. Bu amaçla, kuvars küvete 998 µl TE çözeltisi konuldu ve 260 nm'de absorbans ölçümü yapıldı, çıkan bu değer "blank" (boş) olarak kaydedildi. Ardından 2 µl DNA ilave edildi, karışım hafifçe pipetajlanarak homojen hale getirildi ve tekrar 260 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Homojenatın absorbans verisinden elde edilen değerden kontrole ait olan çıkarılarak DNA'nın esas absorbans değeri belirlendi. Aynı işlemler 280 nm dalga boyu için de tekrarlandı ve $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ işleminin sonucuna göre 1 ile 1,7 arasında olan DNA örnekleri seçilerek çalışma solüsyonları bu örneklerden hazırlandı (Adıgüzel 2006).

3.7.3. DNA örneğinin ve çalışma solüsyonun derişimlerinin belirlenmesi

µg/ml cinsinden DNA derişiminin belirlenmesi için:

$$Stok\ DNA\ Konsantrasyonu\ \left(\frac{\mu g}{ml}\right) = A_{260} \times SF\ (500) \times 50$$

formülü kullanıldı.

- SF: Seyreltme faktörü
- 50 ise DNA için sabit sayıdır.

DNA çalışma solüsyonunun derişimi için:

$$Derişim = \frac{\dot{I}_K \left(\frac{ng}{\mu l}\right) \times V_i\ (\mu l)}{Stok\ Derişim\ \left(\frac{\mu g}{ml}\right)}$$

formülü kullanıldı ve 100 ng/µl derişimde DNA çalışma solüsyonları hazırlandı. Formülde;

- D: derişim
- $\dot{I}_K$: istenen konsantrasyon
- V_i: istenen hacim

Hazırlanan solüsyonlar kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

3.7.4. rep-PCR yöntemi ile bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Genomik parmak izi analizlerinden birisi olan $(GTG)_5$-PCR işlemi güvenilir sonuç vermesi nedeniyle sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Evrensel olarak korunmuş bu gen bölgelerinin amplifikasyonu için evrensel primerler kullanıldı.

1. Tepkime bileşenlerinin hazırlanması

Polimeraz zincir tepkimesi yapılacak her bir örnek için;

- 12,7 µl ddH_2O
- 5 µl G-Buffer
- 2,5 µl DMSO
- 1,25 µl BSA
- 1,25 µl dNTP
- 4 µl GTG-5 Primer
- 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA Polimeraz
- 3 µl kalıp DNA

kullanılarak 30 µl tepkime karışımı hazırlandı ve takibinde PCR işlemi gerçekleştirildi (Adıgüzel 2006).

2. GTG-5 PCR Programı

Hazırlanan örnekler, PCR cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.1'de verilen döngü sayısınca işleme tabi tutuldu,

Çizelge 3.1. $(GTG)_5$ -PCR programı.

İşlem	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dakika)**	**Döngü Sayısı**
İlk denatürasyon	95	7	1
Denatürasyon	94	1	36
Primer bağlanması	53	1	36
DNA uzaması	65	8	36
Son uzama	65	16	1

3. $(GTG)_5$ Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Bu işlem için öncelikle agaroz jel hazırlandı. 0,8 gr agaroz tartıldı ve içinde 80 ml 1X TAE bulunan Erlenmeyerlere aktarıldı, böylelikle %1'lik agaroz jel çözeltisi elde edildi. Ardından mikrodalga fırında yaklaşık 3 dakikalık süre ile kaynatıldı ve agarozun 1X TAE içinde iyice çözünmesi sağlandı. Ardından karışım oda sıcaklığına alındı ve sıcaklığının bir miktar düşmesi sağlandı. Sıcaklık yaklaşık olarak 45-50°C dolaylarına geldiğinde, içerisine 1 µl EtBr eklendi ve karışım elektroforez jel küvetine döküldü. Ardından elektroforez tarakları yerleştirildi ve jel donmaya bırakıldı.

Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkartıldı ve elektroforez tamponu olan 1X TAE, elektroforez tankına yeterli miktarda eklendi. Jeldeki her ilk kuyuya 10 kilobazlık DNA işaretçisinden [100 - 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 – 1000 – 1200 –

1500 – 2000 – 3000 – 4000 – 5000 – 6000 – 8000 – 10000] (New England Bio Labs, N0550S) 10 µl kadar konuldu. Diğer kuyulara ise yaklaşık 2,5 µl 6X DNA Loading (yükleme) buffer + 5 µl PCR ürünü konuldu.

Örnekler elektroforez tankında, 90 Voltta 90 dakika yürütüldü ve yürütme sonrası jel, görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.7.5. 16S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi

Evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi, yüksek ayrım gücü ve kolay çalışılabilirliği sayesinde bakteri sistematiğinin en önemli noktalarından birisidir. Bu amaç doğrultusunda izole edilen bakterilerdeki bu gen bölgesi evrensel 16S rRNA primerleri kullanılarak *in vitro* koşullarda PCR ile çoğaltıldı.

1. Tepkime bileşenlerinin hazırlanması

Polimeraz zincir tepkimesi yapılacak her bir örnek için;

12,1 µl ddH_2O
3 µl 10X Buffer
0,6 µl dNTP
1,8 µl $MgCl_2$
1,2 µl DMSO
4 µl 27F (evrensel "forward" primer)
4 µl 1492R (evrensel "reverse" primer)
0,3 µl Taq DNA Polimeraz
3 µl kalıp DNA

kullanılarak 30 µl tepkime karışımları hazırlandı ve takibinde PCR işlemi gerçekleştirildi.

2. 16S rRNA PCR Programı

Hazırlanan örnekler, PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıda verilen döngü sayısınca işleme tabi tutuldu,

Çizelge 3.2. 16S rRNA-PCR programı.

İşlem	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dakika)**	**Döngü Sayısı**
İlk denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Primer bağlanması	53	1	36
DNA uzaması	72	2	36
Son uzama	72	5	1

3. 16S rRNA Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik agaroz jel hazırlanarak, içerisinded taraklar bulunan jel küvetine döküldü ve donması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve elektroforez tankına 1X TAE yeterli miktarda eklendi. Jeldeki ilk kuyuya 10 kilobazlık DNA işaretçisi konuldu ve diğer kuyulara ise yaklaşık 2,5 µl 6X DNA Loading (yükleme) + 3,5 µl 16S rRNA PCR ürünü yüklendi.

Örnekler elektroforez tankında, 90 Volt 90 dakika yürütüldü ve yürütme sonrası jeli görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.7.6. Klonlama deneyleri

3.7.6.a. Kompetent hücrelerin hazırlanması

Kompetent hücreler, istenilen gen bölgelerini içeren vektörleri bünyesine alabilecek yapıda olan hücrelerdir. Doğada çok fazla bakteri yatay gen transferi işlemi gerçekleştirir ki bu tip hücrelere doğal kompetent hücreler adı verilir. Doğada kendiliğinden kompetent

olarak bulanan organizmaların büyük bir kısmı insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (Madigan and Martinko 2009).

Klonlama işleminin gerçekleşmesi için, istenen gen bölgesini taşıyan vektörün alıcı hücreye aktarılması lazımdır. Bu amaçla;

1. Stokta hali hazırda bulunan *Escherichia coli* JM101 suşu, LB Agar ortamına çizgi ekim yöntemiyle aktarılarak canlandırıldı.
2. Canlandırılan bu hücrelerden tek bir koloni seçilerek LB Broth ortamına alında ve çalkalamalı inkübatörde 37°C'de bir gece süre ile(over-night) inkübasyona bırakıldı.
3. Büyüyen bakterilerin OD_{600} ölçümleri gerçekleştirildi (saf suya karşı okuma yapıldı).
4. Hazırlanan bu sıvı besiyerinde büyütülen bakterilerden $\frac{OD_i \times V_1}{0,1} = V_2$ formülü kullanılarak istenilen hacimde OD_{600} = 0,1 olan ortam oluşturuldu (V_1: ilk bakteri büyümesinin gerçekleştiği besi ortamından alınacak olan hacim, V_2: istenilen hacim).
5. OD_{600} = 0,1 olarak hazırlanan besi ortamı, çalkalamalı inkübatörde 37°C'de OD_{600} = 0,6 olana kadar inkübe edildi.
6. İstenilen değere ulaştırılan kültürler, yaklaşık 10 ml kadar olacak şekilde steril Falcon tüplere aktarıldı ve 4000 rpm'de çöktürüldü.
7. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve çökmüş olan bakterilerin üzerine, buzdolabında bekletilmiş, 2,5 ml soğuk 100 mM $CaCl_2$ eklenerek, homojenize edildi ve 30-45 dakika kadar buzda bekletildi.
8. Süre sonunda çözelti 4400 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
9. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve çökmüş olan bakterilerin üzerine 500 µl soğuk 100 mM $CaCl_2$ yeniden eklendi.
10. Bakterilerin hafif ve dikkatli bir şekilde $CaCl_2$ ile karışması sağlandı ve oluşturulan karışım 14-16 saat buzdolabında bekletildi.

3.7.6.b. Ligasyon

Ligasyon işlemi istenilen gen bölgesinin PCR ile çoğaltıldıktan sonra uygun bir vektöre (pGEM® T-easy, Promega™) aktarılması işlemidir. Bu amaçla aşağıdaki yönteme ugun olarak ligasyon işlemi gerçekleştirildi:

her bir tüpe;

5 µl 2X Ligasyon Buffer
3 µl PCR ürünü
1 µl 1:1 oranında sulandırılmış (pGEM® T-easy) vektör
1 µl T_4 DNA Ligaz

eklendi ve 16°C'de 14 saat inkübe edildi.

3.7.6.c. Vektörün alıcı hücrelere aktarılması (Transformasyon)

Klonlamada transformasyon işlemi, istenilen gen bölgesini içeren vektörün aktarılması işlemidir.

Bu amaç için;

1. Her bir Eppendorf tüpüne önceden hazırlanmış ve buzdolabında bekletilmiş kompetent hücrelerden 200 µl konuldu.
2. Ardından kompetent hücrelerin üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü eklendi ve bu karışım 30 dakika süre ile buzda bekletildi.
3. Süre sonunda buzdan alınan tüpler dikkatli bir şekilde önceden 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika süre ile bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı.
4. Isı-şok işleminin ardından, her bir tüpe 200 µl steril edilmiş ve oda sıcaklığına (yaklaşık 30°C) ulaştırılmış LB Broth eklendi.
5. Tüpler 37°C'de inkübatörde 90-100 dakika süre ile inkübe edildi.

6. Amfisilin içeren LB agar besiyerinin yüzeyine driglaski özesi ile 40µl X-gal ve 40µl IPTG iyice yayıldı ve kuruması sağlandı. Daha sonra ligasyon ürünü + kompetent hücre içeren karışımdan 150-200µl alınarak X-gal + IPTG içeren Petrilere yayıldı.
7. Petriler 14 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.7.6.d. Koloni seçimi

Transformasyon işleminin ardından 37°C'de 14 saat inkübe edilen hücreler süre sonunda inkübatörden çıkarılarak 1 gece buzdolabında bekletildi. Süre sonunda mavi-beyaz kolonilerden beyaz olanlar (içerisine istenilen geni aldığı düşünülenler) seçildi.

Seçilen beyaz koloniler, içerisinde 3 ml amfilisinli LB Broth ihtiva eden tüplere aktarıldı ve bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.7.6.e. Koloni-Polimeraz Zincir Tepkimesi

Koloni-PCR işlemi; transforme olan genin kontrolünün yapıldığı ve aktarılması istenilen genin mi yoksa bir başka genin mi vektöre yapıştığının kontrolünün yapıldığı bir işlemdir. Bu amaç doğrultusunda aşağıda yazılan yönteme göre transforme olan genin kontrolü yapılır.

Sıvı besi ortamında büyüyen bakterilerden 4 µl alındı ve üzerine 16 µl dH_2O eklendi.

- Karışım 10 dakika süreyle kaynayan su banyosunda bekletildi ve hemen ardından 2 dakika süreyle buza yerleştirildi.
- Isı şokuna uğratılan bakteriler, 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
- Santrifüj işleminden sonra tüplerin süpernatantlarından 3'er µl alınarak içerisinde;
    - 16,1 µl dH_2O
    - 3 µl 10X PCR Buffer

- 0,6 µl dNTP
- 1,8 µl $MgCl_2$
- 1,2 µl DMSO
- 2 µl T7 primer
- 2 µl SP6 primer
- 0,3 µl Taq DNA Polimeraz

bulunan PCR tüplerine eklendi ve PCR cihazına yerleştirildi.

Polimeraz zincir tepkimesi Çizelge 3.3'te verilen PCR programına göre gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. Koloni-PCR programı.

İşlem	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dakika)**	**Döngü Sayısı**
İlk denatürasyon	94	0,5	1
Denatürasyon	94	0,5	36
Primer bağlanması	50	0,5	36
DNA uzaması	72	2	36
Son uzama	72	10	1

3.7.6.f. Koloni-Polimeraz Zincir Tepkimesi sonuçlarının kontrolü

0,8 gram agaroz ve 80 ml 1X TAE kullanılarak %1'lik agaroz jel hazırlandı ve içerisine 1 µl EtBr eklendi. Jel donduktan sonra ilk kuyuya DNA markır, diğer kuyulara ise 2,5 µl 6X DNA loading + 5 µl PCR ürün karışımı yüklendi. Örnekler 90 Voltta 60 dakika süre ile yürütüldü ve jel, görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Yapılan işlemlerin ardından istenilen geni taşıyan koloniler (DNA işaretçisine göre 1500 bç bölgesinde bant veren gözlemlenen koloniler) seçildi ve plazmit izolasyonu için, 4 µl amfisilinli LB Broth içeren besiyerine inoküle edildi.

3.7.6.g. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu, Promega Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega™) kitinin uygulama yönergesine göre gerçekleştirildi.

1. 4 ml amfisilinli LB Broth besiyerinde büyütülen bakteriyel kültür 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
2. Çöktürme işleminin ardından süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
3. Çökmüş hücrelerin üzerine 250 µl Cell Resuspension Solution eklendi ve dikkatli bir şekilde pipetajlandı.
4. Karışımın üzerine 250 µl Cell Lysis Solution eklendi ve birkaç defa alt-üst ettikten sonra, oda sıcaklığında 4 dakika 30 saniye inkübe edildi.
5. Süre sonunda karışımın üzerine 10 µl Alkaline Protease Solution eklendi ve birkaç defa alt-üst ettikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Karışımın üzerine 350 µl Neutralization Solution eklendi ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatanttan alınarak içerisinde spin kolon bulunan yeni Eppendorflara aktarıldı.
8. Spin kolonlu Eppendorflar, 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
9. Ardından kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklendi ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonun üzerine tekrardan 250 µl Wash Solution eklendi ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
12. Spin kolon bir başka steril Eppendorfa aktarıldı ve üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi.
13. Spin kolon 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Kolon dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
15. İçerisinde plazmitler bulunan tüpler ise ölçümleri yapılıp, sekans analizine gönderilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.7.6.h. Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve sekansa gönderilecek plazmit miktarının belirlenmesi

- 2 µl plazmit üzerine 998 µl distile su eklendi ve homojen olarak karışması sağlandı.
- Ardından 260 nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçüldü ve her plazmit için A_{260} değeri olarak kaydedildi.
- $PK = A_{260} \times 50 \times SF$ formülü kullanılarak istenilen plazmitlerin mevcut yoğunlukları hesaplandı (PK: plazmit konsantrasyonu, 50: DNA için sabit değer, SF: seyreltme faktörü).
- İstenilen yoğunluklardaki plazmit çözeltileri, Nuklease-Free Water (nükleazlardan arındırılmış saf su) kullanılarak hazırlandı.
- DNA dizisi analizi işlemleri için uygun konsantrasyonlara sahip plazmit çözeltilerinden 30-50 µl kadar alındı ve Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

3.7.7. DNA dizi analizi (Sekans) sonuçlarının işlenmesi

Macrogen firmasının web adresinden çeşitli formatları da içerisinde barındıran dizi analizi sonuçları indirildi. T7 ve SP6 verileri birleştirilerek dizi anlamlı hale getirildi.

3.7.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Son yapılan işlemlerle anlamlı hale gelen diziler, NCBI'ya ve EzTaxon'a girilerek benzerlik oranları tespit edildi. Gelen veriler doğrultusunda, diziler NCBI'ya sunularak GenBank numaraları alındı.

3.8. İzolasyonu Yapılan Bakterilerin Endüstri Açısından Değerli Bazı Enzimleri Üretebilme Yeteneğinin Araştırılması

3.8.1. Proteaz aktivesinin tayini

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla;

- Nutrient agar (20 gr)
- Skim milk powder (10 gr)
- Agar (15 gr)
- Distile su (1000 ml)

Skim Milk eklenmeden hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı. Daha sonra aseptik koşullar altında 50°C'ye kadar soğutulan besiyerinin her 100 mililitresi için 1 gr skim milk powder eklendi ve yavaşça çalkalanarak besi ortamının homojen hale gelmesi sağlandı. Hazırlanan besiyeri dikkatli bir şekilde petri kaplara döküldü ve donması sağlandı. Hazırlanan petriler kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Hazırlanan bu proteaz besiyerlerine test suşları çizgi ekim yöntemi ile inoküle edildi ve Petriler +15°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından inokülasyon çizgisinin etrafında bir zon oluşup oluşmadığına bakıldı. İnokülasyon çizgisi etrafında zon oluşumuna sebep olan bakteriler proteaz açısından pozitif (+), oluşturmayanlar ise negatif (-) olarak değerlendirildi (Akdaş 2012).

3.8.2. Lipaz aktivitesinin tayini

Lipaz aktivisenin belirlenmesi amacıyla;

- Tribütirat agar (23 gr)
- Gliseril tribütirat (10 ml)
- Distile su (1000 ml)

bir erlende birleştirildi ve 121°C'de 15 dakika süre ile steril edildikten sonra, üzerine gliseril tribütirat eklendi ve homojen hale getirildi. Daha sonra Petrilere dökülerek katılaşması sağladı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan bu lipaz besiyerlerine test izolatları çizgi ekim yöntemi ile aktarıldı ve Petriler +15°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun sonunda petrilerde gelişim gösteren bakteriler lipaz pozitif (+), gelişim gösteremeyenler ise negatif (-) olarak değerlendirildi (Akdaş 2012).

3.8.3. Amilaz aktivitesinin tayini

Amilaz aktivisenin belirlenmesi amacıyla;

- Nutrient agar (20 gr)
- Çözünebilir nişasta (5 gr)
- Agar (15 gr)
- Distile su (1000 ml)

içeren bir besiyeri hazırlandı ve 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi. Ardından hazırlanan besiyeri Petri kaplarına döküldü ve donduktan sonra +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan amilaz besiyerlerine test suşları çizgi ekim yöntemi ile inoküle edildi ve Petriler +15°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından petri kaplarının üzerine lügol solüsyonu damlalar halinde eklendi. Nişasta ile koyu mavi (lacivert) bir renk veren lügol, nişastanın olmadığı plak bölgelerinde açık mavi bir renk verecektir. Bu bilgi ışığında, zon oluşturan petrilerdeki bakteriler amilaz pozitif (+), oluşturmayanlar ise negatif (-) olarak değerlendirildi (Akdaş 2012).

3.8.4. Selülaz aktivitesinin tayini

Selülaz aktivisenin belirlenmesi amacıyla;

- Bushnell Haas (BH) Broth (3,27 gr)
- Karboksimetilselüloz sodyum tuzu (10 gr)
- Agar (15 gr)
- Distile su (1000 ml)

içeren besi ortamı 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi. Ardından hazırlanan besiyeri bir miktar soğuması sağlandı ve besiyeri Petri kaplarına döküldü. Donması sağlanan petriler +4°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

Hazırlanan bu selülaz aktivesi ölçümü besiyerlerine test izolatları çizgi ekim töntemi ile inoküle edildi ve Petriler +15°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda her bir petrinin üzerine %1'lik Kongo kırmızısı (Congo-Red) çözeltisi döküldü ve 20 dakika oda sıcaklığında boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işleminin ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için 1 M NaCl eklendi ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüm bu işlemlerin ardından inokülasyon çizgisinin etrafında plak oluşumuna bakıldı. Normal Kongo kırmızısı renginden daha açık bir halde plak oluşumu gözlemlenen petrilerdeki bakteriler selülaz pozitif (+), gözlemlenmeyenler ise negatif (-) olarak değerlendirildi (Akdaş 2012).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışma kapsamında Erzurum ve çevresinde (Erzurum, Erzurum-Kars il sınır hattı, Van ve Van-Ağrı sınır bölgesi) yer alan su kaynaklarından aseptik koşullar altında alınarak laboratuvar ortamında getirildi.

4.1. Psikrofilik/Psikrotolerant Bakterilerin İzolasyonu

Laboratuvar ortamına getirilen su örnekleri, içerisinde TSB bulunan steril Erlenmeyerlere uygun miktarlarda aktarıldı ve psikrofilik / psikrotolerant mikroorganizmaları elde edebilmek için 4°C'de 3-10 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından seri dilüsyon işlemine tabi tutulan izolatlar, katı besiyeri ortamına aktarıldı ve 4°C'de 3-10 gün inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda petrilerde göz ile tarama yapıldı ve farklı koloni ve hücre morfolojisine sahip olan bakteriler seçilerek 3-4 faz çizgi ekim yöntemi ile yeni besiyerlerine aktarıldı ve izolatlar saf olarak elde edildi.

Sonunda toplanan tüm su örneklerinden toplam 60 adet bakteri izole edildi. Bu bakteriler konvensiyonel, moleküler testlere tabi tutuldu ve 9 farklı bakterinin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.1). Ayrıntılı test çalışmaları bu izolatlar üzerinde gerçekleştirildi.

4.2. İzolatların Geleneksel Yöntemler İle Tanısı

4.2.1. İzolatların morfolojilerinin belirlenmesi

4.2.1.a. İzolatların hücre şekillerinin belirlenmesi

Bakterilerin genel şekillerinin belirlenmesi amacıyla basit boyama teknikleri kullanılarak boyama yapıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Bu incelemenin ardından tüm suşların basil (çubuk) şekilli olduğu belirlendi. Fakat $SM^{01}18^{A}$ suşu için yapılan literatür

taramalarında bu bakteri ailesinin "Club-Rod" şekline sahip olduğu belirlenmiştir. $SM^{01}18^{A}$ bakterisi *Corynebacterium* takımında (order) yer almaktadır ve takımın tüm üyeleri bu şekillerinden dolayı bu adı almaktadır. Logaritmik üreme fazında genellikle basil, durgun fazlarında ise kok şekilli olabilirler.

4.2.1.b. İzolatların Gram özelliklerinin belirlenmesi

Bakterilerin Gram özellikleri iki farklı yöntemle test edildi. Her iki yöntemin de birbirini desteklediği görüldü.

Sonuçta; izolatlardan sadece $SM^{01}17^{A}$ ve $SM^{01}18^{A}$ suşlarının Gram (+) olduğu ve geri kalanların ise Gram (-) olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1).

4.2.1.c. İzolatların endospor özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek adına; her izolat için bir smear hazırlandı, stres koşullarına maruz bırakıldı ve işlemlerin ardından boyama gerçekleştirildi. Boyanan smearlar, mikroskop altında incelendi ve endospor varlığına bakıldı. Test sonucunda izolatlardan hiçbirisinin endospor oluşturmadığı gözlemlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik özelliklerini gösteren çizelge

	Hücre Şekilleri	**KOH testi**	**Gram boyama**	**Endospor**
$SM^{01}1^{A}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}2^{D}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}5^{A}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}8^{A}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}8^{F}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}10^{A}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-
$SM^{01}12^{E}$	Basil	Gram (-)	Gram (-)	-

Çizelge 4.1. (Devam)

$SM^{01}17^{A}$	Basil	Gram (+)	Gram (+)	-
$SM^{01}18^{A}$	Club-Rod	Gram (+)	Gram (+)	-

4.2.2. İzolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

4.2.2.a. İzolatların hareketliliklerinin belirlenmesi

Hareketlilik tayini için bakteriler, hazırlanan yarı-katı besiyerlerine inoküle edildi. İnokülasyon çizgisi boyunca bakterilerde hareket olup olmadığına bakıldı. İnokülasyon çizgisinin dış kısımlarına doğru büyüyen bakteriler için hareketli (motil), büyüme göstermeyenler ise hareketsiz (non-motil) olarak kaydedildi. Bu testin sonucunda $SM^{01}2^{D}$ ve $SM^{01}18^{A}$ suşlarının hareketsiz, diğer suşların ise hareketli olduğu belirlendi.

4.2.2.b. İzolatların gelişim gösterebildikleri sıcaklık değerlerinin araştırılması

İzole edilen suşların gelişim gösterebildikleri optimal sıcaklık koşullarını belirlemek adına, TSB sıvı besi ortamına inoküle edilen organizmalar ayrıca, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C olmak üzere yedi farklı sıcaklıkta büyümeye bırakıldı. Spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda, steril edilmiş TSB sıvı besiyerine karşı ölçümler gerçekleştirildi ve mikroorganizmaların minimum, optimum ve maksimum büyüme sıcaklıkları tespit edildi. Yapılan bu deney sonrasında, kardinal büyüme sıcaklıklarının 4 °C ile 35 °C arasında değiştiği ve tüm izolatlar için optimum gelişim sıcaklığının 15 °C olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.2). 4°C'nin altındaki sıcaklık denemeleri ekipman yetersizliği dolayısıyla gerçekleştirilemedi.

Yapılan bu denemelerde tüm izolatlar için 4°C'de gelişim gözlendi. $SM^{01}1^{A}$ suşunun en uygun sıcaklık aralığı 10-30°C olarak (en geniş aralık) gözlemlenirken $SM^{01}12^{E}$ suşu için bu aralığın 10-15°C (en dar aralık) olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.2. İzolatların sıcaklık değişimlerine göre büyümelerine ilişkin çizelge

	4°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
SM^{01}1^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}2^{D}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}5^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}8^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}8^{F}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}10^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}12^{E}	+	+	+	+	-	-	-	-
SM^{01}17^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-
SM^{01}18^{A}	+	+	+	+	+	z	z	-

(z: zayıf, +: büyüme var, -: büyüme belirtilen süre içerisinde gerçekleşmedi)

4.2.2.c. İzolatların gelişim gösterebildikleri pH aralıklarının araştırılması

İzole edilen suşların gelişim gösterebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi amacıyla pH: 3-11 aralığındaki TSB besi ortamlarında gösterdikleri büyümeler incelendi. İzolatların tümü (zayıf veya normal üreme olarak) pH:5 ile pH:7 aralığında optimal büyüme gösterdi (normal TSB pH: 7,2). pH: 11'de hiçbir izolatta gelişim görülmezken pH: 3'te seyrek de olsa gelişim görüldü.

Çizelge 4.3. İzolatların gelişim gösterebildikleri pH değerlerini gösterir çizelge.

	pH:3	pH:5	pH:7	pH:9	pH:11
SM^{01}1^{A}	-	+	+	-	-
SM^{01}2^{D}	-	z	+	z	-
SM^{01}5^{A}	-	+	+	-	-
SM^{01}8^{A}	z	z	+	+	-
SM^{01}8^{F}	-	+	+	-	-
SM^{01}10^{A}	z	+	+	-	-
SM^{01}12^{E}	-	z	+	+	-

Çizelge 4.3. (Devam)

SM^{01}17^{A}	-	+	+	-	-
SM^{01}18^{A}	z	z	+	-	-

(z: zayıf, +: gelişim var, -: gelişim yok)

4.2.2.d. İzolatların gelişim gösterebildikleri tuz yoğunluklarının araştırılması

İzole edilen suşların gelişebildikleri tuz yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla %2-10 oranlarında tuz içeren besi ortamları hazırlandı. Bu yoğunlukların tümünde gelişim gösteren bakteriler için ayrıca bir test ortamı hazırlandı, bu besi ortamı %15 tuz içeriğine sahip olacak şekilde düzenlendi ve suşların gelişimi izlendi. SM^{01}12^{E} izolatı haricinde diğer tüm izolatların en az %2 tuz yoğunluğunda gelişebildikleri gözlemlendi.

Çizelge 4.4. İzolatların gelişim gösterebildikleri tuz yoğunluklarını gösterir çizelge

	%2	%4	%6	%8	%10	%15
SM^{01}1^{A}	+	+	+	-	-	-
SM^{01}2^{D}	+	+	+	+	+	+
SM^{01}5^{A}	+	+	+	-	-	-
SM^{01}8^{A}	+	+	+	+	+	-
SM^{01}8^{F}	+	+	+	-	-	-
SM^{01}10^{A}	+	+	+	-	-	-
SM^{01}12^{E}	-	-	-	-	-	-
SM^{01}17^{A}	+	+	+	-	-	-
SM^{01}18^{A}	+	+	+	+	+	-

(+: gelişim var, -: gelişim yok)

4.2.3. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

4.2.3.a. Katalaz testi

Yapılan testler sonucunda izolasyonu yapılmış tüm suşların katalaz enzimi açısından pozitif olduğu gözlemlendi.

4.2.3.b. Oksidaz testi

Yapılan testlerin ardından izolatlardan sadece $SM^{01}18^{A}$ oksidaz negatif, diğer izolatların ise pozitif olduğu tespit edildi.

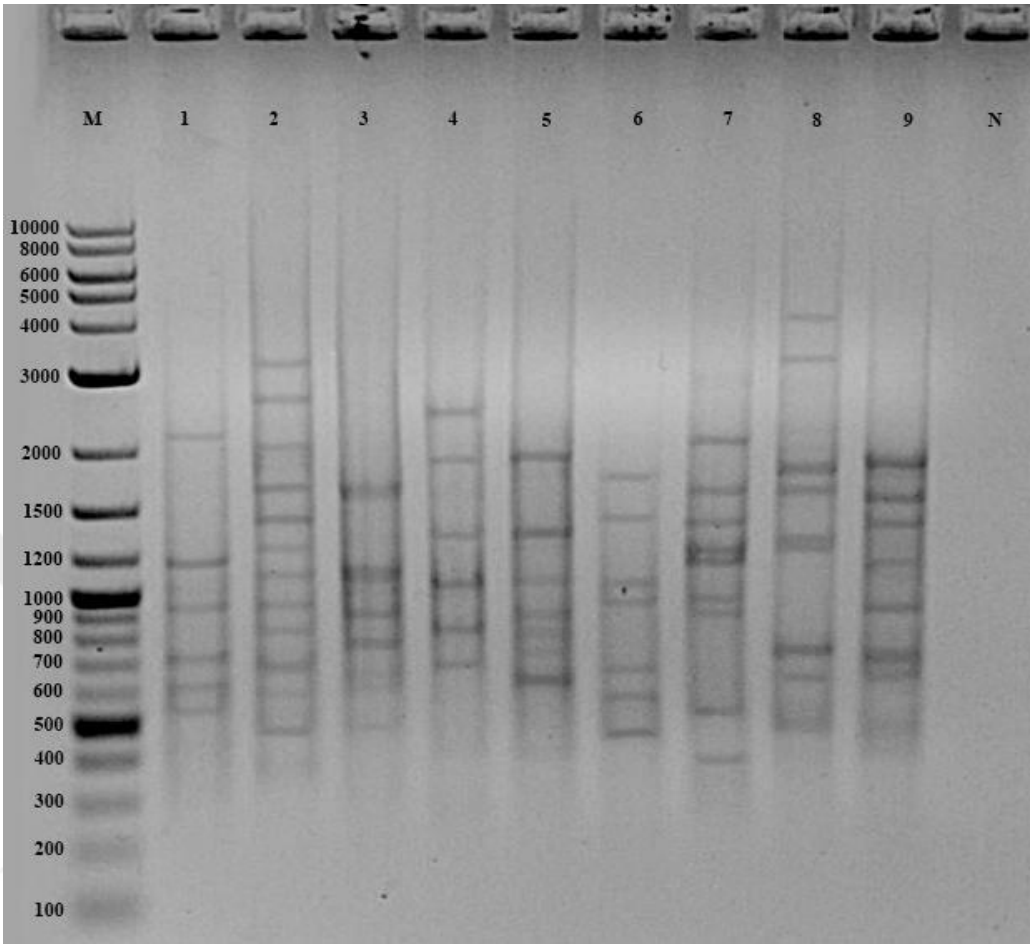
4.3. İzolatların Moleküler Tanılama Yöntemleri İle Karakterize Edilmesi

4.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Su örneklerinden uygun yollarla geliştirilen bakterilerden Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve tüm suşlara ait genomik DNA'lar saf olarak elde edilerek, kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

4.3.2. $(GTG)_5$ -PCR yöntemi ile izolatların gen profillerinin belirlenmesi

Mikroorganizma genomlarında bulunan kısa çok tekrarlı DNA bölgelerini kullanılarak tür, alt tür ve hatta suş seviyesinde güçlü ayrım yapılabilmektedir. Yapılan rep-PCR [$(GTG)_5$-PCR] analizleri sonucunda, çalışılan test suşlarının arasındaki ayrımı bu PCR çeşidinin başarılı bir şekilde ortaya koyduğu, 350-4000 bç arasında değişen 6-12 polimorfik bant verdiği tespit edildi (Şekil 4.1). (Rasschaert *et al.* 2005; Svec *et al.* 2005; Mohapatra *et al.* 2007; Svec *et al.* 2008).



Şekil 4.1. 9 izolata dair $(GTG)_5$-PCR sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M: marker, 1: $SM^{01}1^{A}$, 2: $SM^{01}2^{D}$, 3: $SM^{01}5^{A}$, 4: $SM^{01}8^{A}$, 5: $SM^{01}8^{F}$, 6: $SM^{01}10^{A}$, 7: $SM^{01}12^{E}$, 8: $SM^{01}17^{A}$, 9: $SM^{01}18^{A}$, N: negatif kontrol)

4.3.3. 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir tepkimesi

Sadece prokaryotik domaine ait 16S rRNA ribozomal alt birimin geni olan *16S rRNA* bölgesi, evrensel 16S rRNA primerleri kullanılarak, polimeraz zincir tepkimesi yardımıyla çoğaltıldı. Bu işlemin ardından %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve görüntülendi. Sonuçta tüm izolatların 1500 bç'de tek bir bant verdiği gözlemlendi.

4.3.4. Klonlama deneyleri

4.3.4.a. Koloni PCR

Koloni PCR analizi sonucunda pozitif sonuç veren petrilerdeki beyaz koloniler alınarak plazmit izolasyonuna geçildi.

4.3.4.b. Plazmit izolasyonu

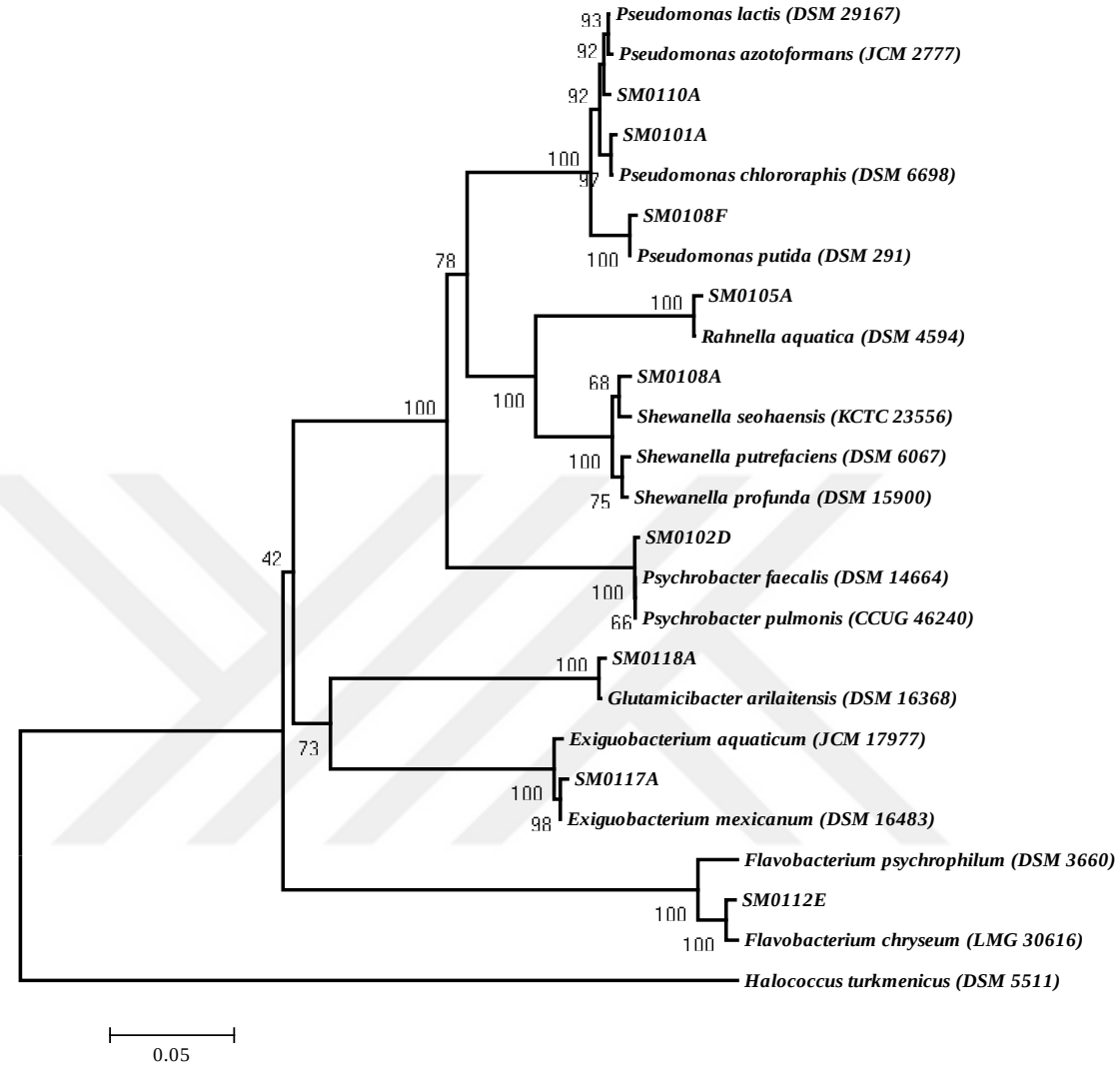
Agaroz jel görüntülenmesinde 1500 bç aralığında bant veren örnekler plazmid izolasyonuna tabi tutuldu. Plazmit izolasyonu yapılan örnekler dizileme işlemleri için Macrogen'e (Hollanda) gönderildi.

4.3.4.c. DNA dizi analizi

Dizi analizi işlemlerinden gelen veriler anlamlı hale getirilerek EZtaxon (EZ bio clouds) ve NCBI BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) verileri ile mukayese edilerek benzerlik oranları belirlendi ve Neighbour-Joining yöntemi (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) ile filogenetik ağaçları çizildi. Ardından elde edilmiş olan veriler GenBank'a girilerek numara (accession number) alındı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. 16s rRNA dizisi benzerlik oranları ve GenBank erişim numaraları.

İzolat kodu	İzolatın benzerlik gösterdiği tür	Benzerlik oranı (%)	GenBank erişim numarası
SM^{01}1^{A}	*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*	99,93	MN192404
SM^{01}2^{D}	*Psychrobacter faecalis*	99,42	MN192405
SM^{01}5^{A}	*Rahnella aquatilis*	99,21	MN192429
SM^{01}8^{A}	*Shewanella putrefaciens*	99,86	MN192428
SM^{01}10^{A}	*Pseudomonas lactis*	99,28	MN192431
SM^{01}12^{E}	*Flavobacterium chryseum*	98,33	MN192434
SM^{01}17^{A}	*Exiguobacterium mexicanum*	99,86	MN192433
SM^{01}18^{A}	*Glutamicibacter arilaitensis*	98,96	MN192913



Şekil 4.2. Test izolatları ve tip türlerine ait Neighbour-Joining (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı (*Halococcus turkmenicus* dış grup olarak eklenmiştir).

4.4. İzolatların Endüstri Açısından Değerli Enzimleri Üretebilme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bu amaç doğrultusunda, proteaz aktivitesini ölçmek için skim milk powder, lipaz aktivitesini ölçmek için (gliserin) tribütirat, amilaz aktivitesini ölçmek için çözünebilir nişasta (soluble starch), selülaz aktivitesini ölçmek için karboksimetilselüloz-sodyum tuzu (CMC-Na) içeren katı besi ortamları hazırlandı. Bakteriler tek bir çizgi halinde katı besiyerlere ekildi ve petriler gelişim için inkübasyona bırakıldı.

4.4.1. Proteaz aktivitesinin tayini

İnkübasyon süresinin ardından, petriler gözle kontrol edildi ve ekim çizgisi etrafında bir zon oluşup oluşmadığına bakıldı (Çizelge 4.6).

4.4.2. Lipaz aktivitesinin tayini

İnkübasyon süresinin ardından petriler gözle kontrol edildi ve ekim çizgisi etrafında bir zon oluşup oluşmadığına bakıldı. İncelemelerin ardından izolatların lipaz aktivitesi değerlendirildi (Çizelge 4.6).

4.4.3. Amilaz aktivitesinin tayini

İnkübasyon süresinin ardınan petrilerin üzerine damla damla lügol eklendi. Boyama işleminin ardından fazla lügol dikkatlice uzaklaştırıldı. Ekim çizgisinin etrafında açık mavi şekilde oluşacak bir zon oluşumu amilaz enzimi açısından pozitif, oluşmama durumu ise negatif olarak değerlendirildi (Çizelge 4.6).

4.4.4. Selülaz aktivitesinin tayini

İnkübasyon sürecinin sonunda petrilerin üzerine, damla damla %1 Congo Kırmızısı dikkatli bir şekilde eklendi ve yaklaşık 15-20 dakika süre ile boyama işlemine tabi tutuldu. Boyama işleminin ardından tüm petriler 1M NaCl ile dikkatli bir şeklide yıkandı ve yıkama işleminin ardından 30 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi. Tüm bu işlemlerin ardından ekim çizgisinin etrafında açık kırmızı (ya da normal boyanma renginden daha açık bir renk) ile kendini gösteren bir zon oluşumu varsa, izolatlar selülaz enzimi açısından pozitif, zon oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada izole edilen tüm psikrofilik veya psikrotolerant bakterilerin, selülaz enzimi açısından negatif sonuç verdiği görüldü.

Çizelge 4.6. İzolatların enzim aktivitesi sonuçlarını gösteren çizelge.

İzolatlar	Proteaz Aktivitesi	Lipaz Aktiviteesi	Amilaz Aktivitesi
$SM^{01}1^{A}$	++	++	++
$SM^{01}2^{D}$	-	+	+
$SM^{01}5^{A}$	+	+	++
$SM^{01}8^{A}$	+	+	++
$SM^{01}8^{F}$	-	+	+
$SM^{01}10^{A}$	++	++	+
$SM^{01}12^{E}$	+	-	++
$SM^{01}17^{A}$	+	+	+
$SM^{01}18^{A}$	+	++	+

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

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Psikrofilik mikroorganizmalar çok çeşitli metabolizmalarla soğuğa adapte olmuş mikroorganizmalardır. Dünya üzerinde karasal alanların 4'te 1'i ve geri kalan akuatik alanların çoğunun soğuk ortamlar oluşu psikrofilik mikroorganizmaların gelişebileceği geniş yaşam alanları oluşturmaktadır (Gerday *et al.* 2000; Siddiqui and Cavicchioli 2006).

Soğuğa uyum sağlamış enzimlerin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanımı son yıllardaki yaygın çalışma konularından birisi haline gelmiştir. Soğuğa uyum sağlamış enzimler, homologlarına nazaran, geniş bir sıcaklık aralığında ve nispeten geniş pH aralıklarında daha iyi aktivite gösterebilmektedirler. Soğuğa uyum sağlamış enzimlerin bu özellikleri de küresel ısınmanın bir diğer nedeni olan enerji tüketimine ve çevre kirliliği oluşumuna sebebiyet veren kirleticilere karşın enzimlerin kullanılabilirliğini olumlu bir şekilde etkilemiştir. Günümüzde en çok A+++ sınıfı enerji tüketimi konusunda ilgi odağı olan psikrofilik enzimler, moleküler biyolojiden insan sağlığı uygulamalarına kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bu özellikleri ile psikrofilik enzimler, mezofilik ve termofilik homologlarının kullanıldığı çoğu alanda akrabalarının yerini almaya başlamış ve kullanımlarının daha basit yöntemlerle kontrolü sayesinde çoğu gıda ve deterjan endüstrisinde kendine geniş bir alan bulmayı başarmıştır (Maiangwa 2014; Sarmiento *et al.* 2015; Collins and Margesin 2019).

Bu bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışmasında Erzurum ve Van çevresinde bulunan su kaynaklarından toplamda 60 adet bakteri izole edildi. Yapılan tanı testleri sonucunda (geleneksel ve moleküler tanı testleri) 9 farklı türün varlığı tespit edildi.

$SM^{01}18^{A}$ kodlu (*Glutamicibacter arilaitensis*) izolatın club (basil benzeri) şekilde olduğu, yapılan literatür taramaları sonrası (Irlinger *et al.* 2005) saptandı ve literatür verilerine göre (Busse 2016) bu bakterinin logaritmik fazda basil, durgun fazda kok şekilli olduğu saptanmıştır. Diğer izolatların ise basil şekilde olduğu belirlendi.

$SM^{01}17^{A}$ (*Exiguobacterium mexicanum*) ve $SM^{01}18^{A}$ (*Glutamicibacter arilaitensis*) kodlu izolatların literatür verileri ile (Irlinger *et al.* 2005; López-Cortés *et al.* 2006) paralel olarak Gram (+) olduğu tespit edildi.

$SM^{01}18^{A}$ (*Glutamicibacter arilaitensis*) ve Gram (-) olduğu belirlenen $SM^{01}2^{D}$ (*Psychrobacter faecalis*) izolatlarının non-motil (hareketsiz), $SM^{01}12^{E}$ (*Flavobacterium chryseum*) kodlu izolatın da akışkan hareketli (gliding motility) olduğu belirlenmiş olup literatür verileriyle (Kämpfer *et al.* 2002; Irlinger *et al.* 2005; Kralova *et al*. 2018) paralellik sağladığı gözlemlenmiştir.

$SM^{01}1^{A}$ (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), $SM^{01}2^{D}$ (*Psychrobacter faecalis*), $SM^{01}5^{A}$ (*Rahnella aquatilis*), $SM^{01}12^{E}$ (*Flavobacterium chryseum*) ve $SM^{01}18^{A}$ (*Glutamicibacter arilaitensis*) kodlu zolatların güçlü katalaz aktivitesi tespit edildi, aynı zamanda tüm izolatların katalaz pozitif olduğu belirlendi ve elde edilen verilerin literatür ile (Kluyver 1956; Izard *et al.* 1979; Kämpfer *et al.* 2002; Irlinger *et al.* 2005; Kralova *et al*. 2018) paralel olduğu gözlemlendi. Yalnızca $SM^{01}18^{A}$ kodlu izolatın literatür ile paralel olarak (Irlinger *et al.* 2005; Feng *et al*. 2017) oksidaz negatif, geri kalan 8 izolatın ise oksidaz pozitif olduğu saptandı.

İzolatlar üzerinde 4-35°C aralığında yapılan sıcaklık denemeleri sonuçları değerlendirildiğinde, $SM^{01}2^{D}$ kodlu izolat için elde edilen verilerin Kämpfer *et al.* (2002) verileri ile uyuşmadığı, $SM^{01}2^{D}$ kodlu izolatın 30°C ve üzeri sıcaklıklarda bakteriyel gelişiminin ciddi bir oranda azalma yaşadığı ve 35°C'de 5. günde gelişim olmadığı tespit edildi. $SM^{01}12^{E}$ kodlu izolatın sıvı besi ortamında optimum 15°C'de, katı besi ortamında ise optimum 8°C'de gelişim gösterdiği, 15°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda 5. günde gelişim gözlemlenmediği tespit edildi. Kralova *et al*. (2018) verilerine göre TSA besiyerinde 20°C'de gelişim gösterdiği bildirilen *Flavobacterium chryseum*'un literatür verileri ile uyuşmazlık gösterdiği tespit edildi. $SM^{01}1^{A}$ (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), $SM^{01}8^{F}$ (*Pseudomonas putida*) ve $SM^{01}10^{A}$ (*Pseudomonas lactis*) kodlu izolatların ise 4-30°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildiği gözlemlendi ve

sonuçların literatür verileri ile (Kluyver 1956; Anzai *et al.* 2000; von Neubeck *et al.* 2017) paralellik gösterdiği tespit edildi.

İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının saptanması amacıyla gerçekleştirilen testlerin sonuçlarına göre tüm izolatların optimal gelişim gösterebildikleri pH aralığı 5-7 olarak tespit edildi. Bunlara ek olarak $SM^{01}8^{A}$ ve $SM^{01}10^{A}$ izolatlarına dair, literatüre (Ziemke *et al.* 1998; von Neubeck *et al.* 2017) ek olarak pH 3-5 aralığında gelişimleri bu çalışmada gösterilmiştir. $SM^{01}18^{A}$ kodlu izolattan elde edilen veriler doğrultusunda literatür ile (Feng *et al*. 2017) uyuşmazlık olduğu saptandı. Feng *et al*. (2017) çalışmalarında *Glutamicibacter arilaitensis*'in pH: 5-10 aralığında gelişimini bildirirken, $SM^{01}18^{A}$ kodlu izolatın maksimum pH:7'de gelişim gösterdiği tespit edildi. Özellikle $SM^{01}10^{A}$ kodlu izolatın multi enzim aktivitesi göz önünde bulundurulduğunda, hem düşük sıcaklık hem de nispeten düşük pH ortamlarda gelişebilmesinin biyoteknolojik açıdan değerli bir bulgu olabileceği düşünülmektedir.

%2-%15 yoğunlukta tuz içeren TSB besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilen testlerde $SM^{01}2^{D}$ kodlu izolatın %15, $SM^{01}8^{A}$ ve $SM^{01}18^{A}$ kodlu izolatların ise %10 tuz yoğunluğunda gelişim gösterebildiği tespit edilirken $SM^{01}12^{E}$ kodlu izolatın ise %2 tuz yoğunluğunda gelişim gösteremediği tespit edilmiştir. $SM^{01}2^{D}$ ve $SM^{01}18^{A}$ kodlu izolatlar için elde edilen sonuçların literatür ile (Kämpfer *et al.* 2002; Irlinger *et al.* 2005; Feng *et al*. 2017; Kralova *et al*. 2018) tam bir paralellik sağlanırken $SM^{01}8^{A}$ kodlu izolat için elde edilen veriler literatür ile uyuşmamaktadır. Khashe and Janda (1998) ve Holt *et al*. (2005) yaptıkları çalışmalarda *Shewanella putrefaciens*'in %6-6,5 ve üzeri yoğunluklarda gelişim göstermediğini bildirirken, %99,86 oranında *Shewanella putrefaciens*'e benzerlik gösteren $SM^{01}8^{A}$ kodlu izolatın %10 tuz konsantrasyonunda gelişim gösterdiği tespit edildi.

Günümüzde bakterilerin taksonomik olarak tanımlanmasında polifazik metotların kullanımı kabul görmüştür. İdentifikasyonun tek başına klasik mikrobiyal testler veya genomik testler ile yapılamayacağı birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, yapılan geniş literatür taramaları sonrasında, daha belirgin bir ayrım

gösterdiği belirlenen rep-PCR yöntemi $(GTG)_5$-PCR yöntemi kullanıldı (Svec *et al.* 2005; Svec *et al.* 2008; Kralova *et al*. 2018) ve izolatların tür, alt tür ve suş seviyesine kadar olan olan farklılıkları tespit edildi. Bu işlemin sonucuna göre toplamda izole edilen 60 adet bakteriden 9 tanesinin diğer izolatlardan farklı olduğu tespit edildi. Farklı olan bakteriler belirlendikten sonra 16S rRNA sekans işlemi gerçekleştirildi. 16S rRNA dizileme ve biyoinformatik çalışmaları sonrasında bakterilerin; $SM^{01}1^{A}$: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*'e %99,93; $SM^{01}2^{D}$: *Psychrobacter faecalis*'e %99,42; $SM^{01}5^{A}$: *Rahnella aquatilis*'e %99,21; $SM^{01}8^{A}$: *Shewanella putrefaciens*'e %99,86; $SM^{01}8^{F}$: *Pseudomonas putida*'ya %99,93; $SM^{01}10^{A}$: *Pseudomonas lactis*'e %99,28; $SM^{01}12^{E}$: *Flavobacterium chryseum*'a %98,33; $SM^{01}17^{A}$: *Exiguobacterium mexicanum*'a %99,86; $SM^{01}18^{A}$: *Glutamicibacter arilaitensis*'e %98,69 oranlarında benzer olduğu tespit edildi. 16S rRNA analizlerinin benzerlik oranının %97'den fazla olması, izolatın bakteriyel alt tür veya suş olduğunu gösterdiğinden (Madigan *et al.* 2015) izolasyonu yapılan tüm mikroorganizmaların, benzerlik gösterdikleri bakterilerin birer suşları olduğu düşünülmektedir.

BacDive ve DSMZ web adreslerinden ulaşılan Alman Sınıflandırması (German Classification) Biyo-Güvenlik seviyeleri (biosafety level), $SM^{01}1^{A}$: bs-1, $SM^{01}2^{D}$: bs-2, $SM^{01}5^{A}$: bs-1, $SM^{01}8^{A}$: bs-2, $SM^{01}8^{F}$: bs-2, $SM^{01}10^{A}$: bs-1, $SM^{01}17^{A}$: bs-1, $SM^{01}18^{A}$: bs-1 olarak belirlenmiş, lakin $SM^{01}12^{E}$ kodlu izolata ait herhangi bir biyogüvenlik bilgisine rastlanılmamış olup diğer yakın akraba olan *Flavobacterium* cinsinin üyeleri göz önünde bulundurularak, $SM^{01}12^{E}$ kodlu izolatın da biyogüvenlik seviyesi 1 sınıfında yer aldığı düşünülmektedir.

Psikrofilik enzimler, homologlarına kıyasla biyoteknolojik proseslere daha iyi uyum sağlayabildiğinden, kullanımlarının daha basit oluşundan ve maliyet azaltıcı ektilerinden ötürü bugün birçok endüstriyel proseste tercih sebebi olmuştur. Bu bağlamda, çalışmamızda izolasyonu yapılan bakterilerin enzim üretebilme potansiyelleri değerlendirildi.

Yapılan bu araştırmalar sonucunda, $SM^{01}1^{A}$ (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) ve $SM^{01}10^{A}$ (*Pseudomonas lactis*) kodlu izolatların diğer izolatlara nazaran daha fazla proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. $SM^{01}10^{A}$ kodlu izolata ait literatür verileri (von Neubeck *et al.* 2017) ile tam bir paralellik gösterdiği belirlendi. $SM^{01}1^{A}$ ve $SM^{01}2^{D}$ (proteaz negatif) kodlu izolatlara dair proteaz enzimi açısından herhangi bir bilgiye rastlanılmazken, süt ürünleri üretiminde kullanımı olan *Rahnella aquatilis* ($SM^{01}5^{A}$) ve atık arıtımında kullanılabilecek potansiyelde olan *Shewanella putrefaciens* ($SM^{01}8^{A}$)'in biyoteknolojik önemi bir kez daha vurgulanmaktadır.

Diğer yandan izolatların gösterdiği lipaz aktiviteleri yönünden, literatürde $SM^{01}1^{A}$, $SM^{01}2^{D}$ izolatları için bir bilgiye rastlanılmadı. Aynı şekilde $SM^{01}5^{A}$ kodlu izolatın lipaz aktivitesinin literatürde belirsiz kalmış olduğu tespit edildi. Psikrofilik lipazlar, düşük sıcaklıklara sahip sularda yağları degrede edebilme yeteneklerinden dolayı deterjan sanayide oldukça önemlidirler. Lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenen $SM^{01}10^{A}$ kodlu izolat için yapılan taramalarda literatür ile (von Neubeck *et al.* 2017) paralellik olduğu belirlendi, ancak diğer bir yandan güçlü amilaz aktivitesi gösteren $SM^{01}10^{A}$ izolatı için literatür ile (von Neubeck *et al.* 2017) zıtlık olduğu belirlendi. $SM^{01}1^{A}$ ve $SM^{01}2^{D}$ izolatları için de amilaz aktivitesi açısından bir bilgiye rastlanılmazken yine $SM^{01}5^{A}$ kodlu izolatın amilaz aktivitesi açısından belirsiz olduğu tespit edildi.

Tüm bunlara ilaveten, yapılan selülaz aktivitesi tayini sonuçlarına göre tüm izolatlar selülaz negatif olarak belirlendi. $SM^{01}1^{A}$, $SM^{01}2^{D}$ izolatları için literatürde bu konuda bir veri elde edilemezken, $SM^{01}5^{A}$, $SM^{01}8^{A}$ izolatları için selülaz aktivitesinin literatürde belirsiz kaldığı tespit edilmiştir. Diğer izolatlar için selülaz aktivitesi bakımından literatür ile (Anzai *et al.* 2000; López-Cortés *et al.* 2006; Feng *et al.* 2017; von Neubeck *et al.* 2017; Kralova *et al.* 2018) paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Sıcaklık ve pH aralıkları göz önünde bulundurulduğunda geniş sıcaklık aralığı, nispeten yüksek pH ortamlarında gelişim gösterebildiği ve multi enzim aktivitesi belirlenen $SM^{01}8^{A}$ kodlu izolatın özellikle deterjan sanayisinde biyoteknolojik uygulamalar için bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Aynı şekilde, geniş sıcaklık aralığına sahip ve diğer

izolatlardan daha güçlü multi enzim aktivitesi gösterdiği belirlenen $SM^{01}10^{A}$ kodlu izolat ise yüksek pH ortamlarında yaşayamadığından deterjan endüstrisi dışında kalan alanlarda bir potansiyel oluşturabileceği söylenebilir.

Tüm bu sonuçlar dikkate alınarak, bu izolatların biyoteknolojik uygulanabilirliğinin ve bu izolatların enzimlerinin endüstriyel alanlarda kullanılma potansiyellerinin araştırılmalarının yapılacağı çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Akdaş, H., 2012. Bazı Jeotermal Kaynaklardan Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Endüstriyel Öneme Sahip Enzimlerin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochemistry, 33 (1), 21–28. doi:10.1016/S0032-9592(97)00046-0.

Aneja, K. R., 2005. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Age Publishers: New Delhi. ISBN 81-224-1494-X.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol, 50(4), 1563-1589. doi: 10.1099/00207713-50-4-1563.

Arrhenius, S., 1889. Uber die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Sauren, Z. Phys. Chem. 4:226–248.

Bajpai, P., 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnology Progress, 15 (2), 147–157. doi:10.1021/bp990013k. PMID 10194388.

Baltacı, M. Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Barredo, J.L., 2005. Methods in Biotechnology 17: Microbial enzymes and biotransformations, 1-27. Humana Press, New Jersey.

Barroca, M., Santos, G., Johansson, B., Gillotin, F., Feller, G., Collins, T., 2017. Deciphering the factors defining the pH-dependence of a commercial glycoside hydrolase family 8 enzyme. Enzym. Microb. Technol, 96, 163–169. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10. 011.

Bassam, J.B., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 70-76.

Begley, C.G., Paragina, S., Sporn, A., 1990. An analysis of contact lens enzyme cleaners. Journal of the American Optometric Association, 61 (3), 190–4. PMID 2186082.

Beveridge, T. J., Davies, J. A., 1983. Cellular responses of Bacillus subtilis and *Escherichia coli* to the Gram stain. Journal of Bacteriology, 156 (2), 846–58. PMC 217903. PMID 6195148.

Black, J. G., 1993. Microbiology: Principles and Explorations, (p. 65). Pearson, Prentice Hall, Londra.

Booth, C., 2006. Extremophiles. (Eds: Fred A Rainey and Aharon Oren). Methods in microbiology, Volume 35, p. 543. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-521536-7.

Bowman, J. P., 2001. Methods for Psychrophilic Bacreia. Methods In Microbiology (s. 591-614), Academic Press, Boston.

Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, D., Denman, S., 2014. *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification

of *Rahnella*, genomospecies 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov., respectively and emended description of the genus *Rahnella*. Syst. Appl. Microbiol., 37, 545-552.

Briggs, D.E., 1998. Malts and Malting (1st ed.). Blackie Academic, London. ISBN 978-0412298004.

Buck, J.D., 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. Applied and environmental microbiology, 44, 992-3.

Busse, H. J., 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu* lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66, 9-37.

Busse, H.J., Denner, E.B., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotech. 47(1), 3-38.

Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., Sowers, K.R., 2002. Low temperature extremophiles and their applications. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 253–261. doi:10.1016/S0958-1669(02)00317-8.

Chan, M., Himes, R. H., Akagi, J. M., 1971. Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic clostridia. Journal of bacteriology, 106(3), 876–881.

Chattopadhyay, M. K., Jagannadham, M. V., 2003. A branched chain fatty acid promotes cold adaptation in bacteria. Journal of Biosciences, 28 (4), 363–364. doi:10.1007/bf02705110. ISSN 0250-5991.

Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev., 29(2), 147-167.

Colco, R., 2005. Gram Staining. Current Protocols in Microbiology, 00 (1). Wiley, New Jersey.

Collins, T., Gerday, C., 2017. Enzyme catalysis in psychrophiles. In: Margesin R (ed.), Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology, 2nd ed., (p: 209–235). Springer, Cham, New York.

Collins, T., Margesin, R., 2019. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. Applied Microbiology and Biotechnology, Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019. doi:10.1007/s00253-019-09659-5.

Cousin, S., Päuker, O., Stackebrandt, E., 2007. *Flavobacterium aquidurense* sp. nov. and *Flavobacterium hercynium* sp. nov., from a hard-water creek. Int J Syst Evol Microbiol, 57(2), 243-249. doi:10.1099/ijs.0.64556-0.

Cowan, S. T., Steel, K.J., 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (3rd ed.). Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 9780511527104.

D'Amico, S., Claverie, P., Collins. T., Feller, G., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.A., Zecchinon, L., Gerday, C., 2001. Coldadapted enzymes: an unachieved symphony. In: Storey KB, Storey JM (eds) Cell and molecular responses to stress, vol 2, protein adaptations and signal transduction, vol 3. Elsevier, Amsterdam, pp 31–42.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., Gerday, C., 2006. Psychrophilic Microorganisms: Challenges for Life. EMBO Rep EMBO Reports. 7 (4), 385–89. doi:10.1038/sj.embor.7400662.

De La Cueva, S. C., Guzmán, C. L. A., Hernández, V. E. B., Rodríguez, A. de L., 2018. Optimization of biohydrogen production by the novel psychrophilic strain N92 collected from the Antarctica. International Journal of Hydrogen Energy, Volume 43, Issue 30, Pages 13798-13809. doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.11.164.

Dieser, M., Greenwood, M., Foreman, C.M., 2010. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. Arct Antarct Alp Res., 42(4), 396–405. doi.org/10.1657/1938-4246-42.4.396.

Dulieu, C., Moll, M., Boudrant, J., Poncelet, D., 2000. Improved performances and control of beer fermentation using encapsulated alpha-acetolactate decarboxylase and modeling. Biotechnology Progress., 16 (6), 958–65. doi:10.1021/bp000128k. PMID 11101321.

Duran, M.; Haznedaroğlu, B. Z., Zitomer, D. H., 2006. Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. Water Research., 40 (1), 67–74. doi:10.1016/j.watres.2005.10.019.

Emmeche, C., 1997. Defining Life, Explaining Emergence. Niels Bohr Institute, Denmark.

Fan, Y., Hua, X., Zhang, Y., Feng, Y., Shen, Q., Dong, J., Zhao, W., Zhang, W., Jin, Z.i Yang, R., 2015. Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted ß-galactosidase from *Rahnella* sp. R3. Protein Expression and Purification, (115), 158-164. doi:10.1016/j.pep.2015.07.001.

Feller, G., 2013. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. Scientifica. Hindawi Publishing, Cairo. doi: 10.1155/2013/512840.

Fenchel, T., Blackburn, H., King, G. M., 2012. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling. (3 ed.). Mass.: Academic Press/Elsevier, Boston. ISBN 978-0-12-415974-7.

Feng, W., Wang, T., Bai, J., Ding, P., Xing, K., Jiang, J., Peng, X., Qin, S., 2017. *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, Limonium sinense. Int J Syst Evol Microbiol, 67(5), 1120-1125. doi:10.1099/ijsem.0.001775

Fonseca, F., Meneghel, J., Cenard, S., Passot, S., Morris, G.J., 2016. Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular microorganisms under conditions relevant for cryopreservation. PLoS One, 11(4). doi.org/10.1371/journal.pone.0152939.

Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li S.M., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F., Brockman, F.J., 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. Applied and Environmental Microbiology, 70 (7), 4230–41. doi:10.1128/AEM.70.7.4230-4241.2004. PMC 444790. PMID 15240306.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M., Feller, G., 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends Biotechnol, 18, 103–107.

Gitai, Z., 2005. The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. Cell, 120 (5), 577–86. doi:10.1016/j.cell.2005.02.026.

Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., 1993. Roots of bacterial systematics. In: Handbook of New Bacterial Systematics (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), pp. 3-54. Academic Press Ltd, London.

Goodfellow, M., Fiedler, H.P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. Antonie van Leeuwenhoek. 98 (2), 119–142. doi: 10.1007/s10482-010-9460-2.

Goodfellow, M., Manfio, G.P. and Chun, J., 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Species: the Units of Biodiversity (Claridge, M.F. and Dawah, H.A., Eds.), pp 25-59. Chapman and Hall, London.

Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutritioni, 35 (5), 373–403. doi:10.1080/10408399509527706. PMID 8573280.

Harley, J.P., Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition. The McGraw−Hill Companies, New York.

Hine, R.S., 2008. A dictionary of biology (6th ed.). Oxford University Press, Oxford. 461p. ISBN 978-0-19-920462-5.

Holt, H.M., Gahrn-Hansen, B., Bruun, B., 2005. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. Clinical Microbiology and Infection, 11(5), 347-352. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01108.x.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H.A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.), (p. 11). Lippincott Williams & WilkinsPhiladelphia. ISBN 978-0-683-00603-2.

Horiike, T., Miyata, D., Hamada, K., 2009. Phylogenetic construction of 17 bacterial phyla by new method and carefully selected orthologs. Gene, 429 (1–2), 59–64. doi:10.1016/j.gene.2008.10.006.

Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre, M., Grimont, P., 2005. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. Int J Syst Evol Microbiol., 55(1), 457-462 doi:10.1099/ijs.0.63125-0.

Izard, D., F. Gavini, P. A. Trinel, and H. Leclerc., 1979. *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des knterobacteriaceae. Ann. Microbiol., (Inst. Pasteur) 130A, 163-177.

Janarthanan, R., Prabhakaran, P., Ayyasamy, P.M., 2014. Bioremediation of vegetable wastes through biomanuring and enzyme production. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 3(3), 89-100. ISSN: 2319-7706.

Janssen, P., Schuhmann, A., Mörschel, E., Rainey, F., 1997. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4), 1382–1388.

Joseph, B., Ramteke, P. W., Kumar, P. A., 2006. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of General and Applied Microbiology. 52 (6), p:315-320. Doi: 10.2323/jgam.52.315.

Kämpfer, P., Albrecht, A., Buczolits, S., Busse, H. J., 2002. *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a New Species from a Bioaerosol Originating from Pigeon Faeces. Systematic and Applied Microbiology, (25), 31-36. doi:10.1078/0723-2020-00099.

Khashe, S., Janda, J. M., 1998. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. Journal of clinical microbiology, 36(3), 783–787.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comperative studies of nucleotide sequences. Mol. Evol., 16(2), 111-120.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13 (4), 345–351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2. PMID 12323357.

Kirk, O., Christensen, M.W., 2002. Lipases from Candida antarctica: unique biocatalysts from a unique origin. Org. Process. Res. Dev., 6(4), 446–451. doi.org/10.1021/op0200165.

Kluyver, A.J., 1956. *Pseudomonas aerofaciens* nov. spec. and its pigments. Journal of Bacteriology, 72(3), 406-411.

Koç, M., 2013. *Geobacillus* türlerinde termostabil lipaz üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Konopka, A., 2009. Ecology, Microbial. Encyclopedia of Microbiology, pp. 91–106. doi:10.1016/B978-012373944-5.00002-X. ISBN 978-0-12-373944-5.

Králová, S., Švec, P., Busse, H., Stanková, E., Váczi, P., Sedlácek, I., 2018. *Flavobacterium chryseum* sp. nov. and *Flavobacterium psychroterrae* sp. nov., novel environmental bacteria isolated from Antarctica. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68(10), 3132-3139. doi:10.1099/ijsem.0.002952.

Lange, A.J., 2010. fructose-2,6-bisphosphate. University of Minnesota. WEB: https://web.archive.org/web/20100612204843/ http://www.cbs.umn.edu/labs/lange/KB.html

Lenzen, S., 2014. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. The Journal of Biological Chemistry, 289 (18), 12189–94. doi:10.1074/jbc.R114.557314. PMC 4007419. PMID 24637025.

Li, K.Y., Torres, J. A., 1993. Effects Of Temperature And Solute On The Mınımum Water Actıvıty For Growth And Temperature Characterıstıc Of Selected Mesophıles And Psychrotrophs. Journal of Food Processing and Preservation, 17 (4), 305–318. doi:10.1111/j.1745-4549.1993.tb00733.x.

Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G., 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. Biochim. Biophys. Acta., 1543(1), 1–10.

López-Cortés, A., Schumann, P., Pukall, R., & Stackebrandt, E., 2006. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp Artemia franciscana. Systematic and Applied Microbiology, (29), 183-190. doi:10.1016/j.syapm.2005.09.007.

MacDonell, M. T., Colwell, R. R., 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and Recommendation for Two New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. Systematic and Applied Microbiology, 6(2), 171-182. doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80051-5.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2009. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi (11. Baskıdan Çeviri). (Çev. Ed: Cumhur Çökmüş). Palme Yayıncılık, Ankara.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., (2015). Brock biology of microorganisms (Fourteenth edition). Pearson, Boston.

Madigan, M.T., Martino, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Pearson, Boston. ISBN 0-13-196893-9.

Maiangwa, J., Ali, M. S. M., Salleh, A. B., Abd Rahman, N. Z., Shariff, F. M., 2014. Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria. Extremophiles, Springer Japan. DOI 10.1007/s00792-014-0710-5.

Margesin, R., Feller, G., 2010. Biotechnological applications of psychrophiles. Environmental Technology, 31, 8-9, 835-844. Doi: 10.1080/09593331003663328

Maruyama, A., Honda, D., Yamamoto, H., Kitamura, K., Higashihara, T., 2000. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50(2), 835-846. doi:10.1099/00207713-50-2-835.

Metpally, R. P., Reddy, B. V., 2009. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. BMC genomics, 10, 11. doi:10.1186/1471-2164-10-11.

Mohapatra, B. R., Broersma, K., Mazumder, A., 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultryand wild birds. FEMS Microbiol. Lett., Vol 277, pg: 98-106. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x.

Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. Journal of Dairy Science, 79 (2), 169–184. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8.

Mykytczuk, N.C., Foote, S.J., Omelon ,C.R., Southam, G., Greer, C.W., Whyte, L. G., 2013. Bacterial growth at -15 degrees C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. ISMEJ, 7, 1211–1226. doi:10.1038/ismej.2013.8.

Neufeld, J., Clarke, A., Morris, G. J., Fonseca, F., Murray, B. J., Acton, E., Price, H. C., 2013. A Low Temperature Limit for Life on Earth. PLoS ONE, 8 (6), e66207. Bibcode:2013PLoSO...866207C. doi:10.1371/journal.pone.0066207.

New England BioLabs® Inc. *Transformation*. (t.y.) https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/transformation

Nicholls, P., Schonbaum, G.R., 1963. Catalases. In: Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (Eds.), The Enzymes, 2nd ed. (8, p. 147-225). Academic Press, New York.

Niederberger T., 2016. Extremophile, Encylopedia Britannica inc., web site: https://www.britannica.com/science/extremophile.

Nozhevnikova, A.N., Simankova, M.V., Parshina, S.N. and Kotsyurbenko, O.R., 2001. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. Water Science & Technology, 44, 41-48.

Oswald, V.F., Chen, W., Harvilla, P.B., Magyar, J.S., 2014. Overexpression, purification, and enthalpy of unfolding of ferricytochrome c552 from a psychrophilic microorganism. J. Inorg. Biochem. 131, 76–78. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.11.002.

Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzrurum.

Pandey, N., Jain, R., Pandey, A., Tamta, S., 2018. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp.

(GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. Mycology, 9(2), 81–92. https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423127.

Panikov, N.S., Flanagan, P.W., Oechel, W.C., Mastepanov, M.A., Christensen, T.R., 2006. Microbial activity in soils frozen to below -39 C. Soil Biology & Biochemistry, (38), 785–794.

Perrot, F., Hébraud, M., Junter, G.-A. and Jouenne, T., 2000. Protein synthesis in *Escherichia coli* at 4°C. Electrophoresis, 21, 1625–1629. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000501)21:8<1625::AID-ELPS1625>3.0.CO;2-4.

Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Bej, A.K., Marsic, D., Whitman, W.B., Krader, P.E. and J. Tang., 2006. *Trichococcus patagoniensis* sp. nov., a facultative anaerobe that grows at -5oC, isolated from penguin guano in Chilean Patagonia. Int J Syst Evol Microbiol, 56, 2055-2062.

Poehlsgaard, J., Douthwaite, S., 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. Nature Reviews Microbiology, 3 (11), 870–81. doi:10.1038/nrmicro1265. PMID 16261170.

Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar,M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S. K., Khanna, M., Lal, R., 2007. Polyphasic approach of bacterial classifification – An overview of recent advances. Indian J. Microbiol., 47, 98-108.

Rademaker, J. L. W., Savelkoul, F. J., 2004. Computer-assisted pattern analysis of electrophoretic fingerprints and database construction. (Chapter 7.5). In: G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans, & J. D. van Elsas (Eds.), Molecular microbial ecology manual, 2nd ed. (pp. 1-50). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Radzicka, A., Wolfenden, R., 1995. A proficient enzyme. Science, 267 (5194), 90–93. doi:10.1126/science.7809611. PMID 7809611.

Ramana, K. V., Singh, L., Dhaked, R. K., 2000. Biotechnological Application of Psychrophiles and Their Habitat to Low-Temperature. Journal of Scientific and Industrial Research, 59, pp:87-101.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. Annual Review of Microbiology, 57, 369–94. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759. PMID 14527284

Rasschaert, G., Houf, K., Imberechts, H., De Zutter, L., Heyndrickx, M., 2005. Comparison of REP-, BOX-, ERIC- and $(GTG)_5$-PCR for molecular discrimination of Salmonella serotypes. XVIIth European Symposium on the Quality of Poltry Meat, pg: 321-323.

Reddy, G., Matsumoto, G., Schumann, P., Stackebrandt, E., Shivaji, S., 2004. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54(3), 713-719. doi:10.1099/ijs.0.02827-0.

Robertson, J., Gomersall, M., Gill P., 1975. Mycoplasma hominis: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. Journal of Bacteriology, 124 (2), 1007–18. PMC 235991. PMID 1102522.

Rogers, K., Kadner, R.J., 2018. Bacteria and Physical requirements. Encylopedia Britannica, inc., web site: https://www.britannica.com/science/bacteria/Physical-requirements

Romanenko, L., Schumann, P., Rohde, M., Lysenko, A., Mikhailov, V., Stackebrandt, E., 2002. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. Int. J. Sys.t Evol. Microbiol., 52(4), 1291-1297. doi:10.1099/00207713-52-4-1291.

Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., De Ley, J., 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 310–319.

Rosselló-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 25(1), 39–67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sarmiento, F., Peralta, R., Blamey, J.M., 2015. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. Front. Bioeng. Biotechnol., 3, 148. https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00148.

Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., 2008. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS One, 3, e2843. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002843.

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature, 409 (6817), 258–268. doi:10.1038/35051736.

Schulz, H.N., Jorgensen, B.B., 2001. Big bacteria. Annual Review of Microbiology, 55, 105–37. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.105. PMID 11544351.

Seltmann, G., Holst, O., 2002. The Bacterial Cell Wall. Springer, pp. 81–82. Springer Berlin. ISBN 3-540-42608-6.

Shen, L., Liu, Y., Wang, N., Jiao, N., Xu, B., Liu, X., 2018. Variation with depth of the abundance, diversity and pigmentation of culturable bacteria in a deep ice core from the Yuzhufeng Glacier, Tibetan Plateau. Extremophiles, 22(1), 29–38. https://doi.org/10.1007/s00792-017- 0973-8.

Shih, Y.L., Rothfield, L., 2006. The bacterial cytoskeleton. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70 (3), 729–54. doi:10.1128/MMBR.00017-06. PMC 1594594. PMID 16959967.

Siddiqui, K. S., Williams, T. J., Wilkins, D., Yau, S., Allen, M. A., Brown, M. V., Lauro, F. M., Cavicchioli, R., 2013. Psychrophiles. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 41 (1), 87–115. doi:10.1146/annurev-earth-040610-133514.

Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R., 2006. Cold-adapted enzymes. Annu. Rev. Biochem., 75, 403–433. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723.

Slonczewski, J.L., Foster, J.W., 2013. Microbiology: an Evolving Science (Third ed.). W W Norton, New York. ISBN 9780393123678.

Spigaglia, P., Mastrantonio, P., 2003. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. Journal of clinical microbiology, 41(6), 2454–2457. doi:10.1128/JCM.41.6.2454-2457.2003.

Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppenstedt, R., Hippe, H., Stackebrandt, E., 2003. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium*

lacusfryxellense sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 53(4), 1019-1029 doi:10.1099/ijs.0.02554-0.

Stackebrandt, E., (2006. Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. (Stackebrandt, E., Ed.) Springer, New York.

Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 846-849.

Staneck, J. L., Roberts, G. D., 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. Appl. Microbiol. 28, 226-231.

Stetter, K., 2006. History of discovery of the first hyperthermophiles. Extremophiles, 10, 357–362. doi:10.1007/s00792-006-0012-7.

Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2002. Biochemistry (5th ed.). W.H. Freeman, San Francisco. ISBN 0-7167-4955-6.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83 (1), 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7. PMID 12058826.

Švec, P., Nováková, D., Zácková, L. Kukletovâ, M. Sedlâcek, I., 2008. Evaluation of (GTG)5-PCR for rapid identification of Streptococcus mutans. Antonie van Leeuwenhoek, 94, 573. https://doi.org/10.1007/s10482-008-9275-6.

Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlcek, I., Swings, J., 2005. Evalution of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp.. FEMS Microbiology Letters, Vol 247, pg: 59-63.

Tamaki, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Nakamura, K., Nomura, N., Nakano, K., Matsumura, M., 2003. *Flavobacterium limicola* sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53(2), 519-526. doi:10.1099/ijs.0.02369-0.

Tamaoka, J., 1994. Determination of DNA base composition. In: Chemical Methods in Prokaryotic Systematics (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.). pp 463-469. John Wiley and Sons, Chichester.

Tarté, R., 2008. Ingredients in Meat Products Properties, Functionality and Applications. (p. 177). Springer, New York. ISBN 978-0-387-71327-4.

Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.

Temizkan, G., Yılmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N., 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

Thanbichler, M., Wang, S.C., Shapiro, L., 2005. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. Journal of Cellular Biochemistry, 96 (3), 506–21. doi:10.1002/jcb.20519. PMID 15988757.

Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.M., Kreig, N.R., 2007. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In Methods for General and Molecular Microbiology, 3rd edn. pp. 330-393.

Tindall, J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwing, W., Kampfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 249-266.

Transferase. (2013). Genetics Home Reference. National Institute of Health.

Trüper, H., Schleifer, K., 2006. Prokaryote Characterization and Identification. The Prokaryotes. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt), p: 58-79. New York. ISBN 978-0-387-30740-4.

Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J., Swings, J., 2004. *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54(1), 85-92. doi:10.1099/ijs.0.02857-0

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev., 60 (2), 407-438.

Vandieken, V., Mußmann, M., Niemann, H., Jørgensen, B., 2006. *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56(5), 1133-1139. doi:10.1099/ijs.0.63639-0.

Velimirov, B., 2001. Nanobacteria, Ultramicrobacteria and Starvation Forms: A Search for the Smallest Metabolizing Bacterium. Microbes and Environments, 16 (2), 67–77. doi:10.1264/jsme2.2001.67.

Venkatachalam, S., Gowdaman, V., Prabagaran, S.R., 2015. Culturable and Culture-Independent Bacterial Diversity and the Prevalence of Cold-Adapted Enzymes from the Himalayan Mountain Ranges of India and Nepal. Microbial Ecology, 69(3), 472-491. Doi: 10.1007/s00248-014-0476-4.

Verma, V., 2017. Enzymes Market, Growth Potential, Price Trends, Competetive Market Share and Forecast 2018-2024. https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market

Vijayabaskar, M. S., Vishveshwara S., 2010. Construction of Energy Based Protein Structure Networks: Application in the Comparative Analysis of Thermophiles and Mesophiles. Biophysical Journal, Volume 98, Issue 3, 387a. Cell Press.

von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M., 2017. *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 67(6), 1656-1664 doi:10.1099/ijsem.0.001836.

Welch, D. F., 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. Clinical microbiology reviews, 4(4), 422–438. doi:10.1128/cmr.4.4.422.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J., Prescott, L. M., 2008. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. McGraw-Hill Higher Education, New York.

Williams, C., 2011. Who are you calling simple?. New Scientist. 211 (2821), 38–41. doi:10.1016/S0262-4079(11)61709-0.

Xu, J., He, W., Wang, Z., Zhang, D., Sun, J., Zhou, J., Li, Y., Su, X., 2016. A Comparison of Molecular Biology Mechanism of *Shewanella putrefaciens* between Fresh and Terrestrial Sewage Wastewater. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 4, 86. doi:10.3389/fbioe.2016.00086.

Yang, D.C., Blair, K.M., Salama, N.R., 2016. Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80 (1), 187–203. doi:10.1128/MMBR.00031-15. PMC 4771367. PMID 26864431.

Young, K.D., 2006. The selective value of bacterial shape. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70 (3), 660–703. doi:10.1128/MMBR.00001-06. PMC 1594593. PMID 16959965.

Zhao, J., Manno, D., Leggiadro, C., O'Neil, D., Hawari, J., 2006. *Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56(1), 205-212 doi:10.1099/ijs.0.63829-0.

Zielinski, M., Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Debowski, M., Harnisz, M., Kwiatkowski, R., 2017. Biohydrogen production at low load of organic matter by psychrophilic bacteria. Energy, Volume 134, pg: 1132-1139. ISSN 0360-5442, https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.05.119.

Ziemke, F., Höfle, M., Lalucat, J., Rossellö-Mora, R., 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 48(1), 179-186. doi:10.1099/00207713-48-1-179.

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Ayancık/SİNOP'ta doğdu. İlköğretim eğitimini burada tamamladı. 2008 yılında Sinop Anadolu Öğretmen Lisesi'nde eğitime başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2012 yılında girdiği Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü 2016 yılında bitirdi ve aynı yıl Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.