



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TUZLANMIŞ DERİLERDEN ZAYIF
HALOFİL BAKTERİLERİN İZOLE
EDİLEREK TANIMLANMASI VE
BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DİLEK YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Pınar ÇAĞLAYAN

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Didem BERBER

İSTANBUL, 2023



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TUZLANMIŞ DERİLERDEN ZAYIF
HALOFİL BAKTERİLERİN İZOLE
EDİLEREK TANIMLANMASI VE
BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DİLEK YALÇIN
(520121007)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Pınar ÇAĞLAYAN

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Didem BERBER

İSTANBUL, 2023

TEŞEKKÜR

Lisans dönemim ve tez sürecim boyunca laboratuvarında çalışmalarım esnasında verdiği destekle, anlayışı, yol göstericiliği ve çalışma disipliniyle örnek bir insan olan ve bu zorlu süreci bana kolaylaştıran Canım Danışmanım ve Saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Pınar ÇAĞLAYAN'a, Tezimde yaptığı düzeltmelerle ve engin bilgileriyle bana yol gösteren, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kariyerini kendime örnek aldığım Sevgili Hocam Doç. Dr. Didem BERBER'e,

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvarının kapılarını açan, lisans döneminde verdiği bilgilerle yolumuza ışık tutan, eğitim hayatımda bugünlere gelmemde katkıları olan Saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Meral BİRBİR'e,

Tez sürecimde '2210 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı' ile bana burs sağlayan TÜBİTAK BİDEB'e,

Tezimde yaptığı düzeltmeler ve değerli yorumları için Hocam Can AKPOLAT'a

Bu zorlu sürecimde ilgisini ve desteğini benden hiç esirgemeyen, hayattaki en büyük şansım Onur ÇALIK'a,

Tez deneylerimi gerçekleştirmemde sağladığı imkânlar için Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Çalışanlarına,

Deneyimlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren canım arkadaşım Özkan DİRİ'ye,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım annem Birsen YALÇIN'a, canım babam Sait YALÇIN'a ve canım kardeşim Murat YALÇIN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim, 2023

DİLEK YALÇIN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
SEMBOLLER.....	xiii
KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ.....	xvi
BÖLÜM 1	1
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Derinin Yapısı.....	2
1.2. Tuzun Önemi	5
1.3. Tuzun Kullanım Alanları.....	6
1.4. Tuzun Mikrobiyolojik Etkisi	8
1.5. Halofilik Mikroorganizmalar.....	9
1.5.1. Zayıf Halofil Bakterilerle İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	13
1.5.2. Halofilik Mikroorganizmaların Tuza Adaptasyon Mekanizması.....	16
1.5.3. Halofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemi.....	20
1.6. Bakteriyosinler Hakkında Genel Bilgi	28
1.6.1. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması	31
1.6.2. Bakteriyosinlerin Biyoteknolojik Önemi.....	32
BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM	36
2.1. Materyal.....	36
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	36
2.1.1.1. Tuz İçermeyen Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	36

2.1.1.2. % 0.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	36
2.1.1.3. %3'lük Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	37
2.1.1.4. %5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	37
2.1.1.5. %7.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	37
2.1.1.6. %10'luk Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	38
2.1.1.7. %12.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	38
2.1.1.8. %15'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği.....	38
2.1.1.9. %3'lük Tuz İçeren Sıvı Kompleks Besiyerinin İçeriği	39
2.1.1.10. %3 Tuz İçeren Agarlı Tween 80 Besiyeri	39
2.1.1.11. %3 Tuz İçeren Nişasta Besiyerinin İçeriği	39
2.1.1.12. %3 Tuz İçeren DNaz Besiyerinin İçeriği	39
2.1.1.13. Selüloz Besiyerinin İçeriği	40
2.1.1.14. Üre Agar Besiyeri	40
2.1.1.15. Sitrat Agar Besiyeri	41
2.1.1.16. %3 Tuz İçeren Agarlı Jelatin Besiyerinin Hazırlanması	41
2.1.1.17. %3 Tuz İçeren Agarlı Ksilan Besiyerinin Hazırlanması	42
2.1.1.18. %3 Tuz İçeren Agarlı Pullulan Besiyerinin Hazırlanması	42
2.1.1.19. ONPG Testi İçin Besiyerinin Hazırlanması	42
2.1.1.20. Karbonhidrat Fermantasyon Ortamı	42
2.1.1.21. Aminoasit Dekarboksilaz Besiyerinin Hazırlanması.....	43
2.1.1.22. %30 Tuz Bulunan Stok Steril Tuzlu Su Çözeltisinin Hazırlanması (TS30).....	43
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin İçeriği ve Kimyasal Maddeler.....	45
2.1.2.1. %3 Tuz Bulunan Steril Tuzlu Su Çözeltisinin Hazırlanması (TS3).....	45
2.1.2.2. 1 M HCl Çözeltisinin Hazırlanması	45
2.1.2.3. 1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması.....	45

2.1.2.4. Tris-EDTA (TE) Tampon Çözeltisi.....	45
2.1.2.5. 5 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanışı	46
2.1.2.6. %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) Stok Solüsyonu (pH 8)	46
2.1.2.7. %10 Setil trimetil-amonyum bromür Solüsyonu (CTAB)	46
2.1.2.8. Proteinaz K Enziminin Hazırlanması	46
2.1.2.9. Ribonükleaz (RNaz) Enziminin Hazırlanması	47
2.1.2.10. Lizozim Enziminin Hazırlanması.....	47
2.1.2.11. 50X Tris-acetate EDTA (TAE) Stok Tampon Çözeltisinin Hazırlanması.....	47
2.1.2.12. 1X Tris-acetate EDTA (TAE) Çalışma Tamponu Hazırlanması.....	47
2.1.2.13. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	47
2.1.2.14. dNTP Karışımının Hazırlanması	48
2.1.2.15. DNA-Ladder	48
2.1.2.16. Jel Yükleme Boyasının Hazırlanması.....	48
2.1.2.17. Kloroform:izoamil alkol (24:1) Çözeltisinin Hazırlanması.....	48
2.1.2.18. Primerlerin Hazırlanması.....	48
2.1.2.19. Safranin Boya Çözeltisinin Hazırlanması (100 ml).....	49
2.1.2.20. %95'lik Etil Alkol Çözeltisinin Hazırlanması.....	49
2.1.2.21. Kristal Viyole Boyasının Hazırlanması	49
2.1.2.22. Gram'ın İyot Çözeltisinin Hazırlanması.....	49
2.1.2.23. Katalaz Testi Ayırıcı	50
2.1.2.24. Oksidaz Test Ayırıcı	50
2.1.2.25. Kongo Kırmızısı Ayırıcı	50
2.1.2.26. Frazier Ayırıcı.....	50
2.1.2.27. Aminoasit Solüsyonlarının Hazırlanması.....	50

2.1.2.28. Bakteriyosinin Antibakteriyel Etkisinin Proteinaz K ve Lipaz Enzimlerinden Etkilenip Etkilenmediğini Tespit Etmek İçin Gerekli Olan Çözeltilerin Hazırlanması	51
2.1.2.29. Antimikrobiyal Madde Stok Solüsyonu Hazırlanması	51
2.1.2.30. 0.5 No'lu McFarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması.....	51
2.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	51
2.2. Yöntem	52
2.2.1. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinin Tuzla (İstanbul) Organize Deri Sanayi Bölgesinde Bulunan Tabakhanelerden Alınması	53
2.2.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi	53
2.2.3. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Proteaz Üreten Toplam Zayıf Halofil ve Lipaz Üreten Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi	54
2.2.4. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilmesi.....	54
2.2.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyon Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması	55
2.2.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması.....	55
2.2.7. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması.....	56
2.2.8. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Gram Boyama Reaksiyonlarının Yapılması.....	56
2.2.9. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi.....	56
2.2.9.1. Amilaz Aktivitesi.....	56
2.2.9.2. Lipaz Aktivitesi	57
2.2.9.3. Selülaz Aktivitesi.....	57

2.2.9.4. Üreaz Aktivitesi	58
2.2.9.5. DNaz Aktivitesi	58
2.2.9.6. Proteaz Aktivitesi	58
2.2.9.7. Pullulanaz Aktivitesi.....	59
2.2.9.8. Ksilanaz Aktivitesi.....	59
2.2.9.9. β -galaktosidaz Aktivitesi	60
2.2.10. Zayıf Halofil Bakterileri İzolatlarının Biyokimyasal Testleri	60
2.2.10.1. Katalaz Testi	60
2.2.10.2. Sitrat Aktivitesi.....	60
2.2.10.3. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	61
2.2.10.4. Oksidaz Testi	61
2.2.10.5. Dekarboksilaz Testi	61
2.2.11. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu Yapılması.....	62
2.2.12. İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi	63
2.2.13. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR ile 16S rRNA Gen Dizilerinin Amplifikasyonu	64
2.2.14. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrol Edilmesi.....	64
2.2.15. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizilerinin Tespit Edilmesi ve Filogenetik Analizlerinin Yapılması.....	65
2.2.16. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması ve Birbirlerine Karşı Oluşturduğu İnhibisyonların Belirlenmesi	65
2.2.16.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Sıcaklık Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi	67
2.2.16.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı pH Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi	67

2.2.16.3. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Tuz Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi.....	68
2.2.16.4. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Proteinaz K ve Lipaz Enzimlerinin Etkisinin İncelenmesi	68
2.2.17. Tuzlanmış ve Depolanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakterilerin Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Tespit Edilmesi	69
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA	71
3.1. Alınan Deri Örnekleri Hakkında Genel Bilgi.....	71
3.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerindeki Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı, Proteolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı ve Lipolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısının Tespit Edilmesi.....	71
3.3. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilmesi.....	74
3.4. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyon Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması.....	76
3.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması	78
3.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması.....	79
3.7. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivite Sonuçları	81
3.8. Zayıf Halofil Bakterileri İzolatlarının Biyokimyasal Testlerinin Sonuçları.....	84
3.9. Moleküler Tanımlama Sonuçları	86
3.10. Tuzlanmış Koyun Derilerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması ve Birbirlerine Karşı Oluşturduğu İnhibisyonların Belirlenmesi	93
3.11. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Sıcaklık, pH, Tuz Konsantrasyon Değerlerinin ve Enzim Etkisinin İncelenmesi	95

3.12. Tuzlanmış ve Depolanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakterilerin Sodyum dimetilditiyokarbomat Aktif İçeriğe Sahip Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Tespit Edilmesi	101
BÖLÜM 4. SONUÇLAR.....	106
KAYNAKÇA.....	108
EKLER	128
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

TUZLANMIŞ DERİLERDEN ZAYIF HALOFİL BAKTERİLERİN İZOLE EDİLEREK TANIMLANMASI VE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ham deri örnekleri, yüzüldükten sonra mamul deri hâline getirilmediğinde tuzlanarak depolanmaktadır. Derilerin korunmasında kullanılan tuzlar işlem görmemişse, tuzlardaki halofil bakteriler derileri kontamine ederek deri kalitesini düşürmekte ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Çalışmamızda tuzlanarak 6 ay 20°C’de depolanmış 10 adet koyun derisi örneğinde bulunan zayıf halofil bakterilerin izole edilerek moleküler olarak tanımlanması, biyoteknolojik açıdan önemli enzimlerinin tespit edilmesi, bakteriyosin üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve deri sektöründe kullanılan kimyasal bir maddenin (sodyum dimetilditiyokarbomat) hangi konsantrasyon değerlerinde bu bakterileri inhibe edebildiği araştırılmıştır. Örneklerdeki toplam zayıf halofil, proteolitik ve lipolitik aktivite gösteren zayıf halofil bakteri sayıları sırasıyla 1×10^4 - 4×10^5 kob/g, 2×10^3 - 4×10^4 kob/g ve 1×10^2 - 3×10^4 kob/g olarak saptanmıştır. Örneklerden toplam 20 adet zayıf halofil bakteri izole edilmiştir. İzolatların optimum geliştiği tuz konsantrasyon, sıcaklık ve pH aralıkları sırasıyla %3-5, 37-45 °C ve 7-8 olarak tespit edilmiştir. İzolatların tamamı proteaz, 12 izolat lipaz (%60), 1 izolat üreaz (%5), 17 izolat DNaz (%85), 2 izolat pullulanaz (%10), 9 izolat ksilanaz (%45), 18 izolat selüloz (%90) aktivitesi göstermiştir. Hiçbir izolat amilaz ve β -galaktosidaz aktivitesi göstermemiştir. İzolatların tamamının Gram (+), çomak şekilli, katalaz ve oksidaz pozitif olduğu tespit edilmiştir. İzolatların farklı karbon kaynaklarından (D-ksiloz, D-mannoz, D-riboz, sukroz) asit üretebildiği saptanmıştır. İzolatların derilerin yapısında bulunan amino asitleri (L-alanin, L-sistein, L-glisin, L-treonin) parçalayabildiği tespit edilmiştir. İzolatlar, 16S rRNA dizi analiz sonuçlarına göre *Bacillus aerius*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus kochii*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus rugosus* ve *Bacillus safensis* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatlardan *Bacillus aerius* bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin termostabil yapıda olduğu, yüksek pH ve tuz değerlerinde aktivitesini kaybetmediği, lipaz enzimiyle muamele edildiğinde aktivitesini koruduğu, proteinaz K enzimiyle muamele edildiğinde ise aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir ve deri endüstrisinde kullanılabilirliği öngörülmüştür. İzolatların deri endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sodyum dimetilditiyokarbomat aktif içerikli kimyasal maddeye karşı duyarlılık durumları Kirby-Bauer disk difüzyon metoduyla araştırılmış ve izolatların bu kimyasala karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. İzolatların belirtilen kimyasala karşı duyarlı olması sebebiyle

bu maddenin ilgili bakterilerin inhibisyonu amacıyla deri endüstrisinde kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünölmektedir.

Ekim, 2023

DİLEK YALÇIN



ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SLIGHTLY HALOPHIL BACTERIA FROM SALTED SKIN AND INVESTIGATION OF THEIR BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE

Rawhide samples are stored in salt curing in cases where they are not turned into finished leather immediately after skinning. If the salts used for the protection of the leather are not processed, the halophilic bacteria found in the salts contaminate the leather, reducing the leather quality and causing economic losses. In the present study, the isolation and molecular identification of slightly halophilic bacteria, determination of their biotechnologically important enzymes, and their bacteriocin production capacity, and their control with a chemical substance (sodium dimethyldithiocarbamate) were investigated in 10 salted sheepskin samples that were stored at 20 °C for 6 months. The total number of slightly halophilic bacteria, proteolytic slightly halophilic bacteria, and lipolytic slightly halophilic bacteria in the samples were determined as 1×10^4 - 4×10^5 CFU/g, 2×10^3 - 4×10^4 CFU/g, and 1×10^2 - 3×10^4 CFU/g, respectively. Twenty slightly halophilic bacteria were isolated from the samples. The optimum salt concentration, temperature and pH ranges at which the isolates grew were 3-5%, 37-45°C, and 7-8, respectively. While all isolates showed protease activity, the number and percentage of isolates showing lipase, urease, DNase, pullulanase, xylanase, and cellulase activities were 12 (60%), 1 (5%), 17 (85%), 2 (10%), 9 (45%), and 18 (90%), respectively. None had amylase and β -galactosidase activities. All isolates were Gram (+), rod-shaped, catalase and oxidase positive. The isolates were found to be able to produce acid from different carbon sources (D-xylose, D-mannose, D-ribose, sucrose) and to break down amino acids (L-alanine, L-cysteine, L-glycine, L-threonine) found in the skin structure. According to the results of 16S rRNA sequence analysis, the isolates were identified as *Bacillus aerius*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus kochii*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus rugosus* and *Bacillus safensis*. It has been established that the bacteriocin produced by *Bacillus aerius* from the identified isolates is resistant to heat, and does not lose its activity at high levels of salt and pH. Conversely, when treated with proteinase K enzyme, it loses its activity entirely but retains its effectiveness when treated with lipase enzyme. Additionally, its potential use within the leather industry has been predicted. The Kirby-Bauer disc diffusion method was used to investigate the susceptibility of the isolates against the chemical substance containing sodium dimethyldithiocarbamate as an active ingredient, which is commonly used in the leather industry. As the isolates exhibited sensitivity to the chemical, it is thought that this substance

could be utilized within the leather industry to combat associated bacterial growth.

October, 2023

DİLEK YALÇIN



SEMBOLLER

%	:	Yüzde
mL	:	Mililitre
°C	:	Santigrat derece
mM	:	Milimolar
µl	:	Mikrolitre
g	:	Gram
dk	:	Dakika
M	:	Molar
mg	:	Miligram
w/v	:	Birim hacime göre ağırlık
km	:	Kilometre
V	:	Volt
L	:	Litre
kg	:	Kilogram
IU	:	Uluslararası ölçü birimi
kDa	:	Kilodalton
mm	:	Milimetre
cm³	:	Santimetre küp
pH	:	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
mA	:	Miliamper
µg	:	Mikrogram

KISALTMALAR

A	: Adenin
bp	: Baz çifti
CTAB	: Setil trimetilamonyum bromür
CFU	: Koloni oluşturan birim
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CFU/g	: Koloni oluşturan birim/gram
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
G	: Guanin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Monopotasyum fosfat
kob	: Koloni oluşturan birim
kob/g	: Koloni oluşturan birim/gram
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
ONPG	: Orto-Nitrofenil-β-galaktozit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNaz	: Ribonükleaz
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
rpm	: Dakikada devir sayısı
S	: Sitozin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TE	: Tris-EDTA
T	: Timin
TS	: Tuzlu su

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Filogenetik Ağaçta Halofilik Mikroorganizmaların Dağılımı.	11
Şekil 1.2. İyon Pompaları ile Zardan İyon Taşınma Mekanizmasının Şematik Gösterimi.	17
Şekil 1.3. Ektoin ve Hidroksi ektoinin Yapısı.	19
Şekil 1.4. Yol Çatlak Tamirinde Halofilik Bakterilerin Kullanımı.....	26
Şekil 2.1. Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzolasyonu.	55
Şekil 2.2. Selülaz Aktivitesi Testi.	57
Şekil 2.3. DNaz Aktivitesi Testi.	58
Şekil 2.4. Proteaz Aktivitesi Testi.....	59
Şekil 2.5. Ksilanaz Aktivitesi Testi.....	59
Şekil 2.6. Sitrat Testi.....	60
Şekil 2.7. Oksidaz Testi.	61
Şekil 2.8. Dekarboksilaz Testi.	62
Şekil 2.9. Bakteri İzolatlarından Bakteriyosin İçeren Süpernatantların Eldesi.....	66
Şekil 3.1. Deri Örneklerindeki Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.	72
Şekil 3.2. Deri Örneklerindeki Proteaz Üreten Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.....	73
Şekil 3.3. Deri Örneklerindeki Lipaz Üreten Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.	73
Şekil 3.4. İzole Ettiğimiz Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Petri Görüntüsü.....	74
Şekil 3.5. İzolatların Hidrolitik Aktivitelerinin Yüzdesel Dağılımı.....	82
Şekil 3.6. Antimikrobiyal Maddeye Karşı Oluşan İnhibisyon Zonu.	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Halofilik Mikroorganizmaların Optimum Geliştiği Tuz Konsantrasyonları.....	10
Tablo 1.2. Prokaryotlarda Bazı Uyumlu Ozmotik Çözünen Maddelerin Dağılımı.....	18
Tablo 1.3. Halofil ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyel Uygulamaları.....	21
Tablo 1.4. Bazı Halosinler ve Kimyasal Özellikleri.....	29
Tablo 2.1. Antimikrobiyal Madde'nin 18 Farklı Konsantrasyon Değerinde Hazırlanması.....	70
Tablo 3.1. Deri Örnekleri Hakkındaki Genel Bilgi.	71
Tablo 3.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı, Proteolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı ve Lipolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı (kob/g).....	72
Tablo 3.3. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Durumları.	77
Tablo 3.4. İzolatların Gelişebildiği pH Değerleri.....	78
Tablo 3.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumları.....	80
Tablo 3.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi.	81
Tablo 3.7. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları.	85
Tablo 3.8. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofilik Bakteri İzolatlarının İzolat Kodları, Baz Uzunluğu, Benzerlik Oranı (%), Filogenetik Açından Benzediği Tür ve Erişim Numaraları.	87
Tablo 3.9. Tanımlanan İzolatların Deri Örneklerinde Bulunma Sıklığı.....	91
Tablo 3.10. İzolatların Birbirine Karşı Bakteriyosin Üretimlerinin İncelenmesi.....	94
Tablo 3.11. <i>Bacillus aerius</i> Bakteri İzolatından Elden Edilen Bakteriyosinin Farklı Sıcaklık, pH, Tuz Konsantrasyonu Ayrıca Proteinaz K ve Lipaz gibi Enzim Koşullarında Diğer Bakteriler Üzerindeki İnhibisyon Sonuçları.....	96
Tablo 3.12. Tuzlanmış ve Depolanmış Derilerden İzole Ederek Tanımladığımız Bakteri İzolatlarının 18 Farklı Konsantrasyonda Hazırlanmış Sodyum dimetilditiyokarbomat Aktif İçeriğe Sahip Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılık Durumlarının Sonuçları.....	102

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Dericilik, dünya ekonomisinde önemli bir konuma sahip olan asırlık bir sektördür. Türkiye ekonomisinde ise 1970'lerden beri dericilik gittikçe artan bir değer kazanmıştır. Son 15-20 yıl içinde hızla gelişerek hem yurt içindeki ham deri kaynaklarını hem de yurt dışından ithal edilen kaynakları kullanarak deri ürünlerinin ihracatı gerçekleştirilmeye başlanmıştır (Deri ve Deri Mamulleri Sektörü Raporu, 2023). Türk dericilik sektörü, gerek altyapısı gerekse teknolojik olanakları sayesinde diğer ülkelerle rekabet edebilecek bir konuma gelmiştir. Ancak ham derinin ülke içindeki üretimi yeterli düzeyde olmadığı için genellikle bu talep ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Günümüzde Türkiye'de bulunan ham derileri işleyen sanayi bölgeleri özellikle İstanbul (Tuzla), Bursa, İzmir (Menemen), Manisa (Kula), Uşak, Bolu (Gerede), Balıkesir gibi şehirlerde yoğunlaşmıştır (Deri ve Deri Mamulleri Sektörü Raporu, 2023). Deri İhracatı Performans Raporu, 2023 yılı Ocak ve Şubat ayları için açıklanan verilere göre ülkemizde dericilik sektörü ihracatında %1.5'lik bir artış bulunmakta ve 38 milyar dolarlık bir kazanç elde edilmektedir (Deri ve Deri Mamulleri Sektörü Raporu, 2023). Ülkemizde önemli bir yere sahip olan dericilik sektöründe üretilen derinin kaliteli olması ithalat ve ihracat için önemli olmakla beraber ekonomik kayıpların önlenmesi açısından da değerlidir. Bu sebeple ham derinin doğru bir şekilde hayvandan yüzölüp uygun koruma yöntemleriyle korunması gerekmektedir. Hayvan derileri su, toprak, kan, hava, gübre, ahır ve derileri korumak için kullanılan tuzlardan bulaşan mikroorganizmaları taşımaktadır (Birbir, 1991). Yapısında bulundurduğu protein ve lipid içeriğiyle hayvan derileri birçok mikroorganizma için uygun substrat sağlamaktadır. Hayvan canlıyken mikroorganizmaların deri üzerinde çok az bir etkisi bulunmaktadır. Fakat deri yüzüldükten sonra oluşan ortamın uygunluğu sebebiyle mikroorganizmalar hızla çoğalmaya başlamaktadır. Özellikle mikroorganizma popülasyonları derilerde bulunan mevcut proteinleri hidrolize ederek derinin yapısını bozmaktadır (Akpolat ve ark., 2015). Ayrıca mikroorganizmaların ürettiği hidrolitik enzimler deride kötü koku oluşumu, sırça hasarı, kıl gevşekliği, renk pigmentasyonları, kolajen hasarı, kırmızı lekelenme gibi durumlara sebep olarak derinin yapısını bozmakta ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Habib, 2015; Migliore ve ark., 2019). Bu sebeple derilerin korunması önem arz etmektedir. Ham derinin korunması için kurutma, soğutma, tuzlama gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra mikrobiyal gelişmeyi engellemek için çeşitli antimikrobiyal maddelerin kullanımı da bulunmaktadır (Kanagaraj ve ark., 2005; Birbir ve ark., 2020; Toksoz ve ark., 2023).

Tuzla koruma yönteminde deriye serpilen tuz derinin alt katmanlarına nüfuz ederek deri yüzeyinden suyun çekilmesine yardımcı olmakta ve ortamı mikrobiyal gelişme için elverişsiz hale getirmektedir (Bailey, 1999). Bu durumda tuzlanmış derilerde mikrobiyal büyüme olasılığı minimize edildiğinden derideki proteinleri parçalayıcı enzimler ortamda bulunmayacak ve post/derilerde hasar meydana gelmemiş olacaktır (Woods ve ark., 1972). Bu tuzcul ortam diğer mikroorganizmaların gelişmesi için uygun olmamasına rağmen halofil mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedir (Horikoshi ve Antranikian, 2011). Halofil bakteri ve arkeler tuzlanmış derilerin yapısında bulunan protein ve lipitleri sindirebilen proteaz ve lipaz enzimlerine sahiptir. Bu durum “kızıl ısı” (red head) olarak bilinen bir duruma yol açabilmektedir. Kırmızı lekelenme bakteriler tarafından üretilen pigment maddelerinden (karotenoidler) kaynaklanmaktadır. Bu kırmızı lekelenmeye post/derilerde rastlanıldığı zaman derilerin halofil mikroorganizmalar tarafından kontamine olduğu anlaşılmaktadır (Akpolat ve ark., 2015). Önceki çalışmalarda tuzlanmış post/derilerde halotolerant bakterilerin, ılımlı halofil bakterilerin ve aşırı halofil arkelerin bulunduğu, bu mikroorganizmaların deride hasara sebep olarak deri kalitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Özyaral ve Birbir, 2005; Caglayan ve ark., 2017). Fakat tuzlanmış derilerde zayıf halofil bakterilerin izole edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada zayıf halofil bakterilerin tuzlanmış ve 6 ay 20°C’de depolanmış koyun derisi örneklerinden izole edilerek önce mikrobiyolojik ardından moleküler yöntemlerle tanımlanarak biyoteknolojik önemlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Zayıf halofil bakteri izolatlarının koloni şeklinin belirlenmesi, Gram boyama reaksiyonlarının yapılması, optimum geliştikleri tuz konsantrasyonlarının, pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi, katalaz, selüloz, oksidaz, DNaz, β -galaktosidaz, üreaz, pullulanaz, amilaz, ksilanaz, lipaz, proteaz aktivitelerinin belirlenmesi, farklı karbon ve amino asitleri kullanma özellikleri, bakteriyosin üretim kapasitelerinin araştırılması ayrıca farklı çevresel koşullardaki (tuz, pH, sıcaklık, enzim) bakteriyosin etkinliğinin tespit edilmesi ve zayıf halofil bakteri izolatlarının kontrolü için deri sektöründe kullanılan antimikrobiyal bir kimyasalın hangi konsantrasyon değerlerinde bu bakterileri inhibe edebildiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Derinin Yapısı

Deri, vücudu çepeçevre sararak dış etkenlerden koruyan aynı zamanlarda çevre ile etkileşimini ve iletişimini sağlayan bir organdır. Vücut için tehlike arz eden çeşitli yabancı maddelerin penetrasyonunu engeller. Mekanik çarpmalar, darbeler ve sarsıntı gibi durumlardan vücudu korur. Bir bariyer görevi görmekle birlikte aynı zamanda yağda çözünen bileşikler için bir depo kaynağıdır (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2008).

Deri kimyasal bileşimi, yapısı ve fizyolojisi bakımından birbirinden farklı 3 tabakadan oluşmaktadır. Dıştan içe doğru sıralandığında bu tabakalar; Epidermis (üst deri), Dermis (esas deri/koryum), Hipodermis (subkütan tabaka/alt deri)'dir (Coşkun, 2018). Epidermis çok katlı, keratinleşmiş, geçirgen olmayan yassı epitel hücrelerinden meydana gelir. Kıl folikülleri, yağ bezleri, ter bezleri bu tabakadaki epitel hücreleri tarafından oluşur. Epidermisin kalınlığı vücudun bölgelerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Epidermiste kan damarı bulunmadığı için kendini dermis tabakasındaki hücrelerden beslemektedir (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2008; Çınar ve Tozun, 2020). Epidermis tabakası *stratum korneum*, *stratum lusidum*, *stratum granulozum*, *stratum spinosum* ve *stratum basale* (*stratum germinativum*) tabakalarından meydana gelmektedir. *Stratum korneum* tabakası epidermisin en dış tabakasıdır ve bu tabaka korneosit hücreleri yani ölü hücrelerden oluşmaktadır. Bu tabaka korneositlerin üst üste yığılması ile oluştuğu için “boynuzsu tabaka” olarak da adlandırılır ve dökülerek kendini sürekli olarak yenilemektedir. *Stratum lusidum* epidermisin ikinci tabakasıdır. Ölü hücrelerden oluşan, kıl kökleri içermeyen bir tabakadır. *Stratum granulozum* tabakası deriye rengini veren tabakadır ve epidermisin en ince tabakasıdır. *Stratum spinosum* epidermisin lipitçe zengin tabakasıdır, kübik ve yassılaştırmış hücrelerden oluşmaktadır. *Stratum basale* epidermisin en alt tabakasıdır, canlı hücrelerden oluşmuştur. Bu tabakada bulunan hücreler mitoz bölünme yeteneğine sahiptir. Epidermis hücrelerinin sürekli kendini yenilemesinden bu tabaka sorumludur (Toptaş, 1998; Bediz-Ölçer ve Gönül, 2008; Mescher, 2009). Derinin işlenti basamaklarından biri olan kireçlik aşamasında epidermis tabakası eğer kürk ya da post olarak kullanılmıyacaksa deriden tamamen uzaklaştırılmaktadır (Toptaş, 1998).

Dermis, deri üretiminde en önemli tabakadır. Derinin ana tabakasını bu kısım oluşturur ve dericilik sektörünü asıl ilgilendiren bu tabakadır. Koryum tabakası olarak da isimlendirilen dermis tabakası epidermisi destekleyen bir tabakadır. Kolajen, elastin gibi fibröz proteinlerden oluşan bu tabaka, deri tabakasının %90-95'ini oluşturur. Bağ doku liflerinden oluşan bir matriks içermektedir. Dermis tabakası kan damarlarıyla donatılmış bir tabaka olduğu için deride besin maddelerini taşınması, atıkların uzaklaştırılması, ısıнын dengelenmesi gibi görevlerin gerçekleştirmesini sağlar. Dermis tabakası bağ doku liflerinden oluşmaktadır. Bu liflerden en önemlisi kolajendir. Bu tabakanın dikey kesitine baktığımızda *sırça tabakası*, *papiller tabaka* ve *retikular tabaka* olmak üzere 3 kısma ayrılmaktadır (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2008). *Sırça tabakası* olarak bilinen tabaka derinin işlenti basamaklarından biri olan kireçlik işleminden sonra deride görülen en dış tabakadır. Bu tabaka deriye görünümünü vermektedir ve bu açıdan çok önemlidir (Toptaş, 1993).

Papiller tabaka, sırça tabakası ile retikular tabaka arasında kalan tabakadır. *Papiller tabaka* kıl, yağ ve ter bezleri gibi kolajen olmayan dokuların uzaklaştırılmasından sonra gözenekli bir hal almaktadır. Kireçlik ve sama işlemlerinde bu tabaka zayıflatılırsa mukavemet azalır ve sırça boşluğu meydana gelmektedir (Toptaş, 1998). *Retikular tabaka* koruyucu bir tabaka olup kalınlığı hayvanın cinsine göre farklılık göstermektedir. Kolajen lif dokusundan oluşan bir tabakadır. Bu tabakadaki lifler nispeten diğer tabakalara göre daha kalındır. Keçi, koyun, sığır, dana gibi hayvanlarda bu tabaka yeterli kalınlığa ve mukavemete sahip olduğu için deri endüstrisinde yeterli kullanım potansiyeline sahiptir (Toptaş, 1993).

Hipodermis (alt deri), dermis ve kas dokusu arasında kalan tabakadır. Bol miktarda yağ, sinir, kas doku ve kan damarı içermektedir. Kolajen lif yapısına sahip olmakla birlikte oldukça gevşek bir yapıya sahiptir. Bu tabaka kireçlik işlemleri sırasında deriden uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca bol miktarda yağ hücreleri içerdiği için mekanik bir koruyucu görevi üstlenerek deri yüzüldükten sonra dermis tabakasını korumaktadır (Toptaş, 1993; Bediz-Ölçer ve Gönül, 2008; Mescher, 2009). Deri; ırk, cinsiyet, bakım durumu, mevsimler, yaşam koşulları gibi birden fazla faktöre bağlı olarak değişken bir yapı göstermektedir. Derinin kalitesini belirlemede hayvanın beslenme durumu, yaşadığı bölgenin iklimi gibi etkenler de aynı zamanda önemlidir. Örneğin; sıcak iklimlerde yaşayan hayvanların derileri nispeten ince ve zayıf, serin bölgelerde yaşayan hayvanların ise derisi kalındır yapısı da serttir. Hayvanın yemle veya doğal yolla beslenmesi de deri kalitesini etkilemektedir. İyi ve kaliteli bir deride derideki lifler ince ve sık bir yapıda olmalıdır ayrıca sırça yapısı düzgün olmalıdır (Coşkun, 2018).

Derinin hammaddesi hayvanlardan elde edilmektedir. Tabakhanelerde işlenmiş ve kullanıma hazır hâle gelmiş olan deri “mamul deri”, henüz işlenmemiş veya canlı hayvanın üzerinde bulunan deri/post ise “ham deri” olarak tanımlanmaktadır. Ham deri üzerine uygulanan çeşitli işlemlerle hayvan derileri daha sert/dayanıklı ve kullanılabilecek halde olan mamul deri hâline getirilmektedir. Hayvan derilerinin histolojik ve kimyasal yapıları temel olarak benzerlik gösterse de herbir hayvan türünün kendine has bir deri yapısı bulunmaktadır (Çınar ve Tozun, 2020). Ham derinin yapısı su (%64), yağ (%2), yapısal proteinler (%29 kolajen, %2 keratin, %0.3 elastin), yapısal olmayan proteinler (%1 albumin, globulin, %0.7 musin, mukoid) ve mineral tuzlardan (%0.5) oluşmaktadır (Polkade, 2007). Derinin yapısında bulunan su, mineral madde, karbonhidrat ve yağ gibi bileşenlerin çoğu derinin işlenti basamaklarında uzaklaştırılmaktadır (Polkade, 2007).

Yapılan bir çalışmada tuzlanmış derilerin bileşiminin %43 su, %40 post/deri, %4 yağ ve %13 kül olarak saptanmıştır (Santos ve ark., 2016). Bir diğer yapılan çalışmada ise derinin %33 protein, %64 su, %0.5 mineral tuz, %2 yağ ve %0.5 pigmentten oluştuğu saptanmıştır (Hien, 2006). Bu maddelerin yüzdesi derinin türü, hayvanın ırkı, hayvanın yaşı ve beslenme koşullarına ve yaşadığı coğrafyanın iklimine göre değişiklik göstermektedir (Polkade, 2007).

1.2. Tuzun Önemi

Tuz, insanlık tarihi için çok önemli bir mineraldir. Tuz, insanlar tarafından keşfedildikten kısa bir süre sonra kullanılmaya başlanmış ve önemi giderek artmıştır. Bu değerli mineral zamanla dini, sosyal ve siyasi alanlarda toplumu etkilemeye başlamış ve statü aracı haline gelmiştir. İlk keşfedildiğinde çeşitli gıda maddelerine lezzet vermek ve gıdaların uzun süreli muhafazasını sağlamak için kullanılan tuz zamanla sanayide de yer edinmiştir (Avcı, 2003). İlk insanlar tuz kaynağının içerisinde bulunan ölmüş hayvanların yapısının uzun süre bozulmadığını fark etmişlerdir. Zamanla tuz gıdaların ve çeşitli maddelerin muhafazası için kullanmaya başlanmıştır. Tuz yapısında birçok minerali bulundurduğu için çok önemlidir ve çeşitli sektörlerde zamanla kullanımı artmıştır. Özellikle kimya endüstrisinde, kışın buzlanmış karayollarında, gastronomide gıdalara lezzet verme ve korumada, ekmek yapımında sıklıkla kullanılmaktadır. İnsan sağlığı açısından tuz tüketimine baktığımızda yetişkin bir insanın günlük tüketmesi gereken tuz miktarı 150 µg/kg, gebe bireyler için ise 250 µg/kg olarak bildirilmiştir (Demirkol ve ark., 2018). Aseptik bir yapıya sahip olan tuz çeşitli gıda maddelerine eklendiğinde gıdaya nüfuz ederek gıdadaki suyun ozmotik olarak çekilmesini sağlamaktadır. Böylelikle günlük olarak tüketilen pek çok gıdada bozulmaya sebep olan çeşitli patojenlerin enzimatik aktivitesinin durmasını sağlayarak gıdaların mikroorganizmalarla kontamine olmasını engelleyerek gıdaların raf ömrünü uzatmaktadır (Demirkol ve ark., 2018). Ayrıca tuz paketlenmiş gıdalarda stabilizör görevi görerek ürünün paket içerisinde dağılmasını önlemektedir. Özellikle sebzeler %14 ve %16 oranında tuz ile salamura edildiğinde mayalanma minimum değerlere inerek uzun süreli muhafazası sağlanmaktadır. Bu tarzdaki gıdalara ‘turşu’ örnek verilebilir (Demirkol ve ark., 2018). Özetle tuz birçok kültürde balık, et, sebze gibi ürünleri korumada, dericilikte ham derilerin saklanması için kullanılmıştır (Ventosa ve Nieto, 1995). Tuz tarihte para kadar önemli ve değerli olmuştur. İngilizcede kullanılan “maaş” anlamına gelen “salary” kelimesi köken olarak Latince ‘salarium’ kelimesinden gelmektedir (Avcı, 2003; Albarracín ve ark., 2011).

Tuz aynı zamanda Roma'da askerlere ve işçilere maaş olarak verilmektedir. Orta Çağ'da tuz büyük saygı getiren bir madde olarak görülmekteydi. Bugün bile bazı toplumlarda tuz bir ödeme aracı olarak hâlâ kullanılmaktadır. Etiyopya'da 5 kg'lık tuz paketleri para yerine ticarete kullanılabilir (Avcı, 2003). Meksika-Guetamala sınırlarında yaşayan Lacandon kabilesinin palmyenin çiçekleri ve meyvelerine yakma işlemi uygulayarak tuz elde ettikleri ve bu tuzu para olarak kullandıkları belirtilmektedir (Demirkol ve ark., 2018). Tuz günlük olarak çok fazla tüketildiği için uluslararası ticarete de çok önemli bir yer edinmiştir. Mayalarda, Çin'de, Yunanistan'da ve Roma'da tuz üzerinden vergi alınarak ülke ekonomisi için bir gelir kaynağı haline gelmiştir. Bu durum zamanla diğer devletlerde de uygulamaya konmuştur ve ortak bir politika haline gelmiştir. Geleneksel tuzlama yöntemi, ham materyalin tuz ile üzerinin tamamen kaplanması ya da ovulmasıyla gerçekleşmektedir. Bu aşamada tuz uygulanan işlemler esnasında çözünerek tuzlanan ürünlerden (et, balık, sebze, hayvan postu/derisi) sıvı atık şeklinde uzaklaştırılmaktadır. Çalışmamızın konusunu oluşturan tuzlama işleminde temel amaç bir sonraki aşamaya kadar (kurutma, pişirme, tütsüleme) ham maddenin muhafazasını sağlamak ve kontaminasyonunu önlemektir (Avcı, 2003; Albarracín ve ark., 2011).

1.3. Tuzun Kullanım Alanları

İlk keşfedildiği zaman derilerin korunması, gıdaların muhafazası, hayvanların beslenmesi (yem) gibi amaçlarla kullanılan tuz zamanla üretim araçlarının ve teknolojinin gelişimi ile birlikte özellikle kimya sanayisinde önemli bir yer edinmeye başlamıştır. İleri sanayileşmiş ülkelerde tuz tüketiminin %60-70'lik bir kısmını kimya endüstrisi oluşturmaktadır. 1970 yılı verileri incelendiğinde; Türkiye'de kişi başına düşen tüketilen tuz miktarı 18 kg iken, sanayileşmiş ülkelerde bu oran 100-200 kg olarak tespit edilmiştir (Ayaz, 2008). Tuzun birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Örneğin; gıda endüstrisinde; ekmek yapımında, yemeklere lezzet vermede, tarım alanında; ağaç bakımında, yabancı otları imha etmede, hayvansal yem olarak, tıp alanında; enjeksiyonda ve kompres yapmada, trafikte; karayolları ve demiryollarındaki buzla mücadele etmede, konservecilikte et ve balık gibi ürünlerin uzun süreli muhafazasında, tereyağı, peynir yapımı gibi mandıracılık ürünlerinde, gübre yapımında, deri sektöründe, kozmetik alanında, çeliğe sertlik vermede ve tekstilde olmak üzere birçok sektörde önemli bir yere sahiptir (Ergin, 1988).

Tuz kimya biliminde NaCl (sodyum klorür) sembolü ile gösterilmektedir. Saf hâlde bulunan tuz sodyum (%40) ve klordan (%60) oluşmaktadır. Moleküler ağırlıklarına bakıldığında klorun 35.5, sodyumun ise 23'tür. Sodyum klorür bileşiğinin özgül ağırlığı yaklaşık 2.1-235 gr/cm³, sertliği 25, erime noktası 800.8°C olarak belirlenmiştir. Doğada tuzun rengi kırmızı, sarı, gri hatta mavi olabilmektedir ancak saf halde bulunan tuz renksizdir (Ergin, 1988). Ekonomik olarak katı ve sıvı kaynaklar olarak sınıflandırılabilen birçok tuz kaynağı bulunmaktadır. Sıvı kaynaklara denizler ve tuzlu göller katı kaynaklara ise kaya tuzları örnek verilebilir. Özellikle denizler en büyük tuz rezervleridir. Denizlerin tuzluluk durumları coğrafik koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin; Baltık Denizi'nde tuz miktarı (m³) 17 kg iken Kızıldeniz'de 45 kg'dır (Ergin, 1988; Avcı, 2003). Yeraltında katı hâlde bulunan tuza 'kaya tuzu' denilmektedir. Deniz ya da kapalı havzalardaki buharlaşmalar sonucu oluşan kaya tuzları deniz tuzuyla kıyaslandığında kompozisyonu ve saflık oranları oldukça değişkenlik göstermektedir. Ülkemizdeki kaya tuzu madenlerinin oranı %5-10 olarak bildirilmiştir (Ergin, 1988; Albarracín ve ark., 2011). Bu kaya tuzlarının bazıları yemeklere katılmayacak kadar büyük safsızlıklar içermektedir. Ham tuzun sanayi kollarındaki tüketim yüzdeleri ise gıda sanayi %7.23, süt ürünleri sanayi %9.21, et ve balıkçılıkta %2.92, kimya sanayi %44.08, yağ sanayi %1.21, deri sanayi %9.6, deterjan ve sabun yapımında %5.26, kağıt sanayi %5.54, tekstil %7.76, seramik ve cam %0.9, soğutmacılık %0.12, lastik ve kauçuk %0.29 olarak bildirilmiştir (Avcı, 2003). Tuz sağlık sektörü için de çok önemli bir yere sahiptir. İnsan sağlığı için günlük olarak tuz tüketimi gereklidir. İnsan vücudu karbonhidrat, yağ, protein ve su ile birlikte potasyum, klor, sodyum, kalsiyum gibi çeşitli iyonları da bulundurmaktadır. Bu iyonların vücuttaki homeostaziye yani kararlı iç dengeyi sağlaması için belli değerlerde bulunması gerekmektedir ve bu iyon dengesi bozulursa çeşitli metabolik rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir (Demirkol ve ark., 2018). Tuz eğer gereğinden fazla tüketilirse de çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir. Tuzu çok fazla tükettiğimizde su içme ihtiyacımız artmakta ve daha sonra bu tuz idrar, ter gibi farklı yollarla dışarı atılmaktadır. Böbreklerde sorun yaşayan bireylerde ise fazla tuz dışarı atılamadığından kandaki miktarı çok yükselmekte ve vücudun belli bölgelerinde "ödem" denilen şişkinlikler meydana gelmektedir (Ayaz, 2008). Tuz her ne kadar önemli bir mineral olsa da bazı durumlarda zehir bazı durumlarda ise panzehir olabildiğinden ötürü dikkatlice ve yerinde kullanılması gerekmektedir.

1.4. Tuzun Mikrobiyolojik Etkisi

Tuz, mikroorganizmaların üremesi için gerekli olan su aktivitesi değerini (a_w) düşürerek koruyucu görevi görmektedir (Durack ve ark., 2008). Su aktivitesi (a_w) mikrobiyal gelişim ve metabolizma açısından önemlidir. Her bir mikrobiyal tür altındaki değerlerde gelişemeyeceği minimum bir a_w değerine sahiptir. A_w değerleri 0.950'ten büyük ve çabuk bozulabilir gıdalar olan et, balık, süt ve ekmek %4 sukroz veya %7 NaCl içerdikleri için *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Bacillus*, *Clostridium perfringens* ve bazı maya türleri gibi çeşitli mikroorganizmaları barındırır (Durack ve ark., 2008). Bazı peynirler (a_w değeri 0.910), kürlenmiş etler, meyve suyu konsantreleri, fermente salamalar, margarin gibi gıdalar %65 sukroz ve %15 NaCl içerdikleri için *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula* gibi bazı mayaların gelişmesi için bir ortam oluşturmakta ve gıdalarda bozulmaya sebep olmaktadır (Albarracín ve ark., 2011). Tuz mikrobiyal büyümeyi plazmolizle veya hücreden su kaybıyla gerçekleştirmektedir. Tuz ilavesi ile birlikte gıdalarda a_w değeri düşürüldüğünde bakteri hücreleri ozmotik şok yaşar ve plazmolize uğrar, bu durum hücrelerde büyümenin durmasına, ölüme veya dormant faza girmesine yol açmaktadır. Büyümenin devam edebilmesi ve eski haline dönebilmesi için a_w değerinin hücrelerin iyileşmesine izin veren değerlere geri dönmesi gerekmektedir (Durack ve ark., 2008). Kaybedilen turgoru geri kazanmak için mikrobiyal hücreler uyumlu çözünen maddeleri sitoplazmalarında biriktirerek a_w değerini arttırmaktadır. Uyumlu çözünen maddeler (biyoyumlu moleküller) şekerler dâhil olmak üzere alfa ve beta amino asitleri içeren yüksek oranda çözünen, küçük organik moleküllerdir. Bu moleküller yüksek oranlarda bulunsalar bile metabolizmaya müdahale etmemektedir (Oren, 2010). Tuzun mikroorganizmalar üzerindeki etkisi hem iç hem de dış faktörlere bağlıdır. Yapılan bir çalışmada rendelenmiş havucun içine %3.6'lık bir tuz eklenmesiyle a_w değeri 0.84'e düşerek mikrobiyal gelişmenin önlediği ve bu durumun kabul edilebilir tat durumunu etkilemediği ancak %4 tuz eklediklerinde gıdada aşırı tuzlu bir tat gelişmesine ve gıdanın tekstürünün bozulmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Vıbhakara ve ark., 2006). Aslında her mikroorganizmanın tuza tepkisi farklıdır. Örneğin; yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*'nin %0.036'lık tuz konsantrasyonundan %0.018'lik (lümende) konsantrasyonlarına kadar yaşayabildiği yapılan bir çalışmada raporlanmıştır (McClure, 2005). *Listeria* üzerine yapılan çalışmalarda bazı suşlarının %10 (w/v) NaCl içeren Kompleks Besiyerinde üreyebildiği, bazı suşlarının %20 (w/v) NaCl konsantrasyonlarını tolere edebildiği hatta %16 NaCl konsantrasyonunda pH 6'da 1 yıl sonra bile canlı kalabildiği bildirilmiştir (Durack ve ark., 2008).

Bacillus cereus suşunun incelendiği bir çalışmada bu suşun %0.5-10.5 NaCl aralığı, 10-30°C depolama koşulu, %10-80 karbondioksit varlığı ve 4.5-7.0 pH'da büyüme tepkileri araştırılarak gıdalarda kontaminasyona sebep olma durumları hakkında gerçekçi tahminler yürütülebileceği belirtilmiştir (Sutherland ve ark., 1996). *B. cereus* suşunun et ürünlerine (%3 ilave tuz içeren) inoküle edildiği bir çalışmada ise 18 saat 28°C'de depolandıktan sonra 2 logaritmik birim gelişebildiği bildirilmiştir (Durack ve ark., 2008). Bu durum *B. cereus* suşunun yüksek tuz konsantrasyonunda ya da fiziksel herhangi bir stres koşulunda çapraz koruma mekanizmasını kullanarak gerçekleşmektedir. Çapraz koruma bakteriyel hücrelerin çeşitli fiziksel ve kimyasal stres koşullarına adapte olma ihtiyacı hissettiği zaman meydana gelmektedir. Bu süreç daha sonra protein sentezini tetikleyerek yüksek veya düşük sıcaklık, basınç, yüksek veya çok düşük pH, şeker ya da tuz gibi yüksek çözünenlerden kaynaklanan ozmolarite gibi çeşitli stres koşullarına karşı bakteriyel hücreleri korumaktadır (Albarracín ve ark., 2011). Yüksek tuz konsantrasyonları birçok mikroorganizma için ölümcül etkiye sebep olmasına rağmen bazı mikroorganizmalar için tuz ölümcül etki yaratmaz. Bu mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında bile hayatta kalabilir ve bu ekstrem koşullara adapte olmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bu tuz seven organizmalar 'halofil' olarak adlandırılmaktadır ve tolere edebildikleri tuz konsantrasyonlarına göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır (Imhoff, 1986; De La Haba ve ark., 2011).

1.5. Halofilik Mikroorganizmalar

Mikrobiyal yaşam çok çeşitli ekstrem ortam koşullarından (tuzluluk, basınç, oksijen, pH değişimleri, ışık yoğunluğu, sıcaklık) oluşmaktadır. Ekstrem çevreler yüksek tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, düşük oksijen ve bazı durumlarda yüksek pH değerlerinde bulunan çevreleri ifade etmek için kullanılmaktadır. Bunlar arasında hipersalin çevreler yüksek tuzluluğun olduğu ortamlardır (De La Haba ve ark., 2011; De Lourdes Moreno ve ark., 2013; Akpolat ve ark., 2015; Caglayan ve ark., 2015; Caglayan ve ark., 2017). Arkeler ve bakteriler bu çevrelerde geniş bir şekilde yayılmış organizmalardır. Yaşam alanları tuzcul ortamlar olan halofiller, yüksek tuzlulukta yaşayabilen 'tuzu seven' organizmalar olarak dünyada geniş bir çeşitlilikte yer almaktadırlar. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuzlu topraklarda, tuzlanmış balık ve etlerde, fermente gıdalarda, okyanuslarda, kaplıca sularında, tuzlanmış derilerde ve tuz üretim tesislerinde olmak üzere birçok alanda bulunmaktadır (Ventosa ve Nieto, 1995; Kushner ve Kamekura, 1988; Satyanarayana ve ark., 2005; De La Haba ve ark., 2011; Horikoshi ve Antranikian, 2011; Dutta ve Bandopadhyay, 2022).

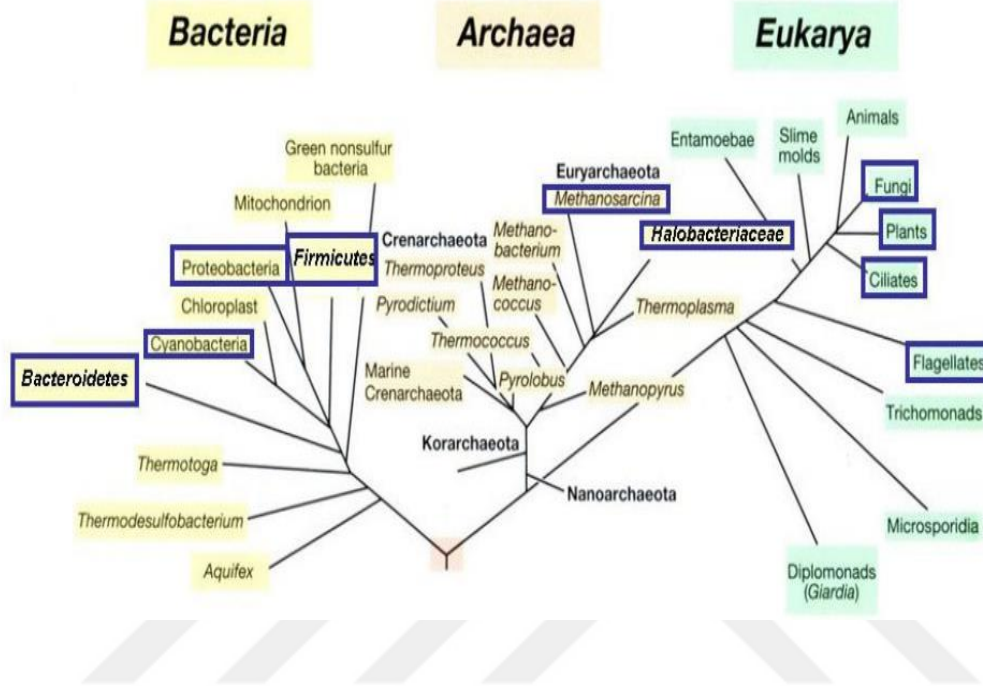
Halofil mikroorganizmaların hepsi aynı tuz konsantrasyonunda yaşayamazlar. Halofil mikroorganizmalar optimum geliştiklerileri tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Zayıf halofiller 0.2-0.5 M (%1-3), ılımlı halofiller 0.5-2.5 M (%3-15), aşırı halofiller 2.5-5.2 M (%15-30), optimum olarak %1 (w/v)'den daha az tuz içeren koşullarda yaşayan mikroorganizmalar halofilik olmayan türler, tuzun varlığında da yokluğunda da yaşayabilen türler ise halotolerant olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Halofilik Mikroorganizmaların Optimum Geliştiği Tuz Konsantrasyonları (Kushner ve Kamekura, 1988).

Tuz ihtiyacına göre halofiller	Optimum NaCl (w/v)	Optimum NaCl (M)
Ekstrem halofil	%15-30	2.5-5.2 M
İlımlı halofil	%3-15	0.5-2.5 M
Zayıf halofil	%1-3	0.2-0.5 M
Halofil olmayanlar	%1'den az	< 0.2 M
Halotolerantlar	Tuz varlığında da yokluğunda da yaşarlar	
Ekstrem halotolerantlar	Halotolerant mikroorganizmaların yüksek NaCl konsantrasyonlarını tolere edebilenleri (2.5 M ve yukarısı)	

Yeryüzünde bulunan canlılar, ribozomal RNA'daki (rRNA) nükleotit dizilimleri göz önünde bulundurularak *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olarak 3 Domainde sınıflandırmaktadır (Woese ve ark., 1990; De La Haba ve ark., 2011). Canlılardaki bu domainler hücre duvarlarındaki yapısal farklılıklar, protein sentez mekanizmaları, RNA polimeraz enzimleri ve diğer farklılıklar dikkate alınarak birbirinden ayırt edilmiştir. Halofil mikroorganizmalar *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olarak 3 Domainde de bulunmasına rağmen filogenetik ağaca bakıldığında daha çok bakteri ve arke âlemine ait türler yoğunluktadır. *Bacteria* ve *Archaea* âlemlerinde bulunan türler sadece prokaryotlardan oluşmaktadır ve halofil mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bu iki âlemde yer almaktadır. *Bacteria* domaininde bulunan halofilik türler *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacterioidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* filumlarında bulunmaktadır (De La Haba ve ark., 2011).

rRNA'daki nükleotit dizileri dikkate alınarak oluşturulmuş olan filogenetik ağaçtaki halofil mikroorganizmaların dağılımları (mavi kutu içine alınmış) gösterilmiştir (Kushner ve Kamekura, 1988; Satyanarayana ve ark., 2005; De La Haba ve ark., 2011) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Filogenetik Ağaçta Halofilik Mikroorganizmaların Dağılımı (Oren, 2008, s. 3).

Birkaç dikkate değer istisna dışında halofiller içerisinde *Eukarya* domaini ihmal edilen bir grubu oluşturmaktadır. Ökaryotik halofillerin de yüksek tuzlu ortamlardaki dağılımları ve yüksek tuz koşullarına adaptasyon yetenekleri mevcuttur. Örneğin; *Dunaliella salina* tuz göllerinde ve tuz buharlaştırma havuzları gibi ortamlarda bulunan tek hücreli yeşil alg türüdür ve derinlemesine araştırılmıştır (Oren, 2008). Birçok hipersalin ortamda ana veya tek üretici oldukları için popüler model organizmalar olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca uyumlu çözünen maddelerini kullanarak çeşitli tuz çevrelerine adaptasyon mekanizmaları sayesinde biyoteknolojik uygulamalar için de umut vericidir. Buna ek olarak salamura oluşumunda tuzcul göllerde yaşayan karidesler de (*Artemia salina*, *Artemia franciscana*) biyoteknolojik önemleri açısından çok fazla araştırılmaktadır (Oren, 2008; Ali ve ark., 2016).

Halofil mikroorganizma araştırmalarında ihmal edilen bir diğerk grup da mantarlardır. Hem yüksek tuza olan gereksinimleri hem de gelişme yetenekleri açısından incelenmiş birkaç türle temsil edilmektedirler. Örneğın; siyah maya *Hortaea werneckii* ve *Trimmatostroma salinum* tuzlu sulara ve bazı aşırı tuzlu ortamlara özgü türlerdir (Özgök ve İlhan, 2020). Siyah maya benzeri bir mantar olan *Aureobasidium pullulans* 3 M NaCl varlığında optimum gelişen bir diğerk örnektir ve pullulan üretimi açısından önemli bir türdür. *Wallemia* cinsindeki mantarlardan biri olan *Wallemia ichthyophaga*, şimdiye kadar sınırlı sayıda tuzcul ortamlardan izole edilmiştir ve büyümesi için 1.5 M NaCl varlığına ihtiyaç duymaktadır ki bu özelliğı de onu en halofil mantar türü yapmaktadır (Galinski ve ark., 2010). Halofil mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanabilmek için çeşitli adaptasyon şekilleri vardır. Tüm halofil mikroorganizmalarda temel strateji sitoplazmalarının onları çevreleyen ortama göre izoozmotik olmasıdır. Halofil mikroorganizmalarının çevreleriyle sitoplazmalarını ozmotik olarak dengede tutmak için iki temel mekanizması bulunmaktadır. İlk mekanizma potasyum ve klorun molar konsantrasyonlarının birikimidir ve bu strateji kapsamlı bir adaptasyon gerektirir çünkü hücre içi enzimatik aktiviteler ve proteinler doygunluğık yakın tuz konsantrasyonlarında yapılarını ve aktivitelerini korumalıdır (Oren, 2008). Bu tür mikroorganizmaların proteomu yüksek oranda asidiktir ve proteinler tuz konsantrasyonları düşük olduğunda denatürasyona uğramaktadır. Bu tarz ‘yüksek tuz oranı stratejisini’ kullanan mikroorganizmalar düşük tuzlu ortamlarda yaşayamaz. Bu yüksek tuz oranı stratejisi hücre için büyük miktarlarda organik çözünenk maddelerin biriktirilmesinden daha az maliyetli olsa da bu strateji çok fazla kullanılmamaktadır. Bu stratejinin en iyi bilinen örneklerine son derece halofil arkelerde rastlanmaktadır. *Halobacterium salinarum* ve *Haloarcula marismortui* en popüler model organizmalar arasındadır ve yüksek hücre içi KCl konsantrasyonlarının korunmasının hücrelerin ömür uzunluğıkna etkileri üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur (Imhoff, 1986). *Halobacteriaceae*’nin biyolojisi hakkındaki bilgiler *Halobacterium* NRC-1, *Haloarcula morismortui*, *Nitrosomonas halophila*, *Halquadratum walsbyi*’nin genom sekanslarının çıkarılmasıyla daha da artmıştır (Baliga ve ark., 2004; Falb ve ark., 2005). Doğada yaygın olan ikinci temel strateji ise organik ozmotik çözünenklerin biyosenteziyle veya biriktirilmesiyle gerçekleştirilen haloadaptasyondur. Bu stratejiyi kullanan hücreler normal enzimatik aktiviteye büyük ölçükde müdahale etmedikleri için fazla tuzu sitoplazmalarından mümkün olduğunca uzaklaştırırlar (Oren, 2010).

Halofil mikroorganizmalarda (prokaryot ve ökaryot) ozmotik çözünen listesi oldukça geniştir. En uyumlu çözünen maddeler amino asitler ve amino asit türevleri, şekerler veya şeker alkollere dayalıdır. Çoğu yüksüzdür veya zwitteriyoniktir (hem pozitif hem negatif yük taşıyan iyon) (Roberts, 2005). Halofil mikroorganizmaların tüm grupları organik uyumlu çözünen maddelerinin oluşumu ve dağılımı açısından henüz incelenmemiştir. Örneğin; son zamanlarda karakterize edilmiş olan aşırı derecede halofil kamçılı protozoa'nın hücre içi uyumlu çözünen maddelerinin ve bunların konsantrasyonları hakkında henüz bir bilgi mevcut değildir. Fakat bununla birlikte diğer pek çok halofilik mikroorganizmaların uyumlu çözünen maddelerinin çoğu aydınlatılmıştır. Gliserol ve diğer polioller halofilik ökaryotik alg ve halofilik mantarlarda ozmotik adaptasyonda çok fazla kullanılır ancak prokaryotlarda nadiren kullanılmaktadır. *Pseudomonas putida*'da mannitol bulunması bu durumun istisnalarından biridir (Park ve ark., 2007). Halofil ve halotolerant prokaryotlardaki organik ozmotik çözünen maddelerin oluşumu genellikle filogenetik yaşam ağacındaki konumlarıyla ilişkilidir. En geniş organik çözünen maddelerin varlığı *Bacteria* âleminde tespit edilmiştir. Ortamdaki tuz konsantrasyonlarına göre düzenlenebilen ozmotik çözünen madde kullanımı mikroorganizmalara büyük bir esneklik derecesi verir ve çeşitli tuz konsantrasyonlarına adaptasyon yeteneği sağlar (Shivanand ve Mugeraya, 2011).

1.5.1. Zayıf Halofil Bakterilerle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Zayıf halofil bakteriler %1-3 NaCl (0.2-0.5 M) konsantrasyonunda optimum gelişen bakteri grubunu oluşturmaktadır ve diğer halofil bakterilere oranla daha düşük tuzlulukta optimum gelişme göstermektedir (Ventosa, 2006; Oren, 2008). Zayıf halofil bakterilerle ilgili çok fazla çalışma olmamasına rağmen daha önce zayıf halofil bakterilerin çeşitli tuzcul ortamlardan izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada Kore'nin geleneksel tuzlanmış fermente ürünü olan Jeotgal'dan zayıf halofil bakteri suşu *Cobetia crustatorum* izole edilmiştir. Gram negatif olduğu, 25°C sıcaklıkta, %6.5 NaCl konsantrasyonunda ve pH 5-6'da optimum gelişim gösterdiği saptanmıştır. Oksidaz negatif, katalaz pozitif olduğu, karbon ve nitrojen kaynakları olarak birçok şeker ve amino asidi kullanabildiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada Kolombiya'da bulunan And Dağları'ndan alınan tuzlu su örneklerinden *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir. Sıcaklık olarak 30°C'de (gelişim aralığı 20-40°C), pH 7.3'te (gelişim aralığı pH 5.5-8.5), %2 tuz (gelişim aralığı %0.1-7) koşulunda optimum gelişim gösterebildiği bildirilmiştir (Díaz-Cárdenas ve ark., 2010).

Araştırmacılar Tayland'ta çok fazla tüketilen geleneksel tuzlu karides ezmesinden Gram pozitif, zorunlu aerobik *Bacillus salaceticus* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşunu izole etmişlerdir. pH 6-9 aralığından optimum pH 7.5'te, 20-40°C sıcaklık aralığından optimum 37 °C'de, %0-15 NaCl (w/v) konsantrasyon aralığından optimum %1-3 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği belirtilmiştir. 16S rRNA gen sekans analizi bazında bakıldığında bu suşun *Bacillus* cinsine ait olduğu ve *Bacillus vietnamensis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus aquimaris*, *Bacillus oryzaecorticis* ile sırasıyla %98.7, %97.9, %97.8, %97.8 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Daroonpant ve ark., 2019). Kore'de yapılan bir çalışmada Kore sınırları içinde yer alan Doğu Denizi'nden izole edilen Gram pozitif, hareketli, sarı renk pigmentine sahip iki zayıf halofil bakteri suşu (SW-46T ve SW-52) incelenmiştir. Bu suşlar 16S rRNA dizilerinde 1 bp fark ve %94.4'lük bir ortalama ile DNA-DNA seviyesinde bir akrabalık göstermiştir. 16S rRNA dizisine bağlı filogenetik analizlerinde SW-46T ve SW-52 suşlarının *Proteobacteria* 'nın α -alt sınıfında yer aldığı ve *Erythrobacter longus*, *Erythrobacter litoralis* ve *Erythrobacter citreus* ile tutarlı bir benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. 10-42°C sıcaklıkta, 6.5-7.5 pH aralığında ve %2-5 (w/v) NaCl konsantrasyonunda optimum geliştiği bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2003). Bir başka çalışmada tuzlu toprak örneklerinden MX6T zayıf halofil bakteri suşu izole edilerek tanımlanmıştır ve suşun Gram-pozitif, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif özelliklere sahip bir bakteri olduğu vurgulanmıştır. Optimum büyüme koşulları 35°C, %3 NaCl konsantrasyonu ve pH 7-7.5 olarak bildirilmiştir. MX6T suşu 16S rRNA gen dizisine dayalı filogenetik sonuçlara dayanarak *Firmicutes* şubesinde *Planococcaceae* familyasında ve *Planomicrobium* cinsi ile yüksek benzerlik gösterdiği saptanmıştır. En yüksek benzerliği ise *Planomicrobium flavidum* (%98.2) ile göstermiştir (Ramezani ve ark., 2019). Derin deniz sedimentinden izole edilen *Bacillus oceani* sp. nov., suşunun optimum büyüme koşulları %0-10 NaCl, pH 5-11, 20-40°C olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif olduğu, Tween 20, 40 ve 80'i hidroliz edebildiği, nişasta, selüloz, kazein ve jelatini hidrolize edemediği belirtilmiştir. Genomik DNA'da G+C içeriği (Guanin-Sitozin) %38 olarak saptanmıştır. 16S rRNA gen dizi analizi bu suşun *Bacillus carboniphilus* JCM 9731T (%94.5) ve *Bacillus endophyticus* 2DTT (%94.3) ile yüksek benzerlik göstermiştir (Liu ve ark., 2013).

Bir araştırmada deniz suyu örneklerinden *Roseovarius aquimarinus* sp. nov., (CAU 1059T) zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir. Bu suş 37°C, pH 7’de ve %2 (w/v) NaCl varlığında optimum gelişim göstermiştir. 16S rRNA gen dizisine dayanan filogenetik analizleri sonucu *Roseovarius* cinsine ait olduğu bildirilmiştir (Kang ve ark., 2015). Bir diğerk çalışmada Çin’de tuzlu-alkali toprak örneklerinden Gram-negatif *Halomonas zhaodongensis* zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir. Optimum %3’lük NaCl konsantrasyonunda, 35°C ve pH 9’da gelişim gösterdiği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada derin deniz sediment örneğinden pizotolerant, PVS21T zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir. Gram negatif, anerobik, oksidaz ve katalaz pozitif olduğu belirtilmiştir. 37°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3-4 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiği bildirilmiştir. 16S rRNA gen dizi analizi PWS21T suşunun *Marinobacter guineae* ve *Marinobacter lipolyticus* ile sırasıyla %98.4 ve %98.2 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Cao ve ark., 2019). Kore’de gelgit denizinden *Alteromonas litorea* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir. Optimum gelişme koşulları 30-37°C, %2-5 (w/v) NaCl olarak bildirilmiştir. Katalaz pozitif olduğu ve kazeini hidrolize edebildiği saptanmıştır (Yoon ve ark., 2004). Detaylıca yaptığımız literatür taramasında tuzlanmış koyun derilerinden zayıf halofil bakterilerin izole edildiği çalışmaya rastlanmasa da halofilik bakteri ve arkelerin tuzlanmış post/derilerden izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bir araştırmada 13 adet ılımlı halofil bakteri suşu tuzlanmış deri örneklerinden izole edilerek moleküler olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların *Alkalibacillus*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Chromohalobacter*, *Salimicrobium*, *Marinococcus*, *Halomonas* cinslerine ait olduğu saptanmıştır. İzolatların fenotipik ve moleküler analizleri yapılmıştır. Bu ılımlı halofil bakteri izolatlarının yağ, protein, DNA gibi makromolekülleri parçalamak için çeşitli biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilen enzimlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle yüksek kalitede deri elde etmek için derilerin muhafazasında kullanılan tuzdaki ılımlı halofil bakterilerin kontrol edilmesi ve inaktive edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Caglayan ve ark., 2015). Bir başka çalışmada kırmızı ve sarı renklenmeler içeren tuzlanmış deri örneklerinden ılımlı halofilik bakteri ve aşırı halofilik arkelerin izole edildiği bildirilmiştir (Akpolat ve ark., 2015). İspanya’dan temin edilen bozulmuş ve depolanmış deri örnekleri incelenmiş ve moleküler metotlarla 16S rRNA gen sekans analizlerine göre tanımlamaları yapılmıştır. İlimli halofil bakteri sayısı 10^5 - 10^8 CFU/g, aşırı halofil bakteri sayısı 10^5 - 10^7 CFU/g olarak tespit edilmiştir (Akpolat ve ark., 2015).

Araştırmacılar 16S rRNA gen dizisi analizlerine göre kırmızı ve sarı renklenmeler içeren tuzlanmış koyun derilerinden *Salimicrobium salexigens*, *Acinetobacter johnsonii*, *Staphylococcus equorum*, *Alkalibacillus salilacus*, *Marinococcus luteus*, *Pseudomonas halophila*, *Alkalibacillus halophilus* ılımlı halofilik bakterileri ve *Halococcus dombrowskii*, *Halorubrum tebenquichense*, *Halostagnicola larsenii*, *Halorubrum lipolyticum*, *Halococcus qingdaonensis*, *Halococcus morrhuae*, *Halorubrum kocurii*, *Halorubrum terrestre*, *Halorubrum saccharovorum*, *Natrinema versiforme*, *Natrinema pellirubrum* aşırı halofilik arkeleri izole ettiklerini bildirmişlerdir (Akpolat ve ark., 2015). Ayrıca *Alkalibacillus halophilus* ve *Halorubrum tebenquichense* suşlarının bu derilerde en fazla bulunan türler olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak derilerin korunmasında kullanılan tuzun proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olan ılımlı halofilik bakterileri ve aşırı halofilik arkeleri barındırabileceği bildirilmiştir. Tuzlama metodu ile birlikte bazı antimikrobiyal maddelerin de derilerin korunmasında kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (Galinski ve ark., 2010; Akpolat ve ark., 2015). Tüm bu literatür çalışmalarına bakıldığında tuzlanmış deri örneklerinden ılımlı halofilik bakterilerin ve aşırı halofilik arkelerin tanımlandığı çalışmalara rastlanmasına rağmen daha önce tuzlanmış ve depolanmış koyun derisi örneklerinden zayıf halofil bakterilerin izole edilip moleküler tanımlamasının yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu kapsamda ilk yapılmış çalışma niteliği taşımaktadır.

1.5.2. Halofilik Mikroorganizmaların Tuza Adaptasyon Mekanizması

Bir hücre yüksek tuz içeren bir ortamda bulunduğu zaman içindeki su dış ortama hareket ederek hücre hacminde bir azalmaya sebep olur ve bu durum çok büyük olduğunda hücrenin dormant faza girmesine veya o hücrenin ölmesine sebep olur (Daoud ve Ben Ali, 2020). Diğer yandan hücre çok düşük ozmolariteye sahip bir ortamdaysa su akışı ters yönde olacak ve hücrenin turgor durumuna geçmesine ve hatta zar elastikiyet sınırı aşılsa hücrenin parçalanmasına neden olacaktır. Bu gibi durumlardan kaçabilmek için hücre her zaman sitoplazmik ozmotik basıncını çevresine göre ayarlamaktadır. Hipersalin ortamlardaki iyonik bileşim suyun buharlaşması yoluyla veya iyonların dibe çökmesi gibi durumlar sebebiyle zamanla değişmektedir. Bu ani değişimler mikroorganizmaları bu yeni durumlara uyum sağlamaya zorlamaktadır. Hücrenin bu iç basıncı kontrol etmesine izin veren mekanizmalara ‘ozmoregülasyon’ denir (Shivanand ve Mugeraya, 2011; Yin ve ark., 2015).

Bazı durumlarda da bir bakterinin hipersalin ortamlarda gelişme yeteneği esas olarak hücrenin dayanıklılığını sağlayan ve koruyan peptidoglikan tabakasının kalınlığı ile tanınan zarlarının gücünün bir fonksiyonudur. Temel olarak ozmotik şokları önleyen iki farklı strateji vardır. Bunlardan ilki iyon pompaları aracılığıyla zar boyunca iyon taşınması, ikincisi ise hücrede uyumlu ozmotik çözünen maddelerin birikimidir (Mokashe ve ark., 2018; Daoud ve Ben Ali, 2020). İyon pompaları ile zardan iyon taşınması mekanizmasında (salt-in stratejisi) sitoplazmada inorganik tuzların birikimi söz konusudur (sodyum, klor, potasyum). Bu, zardan sitoplazmaya katyon akışını içerir (Şekil 1.2) (Daoud ve Ben Ali, 2020).

Şekil 1.2. İyon Pompaları ile Zardan İyon Taşınma Mekanizmasının Şematik Gösterimi
(Mokashe ve ark., 2018, s. 496).

İyon pompaları ile zardan iyon taşınması stratejisinde (salt-in strateji) tuza adapte olmuş enzimler daha az esnektir ve değişen koşullara uyurlanabilir durumdadır (Mokashe ve ark., 2018).

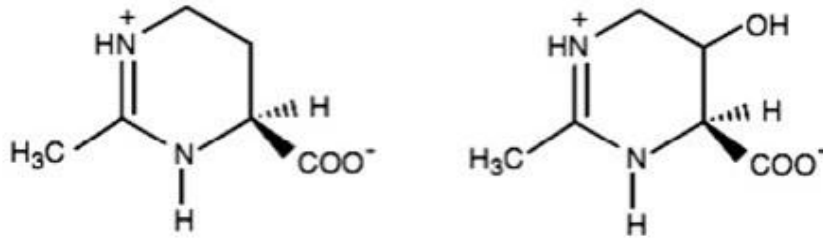
İkinci mekanizma ise uyumlu ozmotik çözünen madde birikim stratejisidir. Bu adaptif mekanizma ozmotik basıncı dengelemek amacıyla tuzları mümkün olduğunca sitoplazmadan hariç tutarken hücrede küçük moleküler ağırlıklı organik çözünen maddeleri biriktirir. Bu moleküler ağırlığı küçük olan organik ozmotik çözünen aktif moleküller ‘uyumlu çözünenler’ olarak adlandırılır (Roberts, 2005; Oren, 2006; Mokashe ve ark., 2018; Daoud ve Ben Ali, 2020). Uyumlu çözünen maddeler yüksek oranda çözünür, polar, çoğu fizyolojik pH’da yüksüz, zwitteriyonik moleküllerdir. Pek çok prokaryotik hücre farklı uyumlu çözünen maddeleri biriktirmektedir. Uyumlu çözünen maddeler suda yüksek oranda çözünür şekerler, alkoller, amino asitler, betainler, ektoinler veya bunların türevleri dâhil olmak üzere düşük ağırlıklı moleküller olarak gösterilebilir (Shivanand ve Mugeraya, 2011; Yin ve ark., 2015). Ozmotik çözünen moleküller mikroorganizmalar arasında farklılık gösterebilir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Prokaryotlarda Bazı Uyumlu Ozmotik Çözünen Maddelerin Dağılımı (Shivanand ve Mugeraya, 2011, s. 4).

Ozmotik çözünenler	Organizma
Ektoin	<i>Chromohalobacter israelensis</i> , <i>Halomonas boliviensis</i> , <i>Brevibacterium epidermis</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>Ectothiorhodospira halochloris</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i>
Hidroksi ektoin	<i>Nocardiopsis halophila</i> , <i>Halomonas elongata</i>
Betain	<i>Halorhodopira halochloris</i> , <i>Actinopolyspora</i> sp., <i>Thioalkalivibrio versutus</i>
Prolin	<i>Streptomyces</i> ve bazı <i>Bacillus</i> türleri
α-glutamat	Metanojenik bazı arkeler
Mannosilgliserat	<i>Thermus thermophilus</i> , <i>Methanothermus fervidus</i> , <i>Rhodothermus marinus</i> , <i>Thermococcus</i> spp., <i>Pyrococcus furiosus</i>
Digliserol fosfat	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Trehaloz	<i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Rubrobacter xylanophilus</i> , <i>Pyrobaculum aerophilum</i> , <i>Thermoplasma acidophilum</i>
Glikozilgliserat	<i>Agmenellum quadruplicatum</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Sukroz	<i>Anabaena</i> (mavi-yeşil alg), <i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrosomonas europaea</i>
Mannitol	<i>Pseudomonas putida</i>
Mannosilgliseramid	<i>Rhodothermus marinus</i>

Uyumlu ozmotik çözünen maddeler biyomoleküllerin ve birçok hücrenin stabilizörü veya stres koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Mokashe ve ark., 2018).

Uyumlu çözünen maddeler proteinleri stabilize edici özelliklere sahiptir. Özellikle polipeptit zincirlerinin doğru şekilde katlanmasına yardımcı olmaktadır. Protein molekülleri üzerindeki stabilize edici etkileri sebebiyle bunlar bazen ‘kimyasal şaperonlar’ olarak da adlandırılmaktadır. Uyumlu çözünen maddeler ayrıca nükleik asitlerle etkileşime girer ve DNA-protein arasındaki etkileşimleri düzenler (Chattopadhyay ve ark., 2004; Kolp ve ark., 2006). Uyumlu çözünen maddeler bu özelliklere sahip olduğundan dolayı biyoteknolojik birçok alanda kullanılmaktadır. Örneğin; ektoin bakterilerde en yaygın ozmotik çözünenlerden biridir (Şekil 1.3). İlk olarak haloalkalifil fotosentetik kükürt bakterisi *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov.,’da keşfedilmesine rağmen daha sonra yapılan araştırmalarda çeşitli halofil ve halotolerant bakterilerin genellikle 5-hidroksi türevleri ile birlikte bu bileşiği ürettiği bulunmuştur (Kushner, 1978; Rothschild ve Mancinelli, 2001).



Şekil 1.3. Ektoin ve Hidroksiektoinin Yapısı (Shivanand ve Mugeraya, 2011, s. 4).

Ektoin, biyoteknolojide çok büyük ilgi görmüştür. Enzimleri, DNA’yı ve pek çok hücreyi donma, aşırı ısınma, kuruma gibi çeşitli stres koşullarına karşı koruyarak bir stabilizör görevi görmektedir. Yapılan çalışmalarla ektoinin pek çok ilgi çekici özelliği daha ortaya konmuştur. Ektoinin UV-A’nın neden olduğu hızlandırılmış cilt yaşlanmalarına karşı koyduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Bu nedenle yaşlanmış, kurumuş ve tahriş olmuş ciltlerde nemlendirici olarak kozmetik sektöründe ve tıpta dermatoloji alanında kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Rothschild ve Mancinelli, 2001).

Ektoinin Alzheimer hastalığında β-amiloid birikimini de engellediği üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca bronşiyal astıma karşı inhalasyon etkileri üzerine klinik çalışmaların başladığı bildirilmiştir (Oren, 2010; Shivanand ve Mugeraya, 2011). Ektoin gıda endüstrisinde gıdaların stabilitesini ve tazeliğini arttırmak için kullanılmaktadır. Buna ek olarak tıpta gözdeki mukoza tabakasının tedavisinde de kullanılmaktadır. Özellikle göz kuruluğunun tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir (Detkova ve Boltianskaia, 2007).

Betain bir diğ er uyumlu     nen maddedir. Halofil fototrofik bakterilerde, kemotrofik bakterilerde ve arkebakterilerde bulunmaktadır. Sirozun başlangıç aşaması olan karaciğ erin yağ filtrasyonu tedavisi ve proflaksisi için terapötik potansiyele sahiptir. Betainler anti-inflamatuar preperatların yan etkilerini azaltmaktadır. Antikoag lan  zellikleri sayesinde trombüs oluşumunu önleyerek kalp krizi (enfarktüs) ve fel  oluşma olasılığını düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca  r n verimliliğ ni ve özgüllüğünü artırmak için G+C (Guanin-Sitozin) açısından zengin DNA  ablonlarının PCR amplifikasyonlarında da kullanılmaktadır (Detkova ve Boltianskaia, 2007). Bir diğ er uyumlu     nen madde indirgeyici olmayan, glikoz disakkariti olan trehalozdur. Organizmalar tarafından kurumaya karşı koymak için kullanılır ancak aynı zamanda ozmolit görevi de görür. Bakterilerden arkelere, mantarlara, bitkilere ve omurgasızlara kadar çok çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Trehaloz yalnızca biyomoleküllerin dondurulup kurutulması için kriyoprotektan olarak değ il aynı zamanda mikroorganizmaların uzun süreli korunması için de faydalıdır çünkü membran stabilitesini sağlamaktadır (Shivanand ve Mugeraya, 2011). Biyoteknolojik olarak kolay  retilabilen bu uyumlu     nen maddelerin bir oğ  endüstriyel alanlarda (tıp, kozmetik, enzim teknolojisi) stabilizör olarak kullanılmaktadır (Ventosa ve Nieto, 1995).

1.5.3. Halofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojik  nemi

Halofil mikroorganizmaların ticari kullanımları oldukça önemli olmasına karşın (soya ve balık sosu fermentasyonu, beta karoten üretimi vb.) bu organizmaların yapısı daha da aydınlatıldıkça yeni ve benzersiz özellikleri biyoteknoloji için önemli potansiyellere sahip olduğ n  göstermektedir. Halofiller diğ er mikroorganizmaların yaşamasının mümkün olmadığı yerlerde hayatta kalabilir ve geli ebilirler (Ventosa ve Nieto, 1995; Oren, 2010; De Lourdes Moreno ve ark., 2013; Ali ve ark., 2016). Hipersalin ortamlar birçok bölgeye yayılmıştır. Petrol rezervi gibi pek çok doğal jeolojik oluşum aşırı tuzlu sularla ilişkilidir ve birçok endüstriyel işlemede ayrıca işlenmiş tuzlar kullanılmaktadır. Endüstriyel işlemler sonucu oluşan bu tuzlu atık sular çevreye salınmakta ve  evre kirliliğ ne sebep olmaktadır. Halofillerin bu aşırı kontamine tuzlu sularda biyolojik ıslah için kullanılması muhtemeldir (Galinski ve ark., 2010). Halofilik mikroorganizmalar endüstriyel uygulamalar için yararlı olabilecek potansiyele sahip kararlı, stabil yapıda ve benzersiz özellikte moleküller üretir. Halofiller özellikle proteinlerin yapısının bozulup çökelmesine ve denatüre olmasına sebep olabilecek ortamlarda işlev görebilen kararlı enzimlere (lipaz, proteaz, amilaz, DNaz, jelatinaz, ksilanaz ve diğ er birçok hidrolitik enzim de dahil) sahiptir ve bu durum da onları biyoteknolojik olarak önemli kılmaktadır (De Lourdes Moreno ve ark., 2013; Dutta ve Bandopadhyay, 2022).

Halofil mikroorganizmalar ayrıca özel uygulamalar için de kullanılabilir. Biyobilgisayarlar için bakteriyodopsin, gıda boyası için pigment maddesi, stres faktörlerinden (aşırı tuz, sıcaklık, pH) korunmak için ozmotik çözünenler bunlara örnek olarak sayılabilir (Galinski ve ark., 2010). Halofil ve halotolerant mikroorganizmaların mevcut ve potansiyel bazı uygulamalar mevcuttur (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Halofil ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyel Uygulamaları (Daoud ve Ben Ali, 2020).

Ürün	Uygulama alanı	Üretici suş
Polihidroksialkonat (PHA)	Plastik üretimi	<i>Halomonas</i> sp. TD01 <i>Halomonas boliviensis</i>
Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerant (PHVB)	Plastik üretimi, Medikal malzeme üretimi	<i>Haloferax mediterranei</i>
Ektoin	Hücre zarı koruyucu, yaşlanma karşıtı cilt koruması, kozmetik sektörü	<i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Halomonas elongata</i>
Hidroksiektoin	Proteinlerin yanlış katlanmaya karşı korunması, stabilizör	<i>Marinococcus</i> M52
Amilaz	Gıda endüstrisi	<i>Halobacillus</i> spp. <i>Halomonas</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp.
Proteaz	Farmasötik ürünlerde katkı maddesi olarak, çamaşır deterjanı endüstrisi vb.	<i>Bacillus</i> sp. <i>Halobacillus</i> sp.
Ksilanaz ve Selülaz	Biyolojik ağartma, selüloz hidrolizi	<i>Streptomonospora</i> <i>Halomonas</i> sp.
Biyosüpfaktanlar	Hidrofobik substratların çözülmesi	<i>Natrialba</i> sp. E21
β-karoten	Gıda katkı maddesi	<i>Dunaliella</i> spp.
Gliserol	Kozmetik endüstrisi	<i>Dunaliella</i> spp.
Bakteriodopsin	Işıkla çalışan proton pompası proteini	<i>Halobacterium halobium</i>

Gıda endüstrisinde bakıldığında tuz varlığında gerçekleşen birçok fermantasyon işlemi halotolerant mikroorganizmalar tarafından katalize edilmektedir. Gıda maddesine istenilen tat, koku ve lezzeti vermek için kullanılmaktadır. Örneğin; *Lactobacillus plantarum* lahanaya turşusunun fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır. Asya’da kullanılan bir balık sosu üretiminde ise *Halobacterium salinarum*, *Halococcus* sp., *Pseudomonas*, *Bacillus* sp., ve *Coryneform* bakterilerinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Joo ve Kim, 2005). Uyumlu çözünen maddeler ise enzimlerin, DNA’nın ve membranlar gibi biyomoleküller yapıların stabilize edilmesinde ayrıca stres ve tuzlara karşı korunmasında rol oynamaktadır (Daoud ve Ben Ali, 2020).

Ektoin, endüstriyel olarak *Halomonas salina* ve *Chromohalobacter salexigens* suşları tarafından üretilen en yaygın uyumlu çözünen maddedir. DNA, protein ve memeli hücreleri için koruyucu bir madde olarak endüstriyel olarak pazarlanmaktadır (Kolp ve ark., 2006). Pratikteki uygulamalar için uyumlu çözünen maddelerin uygun miktarlarda in vivo ve in vitro üretimi gerekmektedir. Örneğin; *Halomonas elongata*'nın 'bacterial milking' denilen bir biyoproses ile Almanya'da büyük ölçekte ticari olarak ektoin ürettiği bildirilmiştir. Bu süreç özellikle Alman biyoteknoloji şirketi Bitop'un temelini oluşturmuştur (Yin ve ark., 2015). Ektoin birçok kozmetik ve cilt bakım ürünlerinin aktif maddesidir ve tıbbi preparatlarda giderek kullanımı artmıştır. Bunlara ek olarak ektoin PCR ve DNA Microarray teknikleri gibi çeşitli moleküler biyoloji uygulamalarında biyomoleküller için stabilizör ve güçlendirici olarak kullanılmaktadır (Oren, 2010). Koruma yetenekleri açısından ektoinden daha iyi gösterilen başka bir uyumlu organik çözünen madde olan hidroksiektoin son yıllarda ticari olarak daha fazla ilgi çekmiştir. Bir çalışmada *Marinococcus* M52 suşunun ektoini hidroksiektoine dönüştürdüğü gösterilmiştir (Yin ve ark., 2015). Ayrıca biyomoleküllerin liyofilizasyonu sırasında önemli ticari mahsullerin (domates, patates, tütün, pirinç) ozmotik toleransını geliştirmede betain, protein stabilizatörü olarak fosfat diğliserol ve kriyoprotektan olarak trehaloz gibi diğer organik çözünen maddelerin de biyoteknolojide kullanım alanları mevcuttur (Daoud ve Ben Ali, 2020; Oren, 2010). Halofilik ekzopolisakkaritler ve biyosüpfaktanlar yağlarla kontamine olmuş toprak, su gibi çeşitli ortamların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. İlâveten biyosüpfaktan üreten halofil ve halotolerant mikroorganizmalar hidrokarbonlar tarafından kirletilmiş tuzlu su bölgelerinin iyileştirilmesinde hızlandırıcı ajanlar olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok petrol yatağı (oksijen eksikliği, yüksek tuzluluk ve sıcaklık içeren) gibi zorlu çevre koşulları altında mikrobiyal süpfaktanlar kullanılmaktadır (Margesin ve Schinner, 2001).

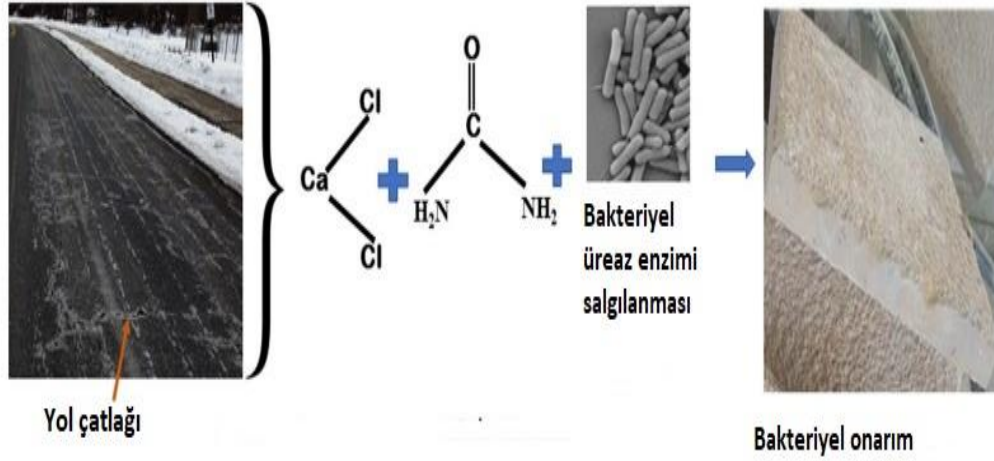
Birçok alkalifil de halofildir ve deterjan endüstrisinde, tekstil endüstrisinde ve diğer sektörlerde kullanılan pek çok faydalı enzim tuzlu alkali göl sularında gelişen bakteriler tarafından üretilmiştir. Yapılan çalışmalarda Kenya ve İç Moğolistan'daki tuzlu alkalın göllerin zengin bir organizma veya metagenomik kitaplıklar için gen kaynağı olduğunu ve bunlardan bazılarının metagenomik üretim için başlangıç materyali olduğu tespit edilmiştir (Yin ve ark., 2015). Halofilik enzimler (*Salinibacter ruber* ve bazı arke üyeleri için) asidik amino asitlerin ve negatif yüklerin fazlalığıyla bilinmektedir. Bu özellikler düşük su, yüksek tuz aktivitesine sahip solüsyonlarda onlara fonksiyon sağlar (Oren, 2010). Bu tuz toleransı özellikle endüstriyel atıkların temizlenmesinde önem arz etmektedir (Daoud ve Ben Ali, 2020).

Kontamine ortamların geleneksel (ekstremofil olmayan) mikroorganizmalar tarafından biyoremediasyonu çeşitli organik kirleticileri yüksek tuzluluk içeren ortamlarda verimli şekilde dönüştürememeleri nedeniyle halofilik mikroorganizmalar bu süreçte dikkat çekmeye başlamıştır. Halofil mikroorganizmalar metabolik olarak yüksek tuzluluk içeren ortamlara adapte olduklarından kontamine hipersalin ortamların ve tuzlu atık suların biyoremediasyonu için uygun adaylardır. Daha önce halotolerant ve halofilik bakterilerin çok çeşitli ortamlardaki kirletici bileşikleri parçaladığı bildirilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001). Bu bileşiklerden aromatik bileşikler parçalanması en zor olanıdır. Dolayısıyla bu bileşiklerle kirlenmiş tuzcul ortamları işleyen yeni süreçlerin optimizasyon çalışmalarına büyük ilgi gösterilmiştir (Yin ve ark., 2015). Aromatik bileşikler ayrıca çeşitli kimyasal ve toksik bileşiklerin yıkım olayları sırasında çevreye yayılabilmektedir. Bu bileşikleri dönüştürebilen halofil bakterilerin çeşitliliğini tahmin etmek için yapılan bir çalışmada bilim insanları fenolün ana kirletici olduğu bir dizi aromatik bileşik varlığında gelişmeye dayalı zenginleştirmeler ile çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmada çok çeşitli tuz konsantrasyonlarında gelişebilen *Halomonas* cinsini içeren bakteri suşlarını kullanmışlardır. Bu araştırma ılımlı halofil bakterilerin özellikle de *Halomonas* cinsi bakteri suşlarının tuzlu ortamlarda aromatik bileşikleri dönüştürebildiğinin anlaşıldığı bir çalışma olmuştur (García ve ark., 2005). Başka yapılan bir çalışmada İrandaki Khara Tuz Gölü'nden izolasyonu yapılan halofilik bakterilerin kurşun ve nikel'e karşı dayanıklılık yetenekleri araştırılmıştır. Sonuçlara göre *Bacillus* sp. A21, *Salinicoccus* A43 ve *Oceanobacillus* sp A22 olmak üzere üç suş seçilmiştir. Bu suşların sırasıyla 7.2, 6.7 ve 4.1 mM kurşuna ve 3.6, 4.1 ve 3.7 mM'da nikel'e karşı dirençli olduğu ve ağır metal biyoremediasyonunda kullanım potansiyellerinin bulunduğu bildirilmiştir (Diba ve ark., 2021). Diğer çalışmalar halofilik ve halotolerant bakteriler ile azoboyalı tekstil ürünlerinin boya giderimi üzerine odaklanmıştır. Yapılan bir çalışmada tekstil atıklarından izole edilen üç halofil bakteri suşunun yaygın olarak kullanılan azoboyalar üzerindeki renk giderme aktivitesi tespit edilerek bu suşun karakterizasyon ve filogenetik analiz çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar bu suşun *Halomonas* cinsine ait olduğunu göstermiştir. Dört günlük statik kültür inkübasyonundan sonra çeşitli NaCl konsantrasyonlarında (%5-20), sıcaklıkta (25-40°C) ve pH (5-11) aralığında azoboyanın rengini giderebildiği bildirilmiştir. Çalışmanın devamında ise bu suşların saf boyaların yanı sıra boya karışımlarının da rengini giderebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek boya konsantrasyonlarında (5000 ppm) renk giderebildiği ve 10.000 ppm'ye kadar tolerans gösterebildiği bildirilmiştir (Oren, 2010; Yin ve ark., 2015; Daoud ve Ben Ali, 2020).

Sağlık alanında yapılan biyoteknolojik uygulamalara bakıldığında *Halobacterium* suşu GRB-1 ile yapılan çalışmalarda ökaryotik tip II DNA topoizomerası etkileyen yeni antibiyotiklerin, anti-tümöral ilaçlarının ve kinolon gibi DNA giraz enzimi üzerine etkili ilaçların ön taramasında kullanılan plazmit PRG-1'i barındırdığı için oldukça dikkat çekmiştir (Ventosa ve Nieto, 1995). Bir diğer çalışmada antimikrobiyal peptitler üzerine yapılmıştır. Antimikrobiyal peptitler (AMP) 12-100 amino asitten oluşan, uzun, alfa-sarmal, pozitif yüklü, amfifilik bileşiklerdir. Halosinler aşırı halofilik arkeler tarafından üretilen ve çevreye salınan antimikrobiyal peptitlerdir. Bakteriler ise bakteriyosin (peptit bileşikler) sentezleyerek diğer bakterilerin büyümesini engellerler. Bu bakteriyosinler antibiyotiğe dirençli bakterilerden, mayalara, böceklerle kadar geniş bir antimikrobiyal spektrum sergilediği için klinik alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir. Özellikle çoklu ilaçlara dirençli bakteri suşlarının artış göstermesi ile birlikte hastalıklara alternatif çözümler aranmaya başlamıştır. Bakteriyosinler bu klinik patojenlere karşı alternatif tıp uygulaması olarak kullanılmaktadır. İki peptitli (alfa ve beta) bir bakteriyosinin (Enterosin X), *Enterococcus faecalis* KU-B5 suşu tarafından üretildiği bildirilmiştir. Bu iki peptidin (alfa ve beta) birleştirildiğinde antibakteriyel aktivitesinin daha güçlü olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu bakteri suşu tarafından üretilen Enterosin X isimli bakteriyosinin ısıya dayanıklı olduğu ve silaj (fermente edilmiş hayvan yemi) üretimi gibi uygulamalar için yararlı olduğu vurgulanmıştır (Hu ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada Halosin H6'nın (*Haloferax gibbonsii* tarafından üretilen bakteriyosine benzer bir protein) miyokardiyal iskemi sırasında enfarktüs boyutunu azaltarak kalbi reperfüzyon hasarından koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu zamana kadarki yapılan çalışmalar arasında Halosin H6'nın ökaryotik hücrelerin NHE'si (Na^+/H^+ exchanger) üzerine spesifik bir aktivite gösteren tek tanımlanmış molekül olduğu belirtilmiştir (Lequerica ve ark., 2007). Bu bulgular aynı zamanda organ naklinde de büyük gelişmelerin olabileceğinin sinyalini vermektedir (Yin ve ark., 2015). *Halobacterium* tarafından üretilen hem H4 hem de C8 tipi halojenler hassas suşlar üzerinde çubuk hücrelerinin şeklini küresel hücrelere dönüştürerek hücre lizisine sebep olduğu için antibakteriyel ajanlar olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca enfeksiyöz bakterileri kontrol etmek amacıyla bakteriyosinler kullanılmaktadır (Atanasova ve ark., 2013). *Bacillus firmus*'tan üretilen Subtilisin-A'nın antimikrobiyal (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Corynebacterium diphtheria*), antifungal (*Aspergillus niger*), antioksidan (DPPH ve nitrik oksit radikallerine karşı) ve anti-servikal kanser (HeLa hücre hattı 53 µg/mL'de) aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Manikandan ve ark., 2021).

Halofil mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal ürünlerin de sağlık sektöründe önemli kullanım alanlarına sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle farmasötik endüstrisinde proteolitik enzimler sıklıkla kullanılmaktadır. Çeşitli halofilik bakteriler antibakteriyal, anti-tümöral, antiviral ajanlar olarak biyoaktif bileşiklerin bir kaynağı konumundadır (Corral ve ark., 2019; Díaz-Cárdenas ve ark., 2020). Deniz siyanobakterileri klinik deneylerde kürasin ve kriptofisin gibi farmasötik ürünlerin oluşturulmasında büyük ilgi görmüştür. Ayrıca deniz diatomlarından elde edilmiş olan peptit molekülleri de antioksidan ve antikanser ajanlar olarak araştırılmaktadır (Barkia ve ark., 2019; Hussein ve Abdullah, 2020). Halofillerden elde edilen biyosüpfaktanlar da antiviral, antifungal, antibakteriyal, anti-tümöral, immünomodilatörler, gen terapileri, uyarıcı dermal fibroblastlar ve aşılar kadar dikkat çekmeye başlamıştır. Halofil mikroorganizmalar keşfedildikçe ve yapıları daha da aydınlatıldıkça gelecekte yeni ilaçlar, antioksidanlar, uyumlu çözünenler ve hidrolitik enzimler üreterek çeşitli sektörlerde kullanım alanları bularak bir devrim noktasına ulaşılacağı öngörülmektedir (Henciya ve ark., 2020).

Kar ve buz temizleme özellikle kışın dünyanın soğuk ülkelerinde karayolu trafiğinde yolu açmak ve trafiği hareket ettirmek için en önemli faaliyetlerden biridir. Buzla mücadele etmek için sodyum klorür, kalsiyum klorür, magnezyum klorür içeren tuzlu su çözeltileri uzun zamandır kullanılmaktadır. Buzlanmayı çözmek amacıyla tuz uygulaması 1930'lu yıllarda başlamış olmakla birlikte 1960'lı yıllarda otoyol bakımında yaygınlaşmıştır (Sharma ve ark., 2019). Tuz ucuz ve kolay bulunabilen bir mineraldir. Ayrıca -12°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda etkinlik gösterdiği için çoğunlukla antifiriz olarak kullanılmaktadır. Yollara buzlanmayı önlemek için serpilene tuz, buzlar eridiğinde toprağa karışarak toprakta ciddi ekolojik değişiklikler yaratarak toprak florasını büyük ölçüde etkilemiştir. Tuz yüklü sular kök sistemleri ile etkileşime girerek yerel bitki örtüsünde olumsuz sonuçlara yol açmıştır. Toprak verimliliği açısından mikrobiyal topluluklar üzerine aşırı tuzun etkilerinin değerlendirildiği çok az çalışma bulunmaktadır (Yin ve ark., 2015). *Natrinema* ve *Haloterrigena* arke cinsleri zemin stabilizasyon çalışmalarıyla bilinmektedir. Bir başka çalışmada ise halofil bakteri *Sporosarcina pasteurii*'nin kalsiyum iyonlarının biyomineralizasyonunda temel rol oynadığı bildirilmiştir. Bu bakteri suşu üreaz enzimi ile yol toprağındaki kalsiyum iyonlarını kireçtaşı olarak da bilinen kalsit veya kalsiyum karbonata (CaCO_3) dönüştürür. Bu bakteri CaCO_3 çökeltisini biriktirip beton çatlaklarının çimentolanmasına biyolojik olarak yardımcı olmaktadır (Şekil 1.4) (Gorospe ve ark., 2013).



Şekil 1.4. Yol Çatlak Tamirinde Halofilik Bakterilerin Kullanımı (Dutta ve Bandopadhyay, 2022, s. 11).

Halofil bakteriler, *Pseudomonas putida* ve *Aliivibrio fischeri* gibi bakteri suşları topraktaki toksisite seviyesini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini tahmin etmek için kullanılmaktadır (Černohlávková ve ark., 2008). Buzları çözücü tuzlarda mikrobiyotanın kalıcı etkisi olarak halofil bakteriler özellikle toprak ekosisteminde önemli bir rol oynamaktadır (Dutta ve Bandopadhyay, 2022). Artan toprak tuzluluğu da mahsul üretiminde küresel çapta bir endişe hâline gelmiştir. Tuzluluk morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal açılardan bitki gelişimini etkilemektedir. Bu durumla mücadelede endüstriyel tarımda bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) umut verici bir strateji olarak kullanılmaktadır. *Arthrobacteria*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* ve *Halomonas* tuz stresini azaltan ve bitki büyümesini teşvik eden başlıca halofillerdir. Bu agronomik potansiyeldeki halotolerant bakteriler bitki patojenlerinin kontrol edilmesinde, biyogübre yapımında aşılama ajan olarak ve biyostimülan üretiminde kullanılmaktadır. PGPB'ler bitki büyümesini bitkisel büyüme hormonlarını tetikleyerek geliştirir. Sitokinin ve absisik asitin (ABA) birikimi, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) yıkımı ve köklerden besin alımının artırılması gibi durumlar buna örnek verilebilir. Ayrıca kurak bölgelerdeki toprakların yüksek tuz içeriğine sahip olması ve mahsul verimini azaltması sebebiyle tuza toleranslı bakteriyel aşılama ajanlarının (*Pseudomonas klororaphis*, *P. putida*, *P. extremorientalis* ve *P. aurantiaca*) buğday üretiminde kullanılması bu konuda yapılan iyileştirmelerin bir diğer örneğidir (Egamberdieva ve Kucharova, 2009; Orhan, 2016).

Halofil mikroorganizmaların dikkat çektiği bir diğer nokta ise Astrobiyoloji alanında olmuştur. Galaksinin farklı yerlerinde yaşam arayışı özellikle son 20 yılda hız kazanmıştır. Astrobiyologlar ötegezegen olarak sınıflandırılan Mars'ta umut verici yaşam belirtileri farketmişlerdir (Des Marais ve Walter, 1999). Yapılan araştırmalar Mars'ın yüzeyinde geçici olarak bol miktarda su barındırdığını onaylamaktadır. Güney Mars kutuplarının yakınlarındaki tuzlu ve soğuk sular halofil bakteriler için barınma olasılığı yüksek olan manganez ve kalsiyumu barındırmaktadır. Bu moleküler yapı *Halorubrum chaoviator*'un Mars'ta donma ve çözülme tuzlu suyunda hayatta kalmasına benzemektedir. Perklorata yüksek toleransı olan arkeler (0.4 M) anaerobik solunum esnasında terminal elektron alıcı olarak kloratı kullanabilir. Bu çalışma ayrıca Marstaki tuzlar arasında perklorat varlığının halofilik yaşam olasılığını engellemediğinin kanıtı olarak gösterilmiştir (Des Marais ve Walter, 1999; Leuko ve ark., 2014). Bu nedenle Marstaki perkloratın nispi bolluğu Dünya'daki Atama Çölü gibi aşırı kurak bölgelerdeki nitrojen fiksasyonunu anlamak için bir kılavuz olabileceği belirtilmiştir. Bütün bu araştırmalara bakıldığında prebiyotik evrim sırasında yaşamın tuzlu suda ortaya çıkışının ve oraya adaptasyonunun yaşamın erken belirtisi olabileceğine işaret etmiştir. Bu sebeple halofiller gelecekte dünya dışı yaşamın varlığını aramada kullanım potansiyele sahip olduğu için Astrobiyoloji alanında dikkat toplamaya başlamıştır (Dutta ve Bandopadhyay, 2022).

Sonuç olarak halofil ve halotolerant mikroorganizmalar büyük biyoteknolojik önem taşımaktadır ve birçok endüstri alanında kullanım potansiyeline sahiptir. Özellikle son yapılan çalışmalar ekstrem koşullara adapte olmuş bu mikroorganizmaların enzimleri ve molekülleri üzerine odaklanmıştır. Geleneksel tanımlama yöntemleri veya yüksek verimli metagenomik dizileme teknikleri ile çalışmalar yapılmaktadır. Bunlara ek olarak mikroorganizmaların fermentörlerde manipüle edilebilmesi üretim maliyetini azalttığı için ekspresyon vektörleri, klonlama, promotörler ve halofilik mikroorganizmalarda ekspresyona hizmet eden mutagenesis sistemleri gibi yeni genetik araçların anlaşılması için büyük bir çaba sarfedilmektedir. Biz de bu çalışmamızda tuzlanmış derilerden izole ettiğimiz zayıf halofil bakteri suşlarını hem mikrobiyolojik hem de moleküler yöntemler kullanarak tanımlayıp bu bakterilerin biyoteknolojik potansiyelleri hakkında bilgi sahibi olmayı amaçladık.

1.6. Bakteriyosinler Hakkında Genel Bilgi

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen, özel olarak bazı bakteri suşları tarafından üretilen hücre dışı protein veya peptitlerdir. Bu peptitler aynı veya farklı bakteri türleri üzerine etkili olabilir ve bazı mantar suşlarını inhibe edebilir. Farklı bakteri türleri üzerine öldürücü (bakterisidal) yada üremelerini durdurucu (bakteriyostatik) etkileri vardır. Bakteriyosinler pek çok sektörde destekleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Özellikle çeşitli gıda kaynaklı zehirlenmelerine sebep olan patojenlere karşı gıdada biyokoruyucu olarak, antiviral ve antifungal ajan olarak da oldukça umut vericidir (Daba ve ark., 2022; Nisa ve ark., 2023). Bir çok ülkede onaylanan Nisin A gibi bazı bakteriyosinler hâlihazırda onaylanmış ve market piyasasındaki yerini almıştır (Aroutcheva ve ark., 2001). Bakteriyosinler gerek gıda gerekse ilaç sektöründe güçlü biyoteknolojik araçları temsil etmektedir. Bakteriyosinlerin keşfi 1925 yılında Gratia'nın *Escherichia coli*'nin diğer suşların büyümesini engelleyen, ısıya dayanıklı yapıda olan Kolisin V'yi üretimi nedeniyle *E.coli* suşları arasındaki bu antagonist etkiyi farketmesiyle başlamıştır (Grande Burgos ve ark., 2014). Bu olaydan üç yıl sonra Rogers ve Whittier, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen antimikrobiyal bir madde keşfetmişlerdir (Rogers ve Whittier, 1928). Mattick ve Hirsch bu maddeyi saflaştırmayı başarak ona "Nisin" adını vermişlerdir (Matsuzaki, 1999). Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler bakteriyosin üretme potansiyeli taşımaya rağmen özellikle Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ürünlerin güvenlik durumu sebebiyle daha fazla dikkat çekmiştir. Bazı bakteriyosinler çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı yüksek özgüllük sergilediği için klinik olarak ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaya başlamıştır. Ayrıca bakteriyosinlere karşı direnç gelişimi geniş spektrumlu antibiyotiklerle kıyaslandığında nispeten daha zordur. Bakteriyosinlerin basit biyosentetik mekanizmaları antibiyotiklerle karşılaştırılmalarını, potansiyellerini, biyomühendisliklerini, özgüllüklerini ve antimikrobiyal spektrumlarının iyileştirilmesini kolaylaştırır. Bu nedenle bakteriyosinlerin keşfedilmesi, tanımlanması ve çalışılması farklı uygulamalarda kullanılma yolundaki adımlar olarak büyük önem taşımaktadır. Bakteriyosinler kökenlerine göre 3 gruba ayrılmaktadır: Arke üyeleri tarafından üretilen Halosinler, Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilmiş olan bakteriyosinler ve Gram-negatif bakteriler tarafından üretilmiş olan bakteriyosinler (Daba ve ark., 2022; Nisa ve ark., 2023).

Arkelerin bakteriyosin benzeri antimikrobiyal peptitler olan halosinleri ürettiği bilinmektedir. *Halobacterium* tarafından üretilen Halosinler ve *Sulfolobus* cinsinden elde edilen Sülfolobisinler şu anda tanımlanan iki halosindir (Riley ve Wertz, 2002). Özellikle *Haloarkea* üyeleri bakteriyosin yapma yeteneklerinden dolayı en fazla dikkat çeken arkelerdir. Halosinler yakından ilişkili organizmalar üzerine antogonistik olarak etki eder. Bu zamana kadar halosin sentezi için kullanılan sadece birkaç halofilik arke moleküler düzeyde çalışılmıştır (Tablo 1.4).

Tablo 1.4. Bazı Halosinler ve Kimyasal Özellikleri (Nisa ve ark., 2023, s. 5).

Halosin	Boyut (kDa)	Üretici suş	Suşun kaynağı	Sıcaklık-pH stabilite aralığı	Hedef suş
H1	31	<i>Haloferax mediterranei</i> M2a	Alicante, İspanya	<50 °C	Tanımlanmamış
HA1	14	<i>Haloferax larsenii</i> HA1	Pachpadra Tuz Gölü, Hindistan	>100 °C pH 4-12	<i>Haloferax larsenii</i> HA10
C8	6.3	<i>Halobacterium</i>	Büyük Chaidan Tuz Gölü, Çin	>100 °C	<i>Halorubrum saccharovororum</i>
H4	34.9	<i>Haloferax mediterranei</i> R4	Alicante, İspanya	<60 °C	<i>Halobacterium halobium</i>
H6/H7	32	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39 veya Alicante SPH7	Alicante, İspanya	<90 °C	<i>Halobacterium halobium</i> NRC 817
SH10	20	<i>Natrinema</i> sp. BTSH10	Tamil Nadu, Hindistan	<50 °C	<i>Halorubrum</i> sp. BTSH03
Sech7a	10.7	<i>Haloferax mediterranei</i> Sech7a	Secovlje, Slovenya	<80 °C pH 2-8	<i>Halobacterium salinarum</i> NRC 817

Tanımlanan ilk Halosin S8'dir ve 34 kD pro-proteinle işlenen kısa bir hidrofobik peptitten (36 amino asit) oluşmaktadır. Bu halosin son derece sert bir yapıda olmasına karşın organik çözücüler tarafından fazla tuzu giderilebilir ve biyoteknolojik olarak kullanılabilir. *Sulfolobus islandicus*'tan izole edilen Sülfolobisinler de diğer bir halosin örneğidir. Bu peptitlerde diğer bakteriyosinler gibi proteaza duyarlıdır ve ısıya dayanıklıdır. Sülfolobisinler etki ettiği suşun hücre zarına bağlanarak inhibisyon göstermektedir. Halosinler genellikle besinlerin kıt olduğu ve rekabetin fazla olduğu durağan fazlarda arkeler tarafından salgılanmaktadır (Prangishvili ve ark., 2000; Riley ve Wertz, 2002). Araştırmacılar Tuz Gölü'nün Kaldırım ve Kayacık Tuzlasından çıkarılan işlem görmemiş ham tuzların derileri korumak için kullanıldığını, bu tuzlarda gelişebilen arkelerin derilerde hasara sebep olduğunu belirtmişlerdir (Birbir ve Eryılmaz, 2004).

Bu sebeple tuzlu su çözeltilerinde lipolitik aktiviteye sahip halofilik suşları kontrol etmek için arkeler tarafından üretilen halosinlerin kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır (Birbir ve Eryılmaz, 2004). Araştırmacılar, Kaldırım ve Kayacık gibi tuz kaynaklarından alınan örneklerden 25 halofil arke suşu izole etmişlerdir. Kaldırım Tuzlasından alınan örneklerde %39, Kayacık Tuzlasından alınan örneklerde %43 oranında lipaz üreticisi suş bulunmuştur. Aynı çalışmanın devamında Kaldırım Tuzlası'ndan alınan örneklerde suşların %89'u, Kayacık Tuzlası'ndan alınan örneklerde ise suşların %29'unun birbirine karşı halosin ürettiği bildirilmiştir (Birbir ve Eryılmaz, 2004). Çalışmanın sonucunda derilerde salamura işlemi esnasında halosin üreten suşların yada bunların ekstraktlarının lipaz üreticisi suşları kontrol etmek için deri endüstrisinde kullanılabileceğini önermişlerdir (Birbir ve Eryılmaz, 2004).

Gram-pozitif bakteriler de önemli sayıda bakteriyosin sentezlemektedir. Geniş bir inhibitör spektrumuna ve ökaryotik hücrelere karşı minimum toksisiteye sahip bakteriyosinler endüstriyel ve tıbbi kullanımlar için faydalı araçlardır. Bu açıdan insan tüketimi için GRAS statüsünde olması sebebiyle bir çok laktik asit bakterisi metabolik, fizyolojik ve morfolojik olarak incelenmektedir (Guiga ve ark., 2010; Nisa ve ark., 2023). *Lactococcus lactis* tarafından üretilen 34 aminoasitlik bir polipeptit olan Nisin uzun bir süredir güvenle kullanılmaktadır ve önemli Gram-pozitif gıda kaynaklı patojene karşı etkili kabul edilmektedir. 1969 yılında Nisin Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) gibi kurumlarca dünya çapında sertifikalandırılmıştır ve gıdalarda raf ömrünü uzatmak için biyokoruyucu olarak kullanılmaktadır (Verma ve ark., 2014). Gram-pozitif bakteriyosinlerin etki spektrumunun Gram pozitif bakterilerle sınırlı olduğu yönünde genel bir görüş vardır fakat bu aralığın daha geniş olduğu bazı araştırmalarla gösterilmiştir. Nisin A ve Mutasin B-Ny266 gibi bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen lantibiyotiklerin *Micrococcus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca bu bakteriyosinlerin *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* ve *Neisseria* gibi önemli Gram-negatif bakterilere karşı da aktif olduğu tespit edilmiştir (Verma ve ark., 2014). Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin keşfi ise Andre Gratia isimli bilim insanının 1925 yılında *Escherichia coli* tarafından üretilen Kolisini farketmesiyle başlamıştır. Daha sonraki yıllarda Kolisin, bakteriyosin araştırmalarının bir çoğuna uzun yıllar hakim olmuştur. Sonraki yıllarda ise bakteriyosin üretiminin sadece *E. coli* suşuyla sınırlı olmadığını *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi suşların da bakteriyosin üretebilme yeteneğinde olduğu keşfedilmiştir.

Gram-negatif bakterilerden elde edilen bakteriyosinler (mikosin hariç) muazzam boyutlarından dolayı ısıya duyarlıdır. Bu durum Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakterilerin temel bir dezavantajıdır ve uygulamaları bu yüzden büyük ölçekte sınırlıdır. Bu dezavantaj sebebiyle bilim insanları bakteriyosinlerin daha kabul edilebilir formlarını aramaya başlamıştır (Riley ve Wertz, 2002; Moraes ve ark., 2010).

1.6.1. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması

Yüksek etkili bakterisidal ajanlar olan bakteriyosinler hem dar hem de geniş spektrumlu bileşiklerdir. Birçok laktik asit bakterisi (LAB) tarafından üretilmiş olan bakteriyosin Gram-pozitif bakteriler üzerine etkili olmasına rağmen Gram-negatif bakteriler bakteriyosinlerin plazma membranına ulaşmasını önleyen kalın peptidoglikan tabaka nedeniyle Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlere nispeten dirençlidir. Farklı sınıftaki bakteriyosinler protein sentez inhibisyonu, membran yapı düzensizliği, DNA replikasyonu ve transkripsiyon inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla etki etmektedir (Riley ve Wertz, 2002; Nisa ve ark., 2023). Pek çok bakteriyosin hedef bakterilerin hücre membranı ile etkileşime girmesine izin veren fizikokimyasal ve yapısal özelliklere sahiptir. Hücre zarında gözenek oluşumuna sebep olarak etki eden bakteriyosinler suyla temas ettiklerinde uyum sağlar bu da hücre zarının yüksek konsantrasyonlardaki amfifilik-sarmal yapısıyla kolaylaştırılmaktadır. Bu etki mekanizmasına *Lactococcus lactis* tarafından üretilen Nisin örnek verilebilir. Nisin elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü lipidlerle etkileşime girerek peptid agregasyonuna neden olur (Martinez ve ark., 2000). Negatif zar potansiyeli bakteriyosinin taşınmasını teşvik eder ve zarda gözenek oluşumu gerçekleşir. Gözenek oluşumu membran geçirgenliğinin bozulmasına sebep olur ki bu da proton-motif gücün kısmen veya tamamen dağılmasına sebep olan enerji tükenmesine yol açar ve bu durum hücre ölümüyle sonuçlanır. Membranda gözenek oluşumu bakteriyosin türüne göre değişiklik gösterir. Bazıları iyon akışına müdahale ederken bazıları da ATP'nin ve amino asitlerin sızıntısını kolaylaştırır (Negash ve Tsehai, 2020). Güncel araştırmalar ise bakteriyosinlerin sadece hücre membranıyla değil aynı zamanda reseptör ve diğer moleküllerle de etkileşime girerek hayati hücre yollarını engellediğini ortaya koymuştur (Negash ve Tsehai, 2020; Nisa ve ark., 2023). Bir diğer inhibisyon mekanizması ise lipid II inhibisyonudur. Lipid II vankomisin, ramoplanin ve glikopeptitler için çok önemli bir bağlayıcı reseptördür ve hücre duvarı öncüsüdür. Lipid II bakteriyosinlerle etkileşime girdiğinde iki şekilde etki edebilir; ya hücre duvarı sentezi baskılanır ya da hücrenin membranında gözenek oluşumu gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmalarda Nisin isimli bakteriyosinin lipit II'ye bağlanması sonucu hücre zarının yük dengesini bozarak hücre bölünmesi ve çoğalmasını zorlaştırdığı tespit edilmiştir (Hasper ve ark., 2006).

Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları bakteriyosinler arasında değişiklik göstermektedir. Bovicin HC5 bakterilerde spor oluşumunu durdurarak etki etmektedir (Gut ve ark., 2011). Nisin ise gelişen sporlardaki lipit II molekülüne etki eder ve membranda gözenek oluşumunu teşvik edip bakteri sporlarındaki metabolik aktiviteyi bozmaktadır. Diğer bir mekanizma ise hedef hücreler üzerinde endojen otolizinlerini ve bunların inhibitörlerini ayırarak katyon değişimi sürecini başlatmaktır. Bu durum hücrenin parçalanmasına sebep olur ve hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Bierbaum ve Sahl, 2009). Lacticin Q, ölümcül hidroksil radikallerinin birikmesine sebep olarak hücrelerde oksidatif strese etki etmektedir (Li ve ark., 2013). *Lactobacillus helveticus* LP27 tarafından üretilen Lactocin 27 ise protein sentezine müdahale ederek bakteriyostatik etki etmektedir (Verma ve ark., 2014). Bu araştırmalara bakıldığında bakteriyosinlerin etki mekanizması, yapısı, spektrum aralığı ve diğer pek çok parametre açısından farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

1.6.2. Bakteriyosinlerin Biyoteknolojik Önemi

Bakteriyosinler gıda endüstrisinde, ilaç endüstrisinde ve tarımda farklı kullanım alanlarına sahiptir. Bakteriyosinler gıda korumasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin gıda koruyucu olarak kullanımı özellikle süt ürünleri, yumurta, sebze ve et olmak üzere günlük hayatta sıklıkla tükettiğimiz ürünler üzerinedir. Özellikle Nisin günümüzde 48'den fazla ülkede Nisaplin™ ticari ismiyle doğal gıda koruyucu olarak kullanılmakla birlikte Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayına sahiptir. *Listeria monocytogenes* gibi birçok önemli gıda kaynaklı patojen de dâhil olmak üzere diğer Gram-pozitif bakterilerin gelişmesini engellemektedir. Esas olarak bakteriyosinler konserve gıda ve süt ürünlerinde *Bacillus* ve *Clostridium* gibi ısıya dayanıklı spor oluşturan organizmalara karşı peynir üretiminde etkilidirler (Zacharof ve Lovitt, 2012; Negash ve Tsehai, 2020). Bu *Clostridium botulinum* enfeksiyonlarının önlenmesi açısından önemlidir. Çünkü bu tür tarafından oluşturulan toksinler insan sağlığı üzerinde ölümcül etkiler yaratabilir. Doğal koruyucu ve kıvam artırıcı olarak kullanım potansiyeli gösteren Laktisin 3147 ve Laktisin 481 gibi birçok bakteriyosin ticarileşmeyi beklemektedir (Duhan ve ark., 2013).

Pediocin PA-1 *Listeria monocytogenes*'e karşı güçlü aktivite sergileyen bir diğer bakteriyosindir. Bakteriyosinler ayrıca gıda kalitesini ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek için örneğin; proteoliz oranını artırmak veya peynirde gaz oluşumu sorununu önlemek için kullanılabilir. Ayrıca son zamanlarda gıda güvenliği ve kalitesini kontrol etmek amaçlı kullanılan biyoaktif paketlemede de kullanılır (Negash ve Tsehai, 2020).

Bakteriyosinler esas olarak insan vücudunu kolonize eden patojenik bakteriler tarafından üretilmedikleri için tıpta büyük ilgi görmektedir. Antibiyotik kullanımından sonra bu zararsız bakterilerin kaybı fırsatçı patojenlerin vücudu istila etmesine izin verebilir. Yapılan araştırmalarda bakteriyosinlerin bazı kanser türlerinin tedavisinde umut verici olarak gösterilmişlerdir. Ayrıca AIDS ilaçları olarak da kullanım potansiyelleri test edilmiştir (Zacharof ve Lovitt, 2012; Duhan ve ark., 2013). Aslında bakteriyosinlerin kanser tedavisinde potansiyel kullanımı tümör hücrelerinde apoptoz veya sitotoksositeye neden olan DNA ve membran proteinlerinin sentezini inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Nisin birincil keratinositlere kıyasla apoptozu indüklediği, hücre döngüsünü durdurduğu ve HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom) hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı için HNSCC tedavisinde umut verici olarak gösterilmektedir (Joo ve Kim, 2005). Nisinin doğal varyantı olan NisinZP (%95 yüksek içerikli) in vitro ve in vivo anti-tümör etkinlikleri ayrıca rapor edilmiştir. NisinZP düşük içerikli Nisine (%2.5) oranla HNSCC hücrelerinde en yüksek apoptozu indüklemiştir. Bir diğer önemli bakteriyosin *Enterococcus mundtii* suşu tarafından üretilmektedir. Bu suştan üretilen bakteriyosin önemli bir antimikrobiyal ajan olarak ve kanser kontrolünde anti-proliferatif ajan olarak kullanılabilir. HSC3 ağız kanseri, MCF7 meme kanseri, H1299 akciğer kanseri ve HCT116 kolon kanseri gibi kanser hücre hatları bu tür bakteriyosine duyarlılık göstermiştir (Negash ve Tsehai, 2020). Çeşitli doku ve modellere karşı yapılan diğer çalışmalar da *Lactobacillus fermentum* HV6b tarafından üretilen Fermentisin HV6b'nın kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği üzerinedir. Bu sebeple bu bakteriyosin antikanser ilaç tedavisinin bir bileşeni olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Kaur ve ark., 2013). Veteriner hakimlikte de bakteriyosinler dikkat çekmiştir. Örneğin; Nisin'in koruyucu ilaç olarak sığırlarda mastitis tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Sığır mastitisi, besi hayvanı yetiştiriciliğinde ekonomik kaybın önde gelen nedenlerinden biri olmasından dolayı küresel süt endüstrisinde önemli ekonomik etkiye sahiptir. Nisin bazlı enjekte edilebilir ilaçların *Streptococcus agalactiae* gibi mastisite sebep olan bakterilerin yaklaşık %99.9'unu kontrol edebildiği saptanmıştır (Negash ve Tsehai, 2020).

Yapılan alışmalar, belirli probiyotiklerin cildin mikroflorasını, lipit bariyerini ve bağışıklık sistemini modüle etmeye katkıda bulunarak cilt homeostazisinin korunmasına yardımcı olduğunu ortaya koymuştur (Negash ve Tsehai, 2020). *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen SL-5 bakteriyosini *Propionibacterium acnes*'in neden olduğu enflamatuvar akne lezyonları olan bir hastada losyon olarak kullanılmıştır. Sivilceleri plasebo losyona kıyasla önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Hasper ve ark., 2006; Negash ve Tsehai, 2020). *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus macedonicus* ve *Lactobacillus plantarum* ağız sağlığı sorunlarına neden olduğu bilinen bakterilerdir. *S. macedonicus*'den üretilen Macedosinin hücresel kimyada FTIR Spektroskopisi ile doğrulanana ana değişikliklere neden olarak gecikme fazında oral patojenleri öldürme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Macedosin bu sebeple diş macunu ve gargara gibi uygulamalar için geliştirilen formülasyonlarda aktif bir bileşen olabileceği bildirilmiştir (Zoumpopoulou ve ark., 2013). *Streptococcus mutans* insanlarda diş çürümesine yol açan bir bakteridir. Nisin ve polilizin üzerine yapılan çalışmalar her iki bileşiğin de *S. mutans* zerinde etkili olduğunu göstermiştir. Nisin (200 IU) ve polilizin (5 g/ml) inhibitör konsantrasyonları ayrı ayrı kullanıldıklarında bakteri üremesini geciktirmektedir. Bunların birlikte kullanımı ise sinerjistik bir etkiye sahiptir ve bakteri üremesini 24 saat süreyle inhibe etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ise Nisin ve polilizi'nin ağız bakım ürünlerinde kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir (Badaoui Najjar ve ark., 2009). Bir diğer bakteriyosinler üzerine yapılan çalışma ise bitki gelişimi üzerinedir. *Bacillus thuringiensis*'in farklı türleri bakteriyosin üretim yetenekleri açısından tarandığında Thuricin17 ürettiği bulunmuştur. Ayrıca *Bacillus cereus* UW85 suşunun da bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir (Negash ve Tsehai, 2020). Bu bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 3100 ile 3200 kD aralığı arasında değişmektedir. *Bacillus* türleri arasında üretilen bakteriyosinlerin bitki gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Nisa ve ark., 2023). Bu bakteriyosinleri içeren formülasyonların domates, mısır ve soya fasulyesi bitkilerine püskürtüldüğü bir çalışmada formülasyon uygulanan bitki yaprağında kontrole kıyasla fotosentezde %6, bitkinin kuru ağırlığında %15 ve kök nodlasyonlarında %21 artışa neden olarak ürün verimliliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Negash ve Tsehai, 2020).

Son yıllarda antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkışı küresel bir endişe haline gelmiştir. Antibiyotiklerin sık ve bilinçsiz kullanımı patojenlerin antibiyotiklere direnç geliştirmesine yol açmıştır. Bu sorunu çözmek için alternatif yollar aranmaktadır. Çeşitli farklı yaklaşımlar denenmiştir ancak tüketicilerin sağlık sorunlarıyla ilgili artan endişeler nedeniyle doğal antimikrobiyal maddelerin tespit edilmesi için yeni arayışlar sürmektedir. Bu nedenle güçlü öldürme mekanizmalarına sahip yeni bakteriyosinlerin keşfi bu açıdan çok önemlidir (Nisa ve ark., 2023). Literatür çalışmalarına baktığımızda daha çok laktik asit bakterileri ve halofil arkeler tarafından üretilen bakteriyosinler ağırlıklı olarak çalışılmıştır. Bu durum göz önüne alınarak bu çalışmamızda tuzlanarak 6 ay 20°C’de depolanmış koyun derilerinden izole ettiğimiz zayıf halofil bakterilerin bakteriyosin üretim potansiyelini ortaya koymayı ve bu bakteriyosinlerin deri endüstrisinde farklı işlenti basamaklarında bakterileri kontrol etmedeki kullanılabilirliğini tespit etmeyi amaçladık.

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Tuz İçermeyen Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %0.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %3'lük Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %7.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %10'luk Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %12.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %15'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyeri (pH 7.0), %3'lük Tuz İçeren Sıvı Kompleks Besiyeri, %3 Tuz İçeren Agarlı Tween 80 Besiyeri, %3 Tuz İçeren Nişasta Besiyeri, %3 Tuz İçeren DNaz Besiyeri, Selüloz Besiyeri, Üre Agar Besiyeri, Sitrat Agar Besiyeri, %3 Tuz İçeren Agarlı Jelatin Besiyeri, %3 Tuz İçeren Agarlı Ksilan Besiyeri, %3 Tuz İçeren Agarlı Pullulan Besiyeri, ONPG Besiyeri, Karbonhidrat Fermantasyon Ortamı, Aminoasit Dekarboksilaz Besiyeri, %30 Tuz Bulunan Stok Steril Tuzlu Su (TS30) Çözeltisi.

2.1.1.1. Tuz İçermeyen Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g

Maya ekstraktı.....: 3.0 g

Saf su.....: 500 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (Ventosa ve ark., 1989).

2.1.1.2. % 0.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g

Maya ekstraktı.....: 3.0 g

TS30.....: 8 ml

Saf su.....: 490 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (Ventosa ve ark., 1989; Caglayan, 2015).

2.1.1.3. %3'lük Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma): 10.0 g
Maya ekstraktı.....: 3.0 g
TS30.....: 50 ml
Saf su.....: 460 ml
Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.4. %5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g
Maya ekstraktı.....: 3.0 g
TS30.....: 85 ml
Saf su.....: 420 ml
Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.5. %7.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g
Maya ekstraktı.....: 3.0 g
TS30.....: 125 ml
Saf su.....: 380 ml
Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.6. %10'luk Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g

Maya ekstraktı.....: 3.0 g

TS30.....: 170 ml

Saf su.....: 330 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.7. %12.5'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 10.0 g

Maya ekstraktı.....: 3.0 g

TS30.....: 210 ml

Saf su.....: 290 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.8. %15'lik Tuz İçeren Agarlı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 20.0 g

Maya ekstraktı.....: 6.0 g

TS30.....: 400 ml

Saf su.....: 600 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.9. %3'lük Tuz İçeren Sıvı Kompleks Besiyerinin İçeriği

Maya ekstraktı: 6.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Öztürk, 2019).

2.1.1.10. %3 Tuz İçeren Agarlı Tween 80 Besiyeri

Agar (Sigma): 20.0 g

Maya ekstraktı: 5.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri pH'ı: 7.0

Besiyeri hazırlanmış ve otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Steril edilen besiyerine Tween 80'den 10 g konulmuştur (Yılmaz, 2010; De La Haba ve ark., 2011).

2.1.1.11. %3 Tuz İçeren Nişasta Besiyerinin İçeriği

Nişasta: 25.0 g

Agar (Sigma).....: 20.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri pH'ı: 7.5

Besiyerinin hazırlanmasının ardından otoklavda (121°C) 20 dakika sterilize edildi (Yılmaz, 2010; De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.12. %3 Tuz İçeren DNaz Besiyerinin İçeriği

Agar (Sigma).....: 5.0 g

DNase.....: 40 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri pH'ı: 7.5

Besiyeri hazırlanmasının ardından otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edildi (Yılmaz, 2010; De La Haba ve ark., 2011).

2.1.1.13. Selüloz Besiyerinin İçeriği

Sodyumkarboksimetil selüloz (CMC).....	2 g
NaBr.....	0.1 g
Kalsiyum klorür.....	0.2 g
Magnezyum klorit.....	13.0 g
Sodyum bikarbonat.....	0.1 g
Kazaminoasit.....	1.5 g
Maya ekstraktı.....	2 g
Magnezyum sülfat.....	21.0 g
Potasyum klorür.....	2 g
NaCl.....	200 g
Saf su.....	1000 ml

Besiyerinin hazırlanmasından ardından otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edildi (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.14. Üre Agar Besiyeri

A Eriyiğinin Hazırlanması

Agar.....	20 g
Pepton.....	2.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
D-Glukoz.....	1 g
Fenol kırmızısı	5 ml
TS3.....	866 ml

B Eriyiğinin Hazırlanması

Üre.....: 15.0 g

TS3.....: 135 ml

A eriyiğinden alınarak otoklavda 121°C’de 20 dakika boyunca steril edildikten sonra B eriyiği hazırlanmış ve 0.45’lik por çapına sahip olan (Millipor) membran filtreler kullanılarak sterilize edilmiştir. A ve B eriyikleri birbirine karıştırılarak tüplere 5’er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından hazırlanan besiyeri katılaşana kadar yatık bir biçimde tutulmuştur (Harley ve Prescott, 2002; De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.15. Sitrat Agar Besiyeri

Sitrat Agarı.....: 25.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri pH’ı.....: 7.0

Otoklavda (121°C) 15 dakika boyunca sterilize edilmesinin ardından tüplerin içine 5’er ml olacak biçimde paylaştırılmıştır. Besiyerinin yatık halde tutularak katılaşması beklenmiştir (De La Haba ve ark., 2011; Caglayan, 2015).

2.1.1.16. %3 Tuz İçeren Agarlı Jelatin Besiyerinin Hazırlanması

Proteaz Pepton: 5.0 g

(D)-Glukoz: 1 g

Maya ekstraktı: 6 g

Jelatin: 10.0 g

Agar (Sigma): 25 g

TS3.....:1000 ml

Besiyerinin pH değeri 7.5’e ayarlandı ardından otoklavda 121°C’de 20 dakika boyunca sterilize edildi (De La Haba ve ark., 2011).

2.1.1.17. %3 Tuz İçeren Agarlı Ksilan Besiyerinin Hazırlanması

Ksilan.....: 1.0 g

Agar (Sigma).....: 10.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edildi (De La Haba ve ark., 2011).

2.1.1.18. %3 Tuz İçeren Agarlı Pullulan Besiyerinin Hazırlanması

Pullulan.....: 1.0 g

Agar (Sigma).....: 10.0 g

TS3.....: 1000 ml

Besiyerinin hazırlandıktan sonra otoklavda (121°C) 20 dakika boyunca sterilize edildi (De La Haba ve ark., 2011).

2.1.1.19. ONPG Testi İçin Besiyerinin Hazırlanması

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril özeyle alınarak ONPG diski içeren %3 tuz içeren tuzlu su (0.2 ml) çözeltisine ekim yapılmıştır (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.1.20. Karbonhidrat Fermantasyon Ortamı

Fenol Kırmızısı.....: 0.002 g

Maya ekstraktı.....: 0.6 g

TS3.....: 100 ml

Yukarıda sayılan malzemeler hazırlanıp tüplere konulmuştur ve otoklavda 121 °C’de 20 dakikada steril edilmesinin ardından D-ksiloz, ksilitol, D-mannoz, D-riboz, sukroz’dan %1 oranında alınarak steril tüplere konulmuştur. Test edilecek karbon kaynaklarından 1’er gram alınarak zayıf halofil bakteriler için hazırlanmış 10 ml TS3 ile karıştırılmış ardından karbon kaynaklarının çözülmesinin ardından 0.45 µm’lik por çaplı (Millipor) membran filtreler yardımıyla sterilize edilmiştir ve hazırlanmış olan fermentasyon ortamına eklenmiştir (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.1.21. Aminoasit Dekarboksilaz Besiyerinin Hazırlanması

Piridoksal.....: 0.004 g
Glikoz.....: 0.5 g
Et ekstraktı.....: 5.0 g
Pepton.....: 6 g
Saf su.....: 1000 ml

Bromkrezol Moru

Bromkrezol moru indikatörü.....: 0.20 g
Saf su: 100 ml

Krezol Kırmızısı

Krezol kırmızısı indikatörü.....: 0.20 g
Saf su.....: 100 ml

Besiyerinin hazırlanmasının ardından içine bromkresol morundan 5.0 ml ve kresol kırmızısından 2.5 ml ilave edilmiş ve son hacim 2.7 ml olarak ayarlanmıştır. Ardından otoklavda 15 dakika steril edildikten sonra %1'lik amino asit çözeltilerinden hazırlanıp 0.45 µm membran filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra 0.3 ml bu çözeltilerden alınarak 2.7 ml olarak ayarlanmış amino asit dekarboksilaz besiyerini bulunduran tüplere eklenmiştir (Caglayan, 2015).

2.1.1.22. %30 Tuz Bulunan Stok Steril Tuzlu Su Çözeltisinin Hazırlanması (TS30)

Sodyum klorür.....: 234 g
Sodyum bromür.....: 0.6 g
Magnezyum klorit.....: 40 g
NaHCO₃.....: 0.20 g
Magnezyum sülfat.....: 61.0 g
Potasyum klorür.....: 6 g
Kalsiyum klorür.....: 1 g

Saf su.....: 1 l

Yukarda sayılan maddeler birbiri içinde iyice çözüldükten sonra filtre kağıdı kullanılarak süzöldü (Ventosa, 2006; Yılmaz, 2010; Caglayan, 2015).



2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin İçeriği ve Kimyasal Maddeler

%3 Tuz Bulunan Steril Tuzlu Su (TS3), 1 M HCl, 1 M NaOH, Tris-EDTA (TE) Tampon Çözeltisi, 5 M NaCl Çözeltisi, %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) Stok Solüsyonu (pH 8), %10 Setil trimetil-amonyum bromür Solüsyonu (CTAB), Proteinaz K, Ribonükleaz (RNaz) Enzimi, Lizozim Enzimi, 50X TAE Stok Tampon, 1X TAE Çalışma Tamponu, Agaroz Jel, dNTP Karışımı, DNA-Ladder, Jel Yükleme Boyası, Kloroform:izoamil alkol (24:1) Çözeltisi, Primerler, Safranin Boyası, %95'lik Etil Alkol, Kristal Viyole Boyası, Gram'ın İyot Çözeltisi, Katalaz Testi Ayıracı, Oksidaz Test Ayıracı, Kongo Kırmızısı Ayıracı, Frazier Ayıracı, Aminoasit Solüsyonları (%1'lik), Bakteriyosin Aktivitesi İçin Proteinaz K ve Lipaz Enzim Çözeltilerin Hazırlanması, Antimikrobiyal Madde'nin Stok Solüsyonu, 0.5 No'lu McFarland Bulanıklık Standardı.

2.1.2.1. %3 Tuz Bulunan Steril Tuzlu Su Çözeltisinin Hazırlanması (TS3)

TS30.....: 330.0 g

Saf su.....: 670 ml

Çözelti hazırlandıktan sonra otoklavda (121 °C) 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir (Yılmaz, 2010; Caglayan, 2015).

2.1.2.2. 1 M HCl Çözeltisinin Hazırlanması

1000 ml distile su alınarak içinde 36.5 gram HCl çözünerek hazırlanmıştır (Caglayan, 2015).

2.1.2.3. 1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması

1000 ml distile su alınarak içinde 39.99 gram NaOH çözünerek hazırlanmıştır (Caglayan, 2015).

2.1.2.4. Tris-EDTA (TE) Tampon Çözeltisi

EDTA (1 mM): 0.093 g

Tris HCl (10 mM).....: 0.30 g

Saf su.....: 250 ml

pH'ı 8'e ayarlandıktan sonra 20 dakika otoklavda (121°C) steril edilmiş ve tampon çözelti hazırlanmıştır (Bozoğlu, 2014).

2.1.2.5. 5 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanışı

Sodyum klorür (NaCl).....: 292.2 g

Saf steril su.....: 1000 ml

1000 ml steril saf su alınmış ve içerisinde 292.2 gram NaCl çözülerek hazırlanmıştır (Yılmaz, 2010).

2.1.2.6. %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) Stok Solüsyonu (pH 8)

%10 SDS Solüsyonu.....: 10.0 g

Saf su.....: 100 ml

Otoklavda (121°C) 15 dakika boyunca sterilize edilerek daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edildi (Yılmaz, 2010).

2.1.2.7. %10 Setil trimetil-amonyum bromür Solüsyonu (CTAB)

Sodyum klorür.....: 4,10 g

%10 CTAB.....: 10.0 g

Saf su.....: 100 ml

Otoklavda (121°C) 15 dakika sterilize edildi ardından daha sonra kullanılmak için muhafaza edildi (Yılmaz, 2010).

2.1.2.8. Proteinaz K Enziminin Hazırlanması

Proteinaz K.....: 20 mg

Saf su.....: 1000 ml

Enzim, eppendorf tüplere alınarak -20 °C sıcaklıkta daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edildi (Yılmaz, 2010).

2.1.2.9. Ribonükleaz (RNaz) Enziminin Hazırlanması

Ribonükleaz enzimi.....: 0.10 g

Sodyum klorür.....: 0.40 g

Saf su.....: 25 ml

Ribonükleaz enzimi hazırlandıktan sonra 1.5 ml'lik eppendorf tüplerde -20 °C sıcaklıkta daha sonra kullanılmak için saklandı (Yılmaz, 2010).

2.1.2.10. Lizozim Enziminin Hazırlanması

Lizozim enzimi.....: 20 mg

Saf su.....: 1000 ml

Enzim hazırlandıktan sonra eppendorf (1.5 ml) tüplerde -20 °C'de daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edildi (Yılmaz, 2010).

2.1.2.11. 50X Tris-acetate EDTA (TAE) Stok Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Glasial asetik asit.....: 57.1 ml

Tris-base.....: 242.0 g

EDTA (0.5M).....: 100 ml

Steril distile suyla 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 8.3'e ayarlandı (Yılmaz, 2010).

2.1.2.12. 1X Tris-acetate EDTA (TAE) Çalışma Tamponu Hazırlanması

Yukarda belirtildiği şekilde 50X TAE Stok Çalışma Tamponu hazırlanmıştır. Ardından 20 ml 50X TAE Çalışma Tamponu alınmış üzeri distile suyla 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TAE Çalışma Tamponundan elde edilmiştir (Yılmaz, 2010).

2.1.2.13. Agaroz Jelin Hazırlanması

1X TAE Çalışma tamponundan 40 ml alınmış ve temiz bir erlene konulmuştur. Ardından 0.4 gram agaroz alınarak tamponun bulunduğu erlene eklenmiştir. Erlen mikrodalgada fırında 1-2 dakika bekletilerek agarozun tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Mikrodalgadan çıkarıldıktan sonra jelin 2 dakika soğuması beklenmiştir. Ardından jel tepsisinin içine dökülmüştür (Yılmaz, 2010).

2.1.2.14. dNTP Karışımının Hazırlanması

dNTP karışım.....: 120 µl

Steril ddH₂O.....: 880 µl

Eppendorf tüpte -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir (Yılmaz, 2010).

2.1.2.15. DNA-Ladder

DNA-Ladder (1 kb): 10 µl

6X DNA yükleme boyası.....: 100 µl

Malzemeler eppendorf tüpe alınarak + 4 °C’de muhafaza edilmiştir (Yılmaz, 2010).

2.1.2.16. Jel Yükleme Boyasının Hazırlanması

Bromofenol mavisi.....: 25 mg

Ksilen siyanol.....: 25 mg

Gliserol.....: 3.3 ml

ddH₂O.....: 6.7 ml

Agaroz jel elektroforezinde DNA ve PCR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara yüklenerek görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Jel yükleme boyası hazırlandıktan sonra DNA ve PCR ürünleri ile karıştırılmıştır (Yılmaz, 2010).

2.1.2.17. Kloroform:izoamil alkol (24:1) Çözeltisinin Hazırlanması

24 ml kloroformdan alınarak 1 ml izoamil alkol ile karıştırılmıştır. Çözelti hazırlandıktan sonra -20°C’de saklanmıştır (Bozoğlu, 2014).

2.1.2.18. Primerlerin Hazırlanması

Primerler.....: 10 µl

ddH₂O.....: 90 µl

Primerler hazırlandıktan sonra eppendorf tüpe alınarak -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Yılmaz, 2010).

2.1.2.19. Safranin Boya Çözeltisinin Hazırlanması (100 ml)

Etil alkol (%95).....: 100 ml

Safranin: 0.25 g

Sodyum klorür (NaCl).....: 5 g

Saf su: 1 l

2.1.2.20. %95'lik Etil Alkol Çözeltisinin Hazırlanması

95 ml etil alkol alındıktan sonra sterilize distile suyla son hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve etil alkol çözeltisi hazırlanmıştır (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.2.21. Kristal Viyole Boyasının Hazırlanması

A Çözeltisinin Hazırlanması

(%85) Kristal viyole.....: 2.0 g

(%95) Etanol.....: 20 ml

B Çözeltisinin Hazırlanması

Amonyum oksalat tuzu: 0.80 g

Sterilize su: 80 ml

İki çözelti (A ve B) hazırlandıktan sonra birbirine eklenerek karıştırıldı (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.2.22. Gram'ın İyot Çözeltisinin Hazırlanması

Sodyum klorür.....: 6.0 g

Potasyum iyodür.....: 2.0 g

İyot kristali.....: 1.0 g

Saf su.....: 300 ml

İyot kristallerinden 1.0 gram ve potasyum iyodürden (KI) 2.0 gram alınmıştır. Havan içinde ezildikten sonra üzerine steril distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Ardından son hacmi 300 ml olacak şekilde distile su yardımıyla tamamlanmıştır. Çözelti bu şekilde hazırlandıktan sonra kahverengi amber şişeye alınarak muhafaza edilmiştir (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.2.23. Katalaz Testi Ayıracı

%3 H₂O₂ (Hidrojen peroksit).....: 3 ml

Saf su.....: 1 l

2.1.2.24. Oksidaz Test Ayıracı

Tetrametil-p-fenildiamin-dihidroklorit ayıracı.....: 1.0 g

Saf su.....: 1 l

2.1.2.25. Kongo Kırmızısı Ayıracı

Congo red.....: 0.1 g

Saf su.....: 1 l

2.1.2.26. Frazier Ayıracı

Civa klorür.....: 12.4 g

Hidroklorik asit.....: 16.0 ml

Steril saf su.....: 1 l

2.1.2.27. Aminoasit Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız amino asit solüsyonları aşağıda gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

%1 (L)-sistein aminoasiti

Sistein: 10.0 g

dH₂O.....: 100 ml

%1 (L)-glisin aminoasiti

Glisin.....: 10.0 g

dH₂O.....: 100 ml

%1 (L)-alanin aminoasiti

Alanin.....: 10.0 g

dH₂O.....: 100 ml

%1 (L)-treonin aminoasiti

Treonin.....: 10.0 g

dH₂O.....: 100 ml

%1 (L)-arjinin aminoasiti

Arjinin.....: 10.0 g

dH₂O.....: 100 ml

2.1.2.28. Bakteriyosinin Antibakteriyel Etkisinin Proteinaz K ve Lipaz Enzimlerinden Etkilenip Etkilenmediğini Tespit Etmek İçin Gerekli Olan Çözeltilerin Hazırlanması

Proteinaz K enzimi 10 mM fosfat buffer içerisinde (pH 7), lipaz enzimi ise Tris-HCl tampon çözeltisi (0.05 M) ve CaCl₂ (pH 8'de, 0.01 M) içerisinde hazırlanmıştır. Ardından bu enzim çözeltileri (10 mg/ml) filtre yardımıyla (HiMedia) steril edilmiş daha sonra bakteriyosin aktivite tayininde kullanılmıştır (Moraes ve ark., 2010; Rajesh ve ark., 2012).

2.1.2.29. Antimikrobiyal Madde Stok Solüsyonu Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan sodyum dimetilditiyokarbomat aktif içeriğe sahip antimikrobiyal maddenin hazırlanması için ilk olarak bu kimyasaldan 200.000 mg tartılmış ve steril bir erlene konulmuştur. Ardından 1000 ml distile su alınarak kimyasal maddenin bulunduğu erlene eklenmiş ve karıştırılmıştır. Stok antimikrobiyal madde solüsyonu elde edilmiştir (Caglayan, 2018).

2.1.2.30. 0.5 No'lu McFarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması

0,18 M sülfirik asitten (H₂SO₄) 9.9 ml ve 0.048 M baryum klorürden (BaCl₂) 0.1 ml alındıktan sonra iyice karıştırılarak hazırlanmıştır (Caglayan, 2018).

2.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümünde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki Etüv (Nüve EN500), Dansitometre, Pasteur Fırını (Kermanlar), Otoklav Cihazı, Distile Su Cihazı, Vortex (Nüve), Çalkalamalı Etüv (Edmund Bühler), Steril Güvenlik Kabini, Mikroskop (Olympus), Buzdolabı (Arçelik), Santrifüj Cihazı (Sigma), Hassas Terazî (Sartorius Analytic), Güç Kaynağı, Jel Yürütme Tankı, Jel Görüntüleme Cihazı, Elektroforez Tankı, pH Metre (WTW), Çeker Ocak, Mikrodalga Fırın (Arçelik) ve PCR cihazları kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

- 1. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinin Tuzla (İstanbul) Organize Deri Sanayi Bölgesinde Bulunan Tabakhanelerden Alınması,**
- 2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi,**
- 3. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Proteaz Üreten Toplam Zayıf Halofil ve Lipaz Üreten Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi,**
- 4. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilmesi,**
- 5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyon Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması,**
- 6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması,**
- 7. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması,**
- 8. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Gram Boyama Reaksiyonlarının Yapılması,**
- 9. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi,**
- 10. Zayıf Halofil Bakterileri İzolatlarının Biyokimyasal Testlerinin Yapılması,**
- 11. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu Yapılması,**
- 12. İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroza Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi,**
- 13. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR ile 16S rRNA Gen Dizilerinin Amplifikasyonu,**
- 14. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde Kontrol Edilmesi,**
- 15. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizilerinin Tespit Edilmesi ve Filogenetik Analizlerinin Yapılması,**
- 16. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması ve Birbirlerine Karşı Oluşturduğu İnhibisyonların Belirlenmesi,**

17. Tuzlanmış ve Depolanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakterilerin Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Tespit Edilmesi.

2.2.1. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinin Tuzla (İstanbul) Organize Deri Sanayi Bölgesinde Bulunan Tabakhanelerden Alınması

Çalışmamızda kullandığımız 10 adet tuzlanmış ve 6 ay 20 °C’de depolanmış koyun derisi numuneleri Tuzla/İstanbul Organize Deri Sanayi Bölgesinde bulunan farklı tabakhanelerden 2023 yılının Şubat ayında alınarak steril poşetlere konmuş ve hemen incelenmek üzere buz küpleri ile muhafaza edilerek laboratuvara taşınmıştır.

2.2.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinde bulunan toplam zayıf halofil bakteri sayılarını tespit etmek için 10 adet tuzlanmış koyun derisi örneklerinin her birinden 10’ar gram kesilip 90 ml %3 NaCl içeren steril tuzlu su (TS3) içine konulmasının ardından çalkalayıcı etüvde 100 rpm’de 3 saat çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra hazırlanan deri süspansiyonlarından 1’er ml alınmış ve 9 ml %3 NaCl (TS3) içeren steril tuzlu su içine eklenmiştir. Ardından vortex yardımıyla karıştırılarak 10^{-1} ’lik dilüsyon elde edilmiştir. Bu seyreltme işlemi 10^{-6} ’lık dilüsyona kadar devam etmiştir. Toplam zayıf halofilik bakteri sayısını tespit etmek için hazırlanan bakteri dilüsyonlarından (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak %3 tuz içeren Kompleks Besiyerinin ortasına konulmuştur. Hazırlanmış olan bakteri dilüsyonları drigalski spatülü yardımıyla yayma plak tekniği ile yayılmış ve petriler 37 °C’de etüvde 24 saat inkübe edilmesinin ardından besiyerinde üreyen bakteri kolonileri sayılmıştır. Elde edilmiş olan koloniler seyreltme katsayısıyla çarpılarak tuzlanmış koyun derisi örneklerinde bulunan zayıf halofil bakteri sayıları tespit edilmiştir (Gonzales ve ark., 1978; Harley ve Prescott, 2002; Yılmaz, 2010; Caglayan, 2015).

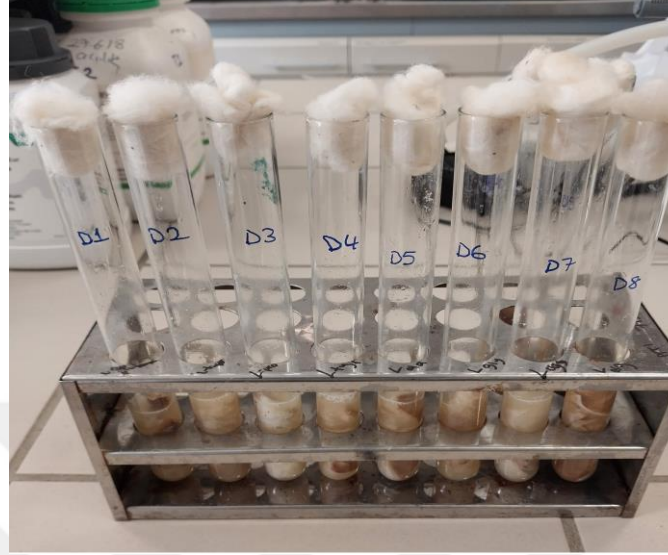
2.2.3. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Proteaz Üreten Toplam Zayıf Halofil ve Lipaz Üreten Toplam Zayıf Halofil Bakteri Sayısının Tespit Edilmesi

Tuzlanmış koyun derilerinde bulunan proteaz üreten zayıf halofilik bakteri sayısı ve lipaz üreten zayıf halofilik bakteri sayılarını tespit etmek için deri örneklerinden 10 gram tartıldıktan sonra 90 ml %3 NaCl içeren steril tuzlu su (TS3) çözeltisinin bulunduğu tüplere konularak 3 saat etüvde 100 rpm’de çalkalamaya bırakılmıştır. Ardından bu deri süspansiyonlarından 1’er ml alınmış ve içinde 9 ml %3 NaCl içeren steril tuzlu su (TS3) bulunan tüplerin içine eklenmiş vortex yardımıyla karıştırılarak 10^{-1} ’lik dilüsyon hazırlanmıştır. Bu seyreltme işlemi 10^{-6} ’lık dilüsyona kadar devam etmiştir. Ardından hazırlanan bu bakteri dilüsyonlarından mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak %3 tuz içeren Jelatin ve Tween 80 Besiyerlerine yayma plak tekniği ile yayılmış ve petrilere 37°C’de etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra Jelatin Besiyerinde üreyen zayıf halofil bakteri kolonilerinin bulunduğu petrilere Frazier ayırıcından dökülmüştür. Bakteri suşlarının etrafında oluşan opak zonlar pozitif proteaz aktivitesi kabul edilmiştir. Proteaz pozitif koloniler sayılmıştır. Lipaz aktivitesini tespit etmek için Tween 80 Besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinin etrafında oluşan opak bölgeler tespit edilmiştir ve pozitif lipaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. Lipaz pozitif koloniler sayılmıştır. Ardından koloni sayıları seyreltme katsayısı ile çarpılmış ve tuzlanmış koyun derisi örneklerinde bulunan proteolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı ve lipolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı tespit edilmiştir (Berber, 2009; Yılmaz, 2010; Caglayan, 2018).

2.2.4. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilmesi

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden zayıf halofil bakterilerin izole edilmesi için herbir deri örneğinden 10 gram tartılarak 90 ml %3 NaCl içeren steril tuzlu su (TS3) çözeltisini içeren tüplere konulmuştur ve 3 saat boyunca, 37°C’de etüve 100 rpm’de çalkalamaya bırakılmıştır. Ardından hazırlanmış olan deri süspansiyonlarından mikropipet yardımıyla 1’er ml alınarak içinde 9 ml %3 NaCl içeren steril tuzlu su (TS3) bulunan tüplere eklenmiştir. Vortex yardımıyla karıştırılarak 10^{-1} ’lik dilüsyon elde edilmiştir. Seyreltme işlemi 10^{-6} ’lık dilüsyona kadar devam etmiştir. Hazırlanan bakteri dilüsyonlarından (10^{-1} - 10^{-6}) mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak %3 tuz içeren Kompleks Besiyerinin ortasına konulmuştur. Yayma plak tekniği ile petrilere yayıldıktan sonra 37°C’de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından besiyerlerinde üremiş olan bakteri kolonilerinden morfolojik olarak farklı olduğumuzu düşündüğümüz koloniler seçilmiş ve steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine çizgi ekim

teknikiyle ekilmiştir. Saf bakteri kültürleri elde edilinceye kadar işlem tekrar edilmiştir (Şekil 2.1) (Harley ve Prescott, 2002; Berber, 2009; Yılmaz, 2010).



Şekil 2.1. Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzolasyonu.

2.2.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyon Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofilik bakteri kolonilerinin optimum gelişme koşullarını tespit etmek için her bir zayıf halofil bakteri izolatı steril öze yardımıyla alınarak tuz içermeyen ve %0.5, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 tuz içeren Kompleks Besiyerlerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37°C’de etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ekim yapılmış petriler inkübasyon süresi boyunca izlenerek bakterilerin gelişebildiği optimum tuz konsantrasyon değerleri belirlenmiştir (Caglayan, 2015).

2.2.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakteri izolatlarının optimum geliştiği pH değerlerini tespit etmek için pH’ı 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olacak şekilde ayarlanmış %3 tuz içeren Kompleks Besiyerlerine ekilmiştir. Petriler 37°C’de etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Petriler inkübasyon süresince izlenerek zayıf halofil bakteri izolatlarının gelişebildiği optimum pH değerleri belirlenmiştir (Berber, 2009; Yılmaz, 2010).

2.2.7. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakteri izolatlarının gelişebildiği optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek için her bir zayıf halofil bakteri izolatu steril bir öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine ekilmiştir. Ardından sıcaklıkları 4, 10, 20, 28, 37, 45 ve 55°C olacak şekilde ayarlanmış etüvlerde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Petriler inkübasyon süresi boyunca izlenerek zayıf halofil bakteri izolatlarının gelişebildiği optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Caglayan, 2015).

2.2.8. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Gram Boyama Reaksiyonlarının Yapılması

Zayıf halofil bakteri izolatlarının Gram boyamalarını yapmak için ilk olarak 24 saatlik saf bakteri kolonileri steril bir öze yardımı ile alınmış, %3 tuz içeren steril tuzlu su (TS3) ile sulandırılmıştır. Daha sonra bakteri izolatları steril bir özeyle alınarak lamın üzerine yayıldıktan sonra 1-2 dakika kurumaya bırakılmıştır. Lam kuruduktan sonra 3 kez bek alevinden geçirilip bakterilerin lama fikse edilmesi sağlanmıştır. Fiksasyon işleminin ardından lama kristal viyole boyasından damlatılıp 1 dakika beklendikten sonra distile su ile lam 5 saniye yıkanmış ve boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. Lamın üzerine Gramın iyot çözeltisinden damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir distile suyla tekrar lam yıkanarak boya akıtılmıştır. Ardından %95 alkol damlatılarak 20 saniye beklenmiştir ve distile su ile yıkanarak alkol uzaklaştırılmıştır. Son olarak da lam üzerine safranin boyası damlatılarak 1 dakika beklendikten sonra lam havada kuruması için bırakılmıştır. Boyama sonrasında preparatlar mikroskopta (10x100) immersiyon objektif ile incelenmiştir. Mikroskopta inceleme sonrasında pembe-kırmızı renkli bakteri suşları Gram (-) olarak, mor renkli bakteri suşları Gram (+) olarak değerlendirilmiştir (Harley ve Prescott, 2002; Yılmaz, 2010).

2.2.9. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi

2.2.9.1. Amilaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Nişasta Besiyerine çizgi plak tekniği ile ekim yapılmıştır. Ardından petriler etüvde 37 °C’de 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından Nişasta Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri kolonilerinin üzerine Gramın iyot çözeltisinden dökülmüştür. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf bölge pozitif amilaz aktivitesi olarak değerlendirildi (Caglayan ve ark., 2015).

2.2.9.2. Lipaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril bir öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Tween 80 Besiyerine çizgi plak tekniğiyle ekilmesinin ardından petriler 37°C'de 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan opak zonlar pozitif lipaz aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Berber, 2009; Caglayan, 2015).

2.2.9.3. Selüloz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak karboksimetilselüloz bulunan (CMC) Selüloz Besiyerine çizgi plak tekniğiyle ekilmesinin ardından petriler etüvde 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından Selüloz Besiyerinde üreyen zayıf halofil bakteri kolonileri önce 30 dakika %0.1'lik Kongo kırmızısı ayırıcı ile boyanmıştır. Ardından 1 M NaCl çözeltisiyle yıkanmıştır. Zayıf halofil bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf bölge pozitif selüloz aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.2) (Harley ve Prescott, 2002).



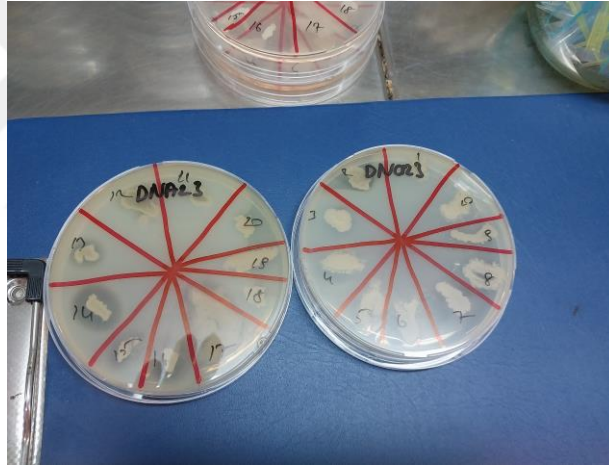
Şekil 2.2. Selüloz Aktivitesi Testi.

2.2.9.4. Üreaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak yatık şekilde hazırlanmış Üre Agar Besiyerine ekilmiştir. Petriler 37°C’de etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından besiyerinin pembe renge dönmesi pozitif üreaz aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Yılmaz, 2010; Caglayan, 2015).

2.2.9.5. DNaz Aktivitesi

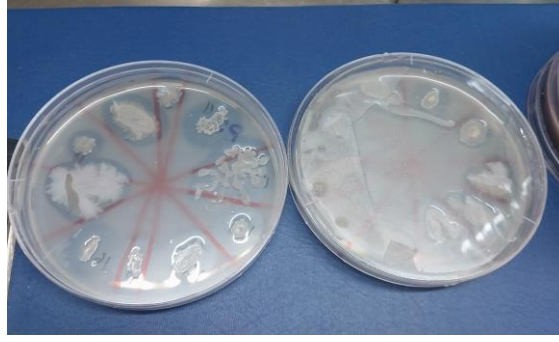
%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren DNaz Besiyerine çizgi plak tekniği ile ekilmiş ardından petri kapları 37°C’de etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarının üzerini örtecek kadar 1 M HCl damlatılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zon pozitif DNaz aktivitesi olarak değerlendirildi (Şekil 2.3) (Harley ve Prescott, 2002; Yılmaz, 2010).



Şekil 2.3. DNaz Aktivitesi Testi.

2.2.9.6. Proteaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Jelatin Besiyerine çizgi plak tekniğiyle ekim yapılarak petriler etüvde 37°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından petri kaplarına Frazier ayırıcından dökülmüştür. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zonlar pozitif aktivite olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.4) (Berber, 2009; Caglayan ve ark., 2017).



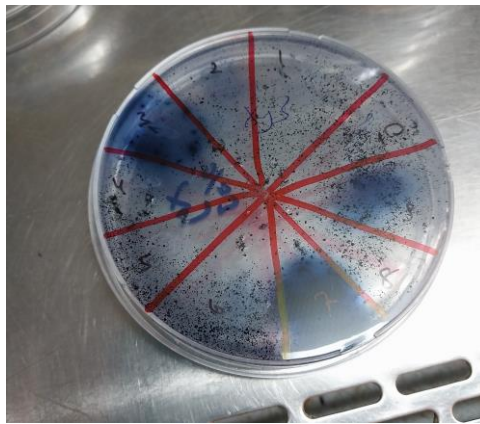
Şekil 2.4. Proteaz Aktivitesi Testi.

2.2.9.7. Pullulanaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Pullulan Besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekildikten sonra petriler 37°C’de 24 saat etüvde inkübasyon için bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafındaki şeffaf bölgeler pozitif aktivite olarak kabul edilmiştir (Ventosa ve ark., 1989; Caglayan, 2015).

2.2.9.8. Ksilanaz Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak %3 tuz içeren Ksilan Besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildikten sonra petriler 37 °C’de etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zonlar pozitif ksilanaz aktivitesi olarak kabul edilmiştir (Ventosa ve ark., 1989) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ksilanaz Aktivitesi Testi.

2.2.9.9. β -galaktosidaz Aktivitesi

β -galaktosidaz enzimi bir disakkarit olan laktozun glikoz ve galaktoza hidroliz olmasını katalizleyen bir enzimdir. Zayıf halofil bakteri izolatlarının β -galaktosidaz enzim aktivitesini tespit etmek için %3 tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri kolonilerinden öze yardımıyla alınarak içinde ONPG diski bulunan 0.2 ml, %3 tuz içeren steril tuzlu su çözeltisinin (TS3) bulunduğu tüplere ekilmiştir. Daha sonra bu tüpler 37°C’de 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır. Tüplerdeki sıvının renginin sarıya dönmesi pozitif aktivite olarak değerlendirilmiştir (Caglayan, 2015; Harley ve Prescott, 2002).

2.2.10. Zayıf Halofil Bakterileri İzolatlarının Biyokimyasal Testleri

2.2.10.1. Katalaz Testi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla temiz bir lamın üzerine alınmıştır. Ardından kolonilerin üzerine birkaç damla hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak beklenmiştir. Bakteri kolonilerinin üzerinde hava kabarcıklarının oluşması katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Harley ve Prescott, 2002).

2.2.10.2. Sitrat Aktivitesi

%3 Tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla alınarak yatık şekilde hazırlanmış Sitrat Besiyerine çizgi plak yöntemiyle ekim yapıldıktan sonra etüvde 37°C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerlerinin renginin maviye dönmesi pozitif aktivite olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.6) (Harley ve Prescott, 2002).



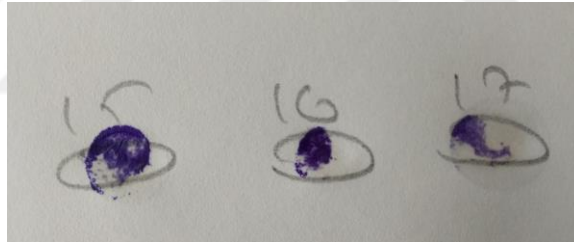
Şekil 2.6. Sitrat Testi.

2.2.10.3. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Çalışmamızda test etmek istediğimiz karbonhidratlar (D-ksiloz, D-mannoz, D-riboz, ksilitol sukroz) 0.45 µm (millipor) membran filtreler yardımıyla steril edildi ve %1 oranında temiz tüplere konulmuştur. Ardından fenol kırmızısı bulunan karbonhidrat fermentasyon ortamından 1'er ml alınarak tüplere eklenmiştir. Besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra zayıf halofil bakteri izolatları steril bir öze ile alınarak hazırlanan besiyerlerine ekilmiştir ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri renginin sarıya dönüşmesi pozitif sonuç kabul edilmiştir (Caglayan, 2015; Harley ve Prescott, 2002).

2.2.10.4. Oksidaz Testi

Tetrametil-p-fenildiamin-dihidroklorit ayıracından filtre kâğıdı üzerine birkaç damla damlatıldı. Ardından %3 tuz içeren Kompleks Besiyerinde gelişen zayıf halofil bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımıyla alınarak ayıraç damlatılmış filtre kâğıtlarına sürülmüş ve 20 saniye beklendikten sonra mavi-mor rengin oluşması pozitif oksidaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Harley ve Prescott, 2002) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Oksidaz Testi.

2.2.10.5. Dekarboksilaz Testi

%1 oranda steril amino asit solüsyonlarının (L-alanin, L-arjinin, L-glisin, L-sistein, L-treonin) ve Aminoasit Dekarboksilaz Besiyerinin bulunduğu tüplere zayıf halofil bakteri izolatlarından alınarak ekim yapılmıştır. Ardından 37°C etüvde 24 saat boyunca inkübasyon için bırakıldıktan sonra izolatların üzerini örtecek kadar mineral yağ dökülmüştür. Besiyerinde bulunan glukoz, bakteri kolonileri tarafından fermentasyona uğrarsa renk sarıya, amino asitler fermentasyona uğrarsa son ürün olarak ortaya çıkan alkali amin bileşiklerinden dolayı renk mora dönüşmektedir (Şekil 2.8) (Harley ve Prescott, 2002).



Şekil 2.8. Dekarboksilaz Testi.

2.2.11. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu Yapılması

Tuzlanmış koyun derilerinden izole edilen zayıf halofil bakteri izolatlarının DNA izolasyon işlemi aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır:

Zayıf halofil bakteri kolonilerinin gelişmesi için %3 tuz içeren sıvı Kompleks Besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvı Kompleks Besiyerlerinden temiz tüplerin içine 5'er ml alınmış ve 121 °C'de otoklavda 20 dakika boyunca steril edilmiştir. Ardından zayıf halofil bakteri izolatlarından steril bir öze yardımıyla alınarak hazırlanan sıvı Kompleks Besiyerlerine ekim yapılarak 24 saat boyunca 37°C'de etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyerlerinden alınarak (1,5 ml) mikrosantrifüj tüplerine eklenmiş, 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında üstte kalan faz dökülmüştür ve pelletle devam edilmiştir. Pelletin üzerine tekrar besiyerinden eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Bu işlem üçer kez tekrarlandıktan sonra 558 µl TE tamponundan pellete eklenmiş ardından vortex yardımıyla karıştırılarak pelletin homojen olması sağlanmıştır. Homojen olan bakteri süspansiyonlarına (pellet) sırayla 30 µl %10 SDS solüsyonundan, 6 µl Proteinaz K enziminden, 6 µl RNaz enziminden ve 37 µl lizozimden ilave edilerek çalkalayıcıda 37 °C'de 1 saat bırakılmıştır. Ardından mikrosantrifüj tüplerine 5 M NaCl solüsyonundan mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak ilave edilmiştir ve tüpler hafifçe çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra 65°C'de bekletilmiş olan CTAB solüsyonundan mikropipetle 80 µl alınarak mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir ve 65°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Süre bittikten sonra (24:1) kloroform:izoamil alkol karışımından 800 µl alınarak mikrosantrifüj tüplerine eklenmiş, 5 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından tüplerde iki ayrı faz oluşmuştur.

Üstteki fazda izole etmek istediğimiz DNA, alttaki fazda ise kloroform ve önemsiz kısımlar toplanmıştır. Üstte kalan faz mikropipet yardımıyla temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ardından tekrar kloroform eklenerek 12000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Bu adım bir kez daha yapıldıktan sonra 200 µl DNA alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konmuştur ve üzerine 120 µl izopropanol’den mikropipet yardımıyla eklenmiştir -20°C’de 30 dakika bekletilmiştir. İzopropanol ve DNA karışımı 13000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün dibinde kalan kısım izole ettiğimiz DNA’dır, tüpün üstünde kalan kısım ise önemsizdir ve dökülmüştür. Alkolün uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpleri ağzı açık bırakılarak 1 saat 37 °C’de bekletilmiştir ve mikrosantrifüj tüplerine mikropipet yardımıyla TE (pH:8) tamponundan 50 µl eklenerek DNA’nın çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen DNA örnekleri daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

2.2.12. İzole Edilen Genomik DNA’ların Agaroz Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakterilerden DNA izolasyon işlemi yapıldıktan sonra DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. DNA örneklerinin yürütülmesi için 250 ml’lik erlen alınarak içine 40 ml’lik 1X TAE (Tris-asetat EDTA) Çalışma Tamponu konmuştur. Ardından 0.4 gr agaroz tartılarak tampon çözeltisinin bulunduğu erlene eklenmiş ve karıştırılmıştır. Erlen mikrodalga fırında (560 °C) 2 dakika bırakılarak agarozun iyice çözünmesi için beklenmiştir. Agarozun çözünmesinin ardından mikropipet yardımıyla 2.5 µl etidyum bromür (EtBr) boyasından alınarak agarozun bulunduğu erlene eklenmiştir. Mikropipetin ucunda EtBr kalmaması için mikropipetin ucuyla jel ve boya karışımı pipetaj yapılarak birkaç kez çekilip bırakılmıştır. Ardından erlen hafifçe çalkalanmış, boya ve agarozun iyice karışması sağlanmıştır. Bu işlemten sonra elektroforez tankının içerisine jel tepsisi konmuştur. DNA örneklerinin yüklenmesi için jelde kuyucuk oluşturulması gerekmektedir bu amaçla jel tepsisinin içerisine tarak yerleştirilmiştir. Ardından, hazırlanan jel tepsinin içine dökülerek 10-15 dk jelin donması beklenmiştir. Jelin donmasının ardından tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Taze olarak hazırlanmış 1X TAE çalışma tamponundan alınarak agaroz jelin üzerini kaplayacak şekilde dökülmüştür. İlk kuyucuğa DNA-ladderden (1500 bp) 10 µl konulmuştur. Ladder-DNA’nın konmasının amacı izole ettiğimiz DNA ile arasında boyut kıyaslaması yapmaktır. Bu işlemin ardından parafilm alınarak dikkörtgen şeklinde kesilmiştir. Parafilmin üzerine izolat sayısı kadar (20 adet) mikropipetle 5 µl jel yükleme boyasından alınarak konmuştur. Her bakteri izolatına ait DNA örneğinden mikropipet yardımıyla 5 µl alınmış ve parafilm üzerinde bulunan 5 µl’lik jel yükleme boyası ile pipetaj

yapılarak karıştırılmıştır. 10 µl'lik bu karışımdan DNA-ladderinin yüklendiği birinci kuyucuğun yanında bulunan ikinci kuyucuktan başlanarak yüklenmiştir. Yükleme işlemleri tamamlandıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılıp (-) ve (+) uçlara sahip kablolar güç kaynağı aletine takılarak DNA örnekleri 30 dakika, 80 V, 100 mA elektrik akımı altında yürütüldükten sonra jel tanktan alınarak görüntüleme sistemiyle görüntülenmiştir. Görüntüler bilgisayara kaydedilmiş ardından yazıcı ile çıktıları alınmıştır (Yılmaz, 2010; Caglayan, 2015).

2.2.13. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR ile 16S rRNA Gen Dizilerinin Amplifikasyonu

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakterilerin PCR ile 16S rRNA genlerinin çoğaltılması için 20 adet 100 µl'lik PCR tüplerinden alınmış üzerlerine izolatların numarası yazılmıştır. Ardından her tüpte toplam 50 µl karışım olacak şekilde 10X PCR Tampon Çözeltisinden (500 Mm KCl, 100 Mm Tris-HCl, pH 8.3) 5 µl, deoksinükleotidtrifosfatlardan (dNTP) 8 µl, 25 mM MgCl₂'den 2.5 µl, forward (ileri) primeri ve reverse (geri) primerinden 2.5 µl, Taq polimeraz enziminden 0.5 µl, genomik DNA'dan 1 µl ve nükleaz içermeyen su (ddH₂O) 28 µl alınarak PCR tüplerine konulmuştur. Çalışmamızda *Bacteria*-spesifik primerler olan forward primeri 16F27; (5'-AGAG TTT GATCM TGGCTCAG-3) ve reverse primeri 16R1488; (5'-CGGT TACCT TGT TAGGA CTT CACC-3') PCR reaksiyonu için kullanılmıştır (Caglayan, 2015; Saiki ve ark., 1988). PCR için reaksiyon koşulları şu şekildedir: 95°C 5 dk 'Ön Denatürasyon' 25 döngü, 94°C 1 dakikalık 'Denatürasyon' (Denaturation), 50°C 1 dakikalık 'Hibridizasyon' (Annealing), 72°C 2 dakikalık 'Uzama' (Extension) ve 72°C 10 dakikalık 'Final Uzaması' ile reaksiyon sona erer (Saiki ve ark., 1988).

2.2.14. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrol Edilmesi

Zayıf halofil bakteri izolatlarına ait PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrol edilmesi için 250 ml'lik erlen alınarak içine 40 ml 1X TAE (Tris-asetat EDTA) Çalışma Tamponundan eklenmiştir. Ardından 0.4 gram agaroz tartılarak tamponun bulunduğu erlene eklenmiş ve karıştırılmıştır. Erlen mikrodalga fırında (560°C) 1 dakika bırakılmış ve agarozun iyice çözünmesi sağlanmıştır. Jel mikrodalga fırından çıkarıldıktan sonra 1-2 dakika soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan jelin üzerine mikropipetle 2.5 µl etidyum bromür (EtBr) boyasından eklenmiştir. Erlenmayer hafifçe elle çalkalanarak jel ve boyanın birbirine karışması sağlanmıştır.

Bu işlemten sonra elektroforez tankına jel tepsisi yerleştirilmiştir. Örneklerin yüklenmesi için kuyucuk oluşturmak amacıyla jel tepsinin içine tarak yerleştirilmiştir. Daha sonra, hazırlanan jel tepsinin içine dökülmüştür. Jelin donması beklendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Taze olarak hazırlanmış 1X TAE (Tris-asetat EDTA) Çalışma Tamponundan alınarak donmuş agaroz jelin üzerine jelin üstünü kaplayacak miktarda eklenmiştir. İlk kuyucuğa DNA-ladder (1500 bp) konmuştur. DNA-ladderinin konma amacı 16S rRNA ile boyut kıyaslaması yapmaktır. Bu adımdan sonra parafilm alınarak dikdörtgen şeklinde kesilmiştir ve üzerine mikropipet ile 5 µl'lik jel yükleme boyasından izolat sayısı kadar (20 adet) konulmuştur. Her bir PCR ürününden mikropipet yardımıyla 5 µl alınarak parafilm üzerinde bulunan jel yükleme boyasıyla pipetaj yaparak karıştırılmıştır. Toplam 10 µl olan karışım jele DNA-ladderin yüklendiği birinci kuyucuğun yanında bulunan ikinci kuyucuktan başlanarak yüklenmiştir. Yükleme işleminin bitmesinin ardından elektroforez tankının kapağı kapatılmış (+) ve (-) uca ait kablolar güç aletine takıldıktan sonra 30 dakika boyunca, 80 Volt, 100 Miliamperlik akımda agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Süre bittikten sonra güç aleti kapatılmış, jel elektroforez tankından alınarak görüntüleme makinesinde görüntülenmiştir. Görüntüleme sonrasında PCR ürünlerine ait olan bant görüntüleri bilgisayara kaydedilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

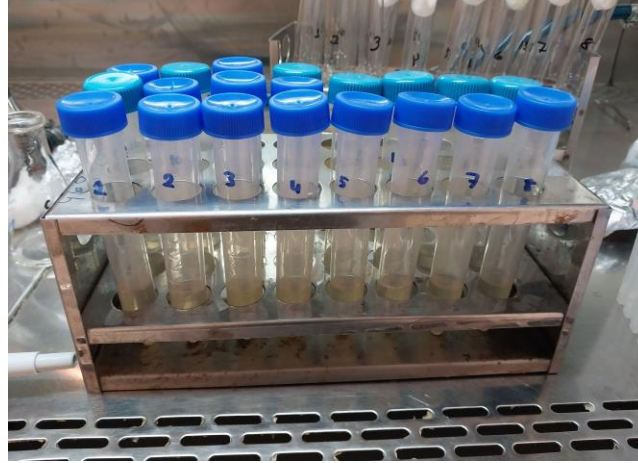
2.2.15. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizilerinin Tespit Edilmesi ve Filogenetik Analizlerinin Yapılması

Zayıf halofil bakteri izolatlarına ait 16S rRNA gen dizi analizleri *Bacteria*-spesifik primerler olan forward (ileri) primeri 16F27(5'-AGAG TTT GATCM TGGCT CAG-3') ve reverse (geri) primeri 16R1488(5'-CGGTTACCTTGTTAGGACT TCACC-3') yardımıyla Artı Biyoteknoloji Laboratuvarı tarafından hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. 16S rRNA dizilerindeki fazlalıklar ChromasPro Programı ile çıkarılarak temiz bir görüntü elde edilmiş ve FASTA formatında hazırlanmıştır. Ardından EZTAXON ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) gibi programlar kullanarak GenBank Veri Tabanı ve EMBL'de bulunan dizilerle karşılaştırılmış aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiştir (Birbir ve ark., 2004; Caglayan, 2018).

2.2.16. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması ve Birbirlerine Karşı Oluşturduğu İnhibisyonların Belirlenmesi

Zayıf halofil bakteri izolatlarının birbirine karşı bakteriyosin üretim yeteneklerini tespit etmek için bu suşlar 20 ml %3 tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde (37°C, 48 saat) çoğaltılmıştır.

Ardından bakteriyosin içeren süpernatantlar [CFS (cell-free supernatant)] hazırlanmıştır. Bunun için hücreler önce santrifüjle (8000 g, 10 dk, 4°C) uzaklaştırılmıştır. Hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantların (üst faz) pH'ı 7.0'ye ayarlanarak, 0.45 µm filtreden (Millipore) geçirilmiş ve steril bakteriyosin elde edilmiştir. Bakteriyosin üretiminin tespit edilmesi için Agar Damlatma Methodu bu çalışmada kullanılmıştır. Her bir zayıf halofilik bakteri izolatu 20 ml %3 tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde 37°C etüvde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu bakteri solüsyonlarından steril tüplere alınmış ve her bir tüpün bulanıklığı dansitometre ile McFarland 0.5'e (10^8 kob/ml) ayarlanmıştır. Tüplerdeki isolatlar steril eküvyon çubukları yardımıyla %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine ekilmiştir. Ekim yapılan petrilere mikropipet yardımıyla 3 µl hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatanttan (CFS) küçük damla hâlinde konulmuştur ve bakteriyosinin bulunduğu bölge kalemle işaretlenmiştir. Petriler bakteriyosin besiyerine nüfus edene kadar dışarda bekletilmiştir. Besiyerine nüfus ettikten sonra petriler ters çevrilerek etüve yerleştirilmiştir ve 48 saat sonunda incelenerek kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zonlar tespit edilmiştir. Buradan çıkan sonuçlara göre bakteriyosin üreten isolatlar, bakteriyosine hassas isolatlar ve bakteriyosine dirençli isolatlar tespit edilmiştir (Şekil 2.9) (Martinez ve ark., 2000; Biscola ve ark., 2013; Zafar ve ark., 2022).



Şekil 2.9. Bakteri İzolatlarından Bakteriyosin İçeren Süpernatantların Eldesi.

Çevresel faktörlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkilerini incelemek için hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantlar (CFS) farklı sıcaklık, pH, tuz konsantrasyon değerleriyle ayrıca proteinaz K ve lipaz gibi enzimlerle muamele edilerek incelenmiştir. Optimum bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü koşullar tespit edilmiştir.

2.2.16.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Sıcaklık Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi

Bakteriyosin üreten seçilmiş test izolatları %3'lük tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde çoğaltılmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi pH'ı 7.0'ye ayarlanmış, hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantlar (CFS) elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ayrı ayrı Eppendorf tüplerine 1'er ml konularak farklı sıcaklıklarla (4, 19, 24, 37, 50, 60, 70°C) 15 dakika muamele edilmiştir. Diğer zayıf halofil izolatları %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine hücre yoğunluğu McFarland 0.5 (10^8 kob/ml) bulanıklık standardına göre ayarlandıktan sonra steril eküvyon çubuğu yardımıyla ekilmiştir. Ardından petrilerin üzerine farklı sıcaklıklarla muamele edilmiş hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantlardan (CFS) mikropipet yardımıyla 3 µl konulmuştur. Bakteriyosinin bulunduğu bölge kalemle işaretlenmiştir. Petriler 37°C, 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının varlığı ve buna bağlı olarak hangi sıcaklıklarda bakteriyosin aktivitesinin kaybedildiği tespit edilmiştir (Xie ve ark., 2009; Biscola ve ark., 2013).

2.2.16.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı pH Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi

Bakteriyosin üreten seçilmiş test izolatları %3'lük tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde çoğaltılmıştır. Bakteriyosin üreten test izolatlarına ait hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantların pH'ları 1 ml süpernatant olacak şekilde eppendorf tüplere alınarak 1 M HCl ve 1 M NaOH yardımıyla 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10'a ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında (25°C) bu Eppendorf tüplerindeki farklı pH'daki süpernatantlar 3 saat bekletilmiştir. Hücre yoğunluğu McFarland 0.5 (10^8 kob/ml) bulanıklık standardına göre ayarlanmış olan ve eküvyon çubuğuyla %3 tuz içeren Kompleks Besiyeri üzerine ekimi yapılan diğer zayıf halofil bakteri izolatlarının 24 saatlik kültürleri üzerine farklı pH değerlerine ayarlanmış süpernatantlardan mikropipet yardımıyla 3 µl alınarak konulmuştur. Petriler etüvde 37°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır. Ardından bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının varlığı ve hangi pH konsantrasyonlarında bakteriyosin aktivitesinin kaybedildiği belirlenmiştir (Zafar ve ark., 2022).

2.2.16.3. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Tuz Değerlerinin Etkisinin İncelenmesi

Bakteriyosin üreten seçilmiş test izolatları %3'lük tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde çoğaltılmıştır. Daha önce açıklandığı gibi pH'ı 7.0'ye ayarlanmış hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantlar elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar temiz Eppendorf tüplerine 1 ml konularak tuz konsantrasyonu %3, 5, 10, 20 olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı tuz değerlerine ayarlanmış olan bu süpernatantlardan mikropipet yardımıyla 3 µl alınarak hücre yoğunluğu McFarland 0.5 (10^8 kob/ml) bulanıklık standardına göre ayarlanmış ve eküvyon çubuğuyla %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine ekimi yapılan diğer zayıf halofil izolatlarının üzerine konmuştur. Petriler etüvde 37°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır. Ardından bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının varlığı ve hangi tuz konsantrasyon değerlerinde bakteriyosin aktivitesinin kaybedildiği belirlenmiştir (Xie ve ark., 2009; Biscola ve ark., 2013; Azemin ve ark., 2015).

2.2.16.4. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Proteinaz K ve Lipaz Enzimlerinin Etkisinin İncelenmesi

Bakteriyosin üreten seçilmiş test izolatları %3'lük tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerinde çoğaltılmıştır. Daha önce açıklandığı gibi pH'ı 7.0'ye ayarlanmış hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatantlar elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar temiz Eppendorf tüplere 1'er ml konulmuştur. Ardından proteinaz K (10 mM fosfat buffer) ve lipaz (Tris HCl 0.05 M ve CaCl_2 0.01 M) enzimleri belirtilen tampon çözeltilerde hazırlandıktan sonra filtreden (HiMedia) geçirilerek steril edilmiştir (10 mg/ml). Enzimler hazırlandıktan sonra son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde bakteriyosin içeren süpernatantların bulunduğu Eppendorf tüplerine eklenerek 2 saat 37°C'de süpernatant ile muamele edilmiştir. Proteinaz K ve lipaz enzimleriyle ayrı ayrı muamele edilmiş olan bu süpernatantlardan mikropipet yardımıyla 3 µl alınarak hücre yoğunluğu McFarland 0.5 (10^8 kob/ml) bulanıklık standardına göre ayarlanmış ve eküvyon çubuğuyla %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine ekimi yapılan diğer zayıf halofil izolatlarının üzerine konmuştur. Negatif kontrol olarak fosfat ve Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Petriler 37°C etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından inhibisyon zonları tespit edilerek enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin kaybedilip kaybedilmediği tespit edilmiştir (Biscola ve ark., 2013).

2.2.17. Tuzlanmış ve Depolanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakterilerin Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Tespit Edilmesi

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakteri suşlarının deri endüstrisinde derileri ıslatma sıvısında kullanılan, tabakhaneden temin ettiğimiz aktif içeriği sodyum dimetilditiyokarbamat olan antimikrobiyal maddeye (%40) karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Hesaplamalar şu şekilde yapılmıştır: Stok antimikrobiyal madde solüsyonu hazırlanmıştır. Antimikrobiyal maddenin stok solüsyonu 200.000 mg antimikrobiyal maddenin üzerine 1000 ml steril distile su eklenerek hazırlanmıştır. Daha sonra antimikrobiyal maddenin on sekiz farklı konsantrasyonu Tablo 2.1’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Antimikrobiyal madde %40’lık oranda sodyum dimetilditiyokarbamat içerdiği için son konsantrasyon 0.4 ile çarpılmıştır. Ardından tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edilen zayıf halofil bakteri kolonileri steril öze yardımıyla alınarak %3’lük tuz bulunan sıvı Kompleks Besiyerine ekim yapıldıktan sonra 37°C etüvde 24 saat boyunca inkübasyon için bırakılmıştır. Herbir zayıf halofil bakteri izolatının 0.5 McFarland bulanıklık standardına (10^8 kob/ml) göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Çalışmamızda zayıf halofil bakteri izolatlarının antimikrobiyal maddeye karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile tespit edilmiştir. İlk olarak diskler delikli zımba yardımıyla 5 mm çapında olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edilmiş ardından Tablo 2.1’de gösterilen on sekiz farklı konsantrasyon değerinde hazırlanmış olan antimikrobiyal madde solüsyonlarından mikropipet yardımıyla 10 µl alınarak steril olarak hazırlanmış disklerle emdirilmiştir. Bu adımdan sonra zayıf halofil bakteri izolatları %3 tuz içeren Kompleks Besiyerine steril eküvyon çubuklarıyla yayılmıştır ve antimikrobiyal madde solüsyonlarının emdirildiği diskler hazırlanan besiyerlerine aralarında boşluk bırakılacak şekilde petrilere konulduktan sonra 37°C etüvde 24 saat inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından antimikrobiyal madde emdirilmiş disklerin etrafında oluşan zonların çapları mm olarak cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Sodyum dimetilditiyokarbamat aktif içerikli antimikrobiyal maddenin zayıf halofil bakteri suşları üzerine etkili olduğu konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir (Caglayan, 2018).

Tablo 2.1. Antimikrobiyal Madde'nin 18 Farklı Konsantrasyon Değerinde Hazırlanması.

	Antimikrobiyal Maddenin İlk Konsantrasyonu (µg/mL)	Stok Solüsyon Hacmi (mL)	Distile Su Hacmi (mL)	19 mL Distile Su İlavesinden Önceki Konsantrasyon (µg/mL)	19 mL Distile Su İlavesinden Sonraki Final Konsantrasyonu x 0.4 (µg/mL)
1	200.000	2	0	200.000	4000
2	200.000	2	2	100.000	2000
3	200.000	1	3	50.000	1000
4	50.000	2	2	25.000	500
5	50.000	1	3	12.500	250
6	50.000	1	7	6250	125
7	6250	2	2	3125	62.50
8	6250	1	3	1562.5	31.25
9	6250	1	7	781.25	15.62
10	781.2	2	2	390.63	7.81
11	781.2	1	3	195.31	3.90
12	781.2	1	7	97.66	1.96
13	97.6	2	2	48.83	0.98
14	97.6	1	3	24.41	0.49
15	97.6	1	7	12.21	0.24
16	12.2	2	2	6.10	0.12
17	12.2	1	3	3.05	0.06
18	12.2	1	7	1.53	0.03

BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Alınan Deri Örnekleri Hakkında Genel Bilgi

Bu çalışmada İstanbul'da bulunan Tuzla Organize Deri Sanayi Bölgesi içindeki farklı tabakhallerden 10 adet tuzla muhafaza edilmiş, 6 ay 20°C'de depolanmış küçükbaş ham deri örnekleri alınmış ve steril koşullarda laboratuvara taşınmıştır. Alınan deri örnekleri hakkındaki bilgiler tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deri Örnekleri Hakkındaki Genel Bilgi.

	Örnek Numarası	Deri Örneklerinin Alındığı Yer	Deri Örneklerinin Alındığı Hayvan	Derilerin Depolanma Sıcaklığı (°C)
1	TKD1	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
2	TKD2	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
3	TKD3	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
4	TKD4	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
5	TKD5	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
6	TKD6	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
7	TKD7	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
8	TKD8	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
9	TKD9	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
10	TKD10	Tuzla/İstanbul	Koyun	20
TKD*; Tuzlanmış Koyun Derisi				

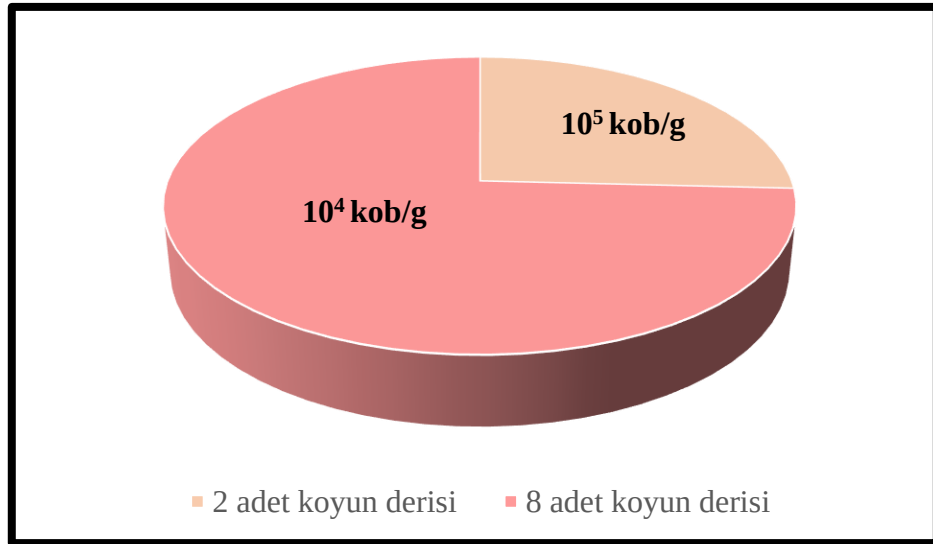
3.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerindeki Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı, Proteolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı ve Lipolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısının Tespit Edilmesi

Tuzla-İstanbul Organize Deri Sanayi Bölgesindeki farklı tabakhanelerden aldığımız 10 adet tuzla muhafaza edilmiş deri örneklerindeki toplam zayıf halofil bakteri sayısı 1×10^4 - 4×10^5 kob/g olarak, proteolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı 2×10^3 - 4×10^4 kob/g olarak, lipolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı 1×10^2 - 3×10^4 kob/g olarak bulunmuştur (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinde Bulunan Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı, Proteolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı ve Lipolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı (kob/g).

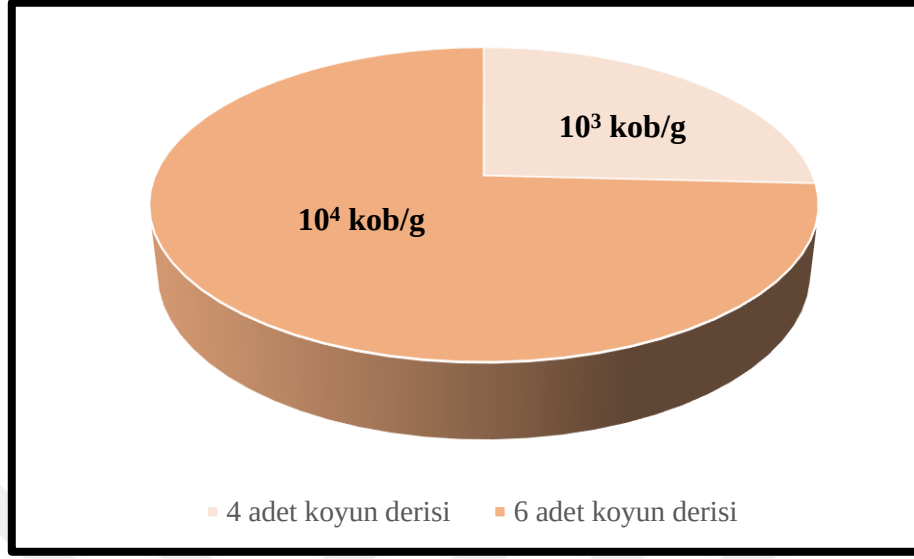
Örnek Numarası	Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı (kob/g)	Proteolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı (kob/g)	Lipolitik Aktiviteye Sahip Zayıf Halofil Bakterilerin Toplam Sayısı (kob/g)
TKD1	2×10^4	1×10^4	8×10^3
TKD2	2×10^4	1×10^4	1×10^3
TKD3	4×10^5	1×10^4	1×10^2
TKD4	1×10^4	6×10^3	4×10^3
TKD5	1×10^4	2×10^3	1×10^3
TKD6	2×10^4	2×10^4	2×10^4
TKD7	3×10^4	3×10^3	1×10^3
TKD8	4×10^4	1×10^4	1×10^4
TKD9	1×10^4	4×10^3	2×10^3
TKD10	1×10^5	4×10^4	3×10^4
TKD*; Tuzlanmış Koyun Derisi			

Tuzla muhafaza edilmiş deri örneklerinde bulunan toplam zayıf halofil bakteri sayısı, 8 adet deri örneğinde 10^4 kob/g olarak, 2 adet deri örneğinde 10^5 kob/g olarak saptanmıştır (Şekil 3.1).



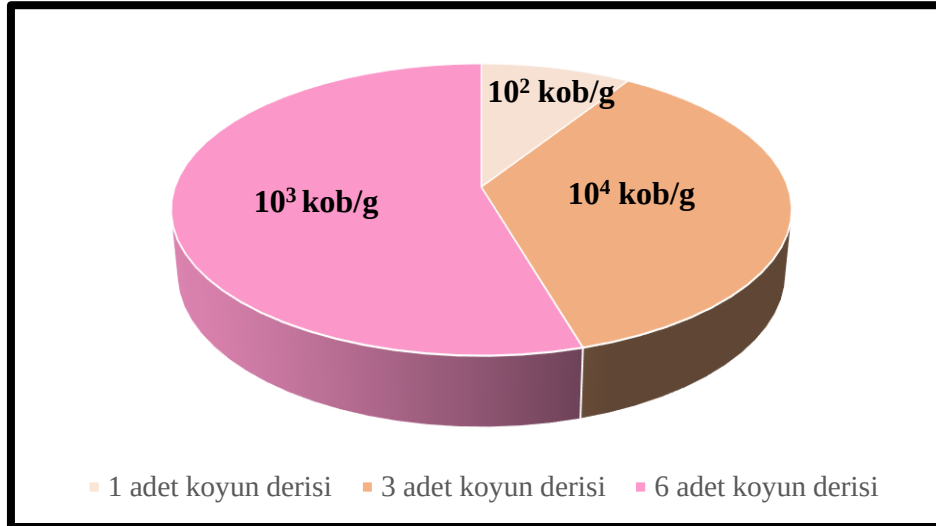
Şekil 3.1. Deri Örneklerindeki Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.

Proteolitik aktiviteye sahip toplam zayıf halofil bakteri sayısı 4 adet deri örneğinde 10^3 kob/g olarak, 6 adet deri örneğinde 10^4 kob/g olarak saptanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deri Örneklerindeki Proteaz Üreten Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.

Lipolitik aktiviteye sahip toplam zayıf halofil bakteri sayısı 1 adet deri örneğinde 10^2 kob/g olarak, 6 adet deri örneğinde 10^3 kob/g olarak, 3 adet deri örneğinde 10^4 kob/g olarak saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Deri Örneklerindeki Lipaz Üreten Zayıf Halofilik Bakteri Sayısı.

3.3. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilmesi

Çalışmamızda farklı tabakhanelerden aldığımız 10 adet tuzla muhafaza edilerek depolanmış koyun derisi örneklerinden morfolojik olarak farklı olduğunu düşündüğümüz 20 adet zayıf halofil bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlar TKD1a, TKD1b, TKD2a, TKD2b, TKD3a, TKD3b, TKD4a, TKD4b, TKD5a, TKD5b, TKD6a, TKD6b, TKD7a, TKD7b, TKD8a, TKD8b, TKD9a, TKD9b, TKD10a, TKD10b şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İzole Ettiğimiz Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Petri Görüntüsü.

Çalışmamızda tuzla muhafaza edilerek depolanmış koyun derilerden izole ettiğimiz 20 adet zayıf halofil bakteri izolatının kaynağının derilerin uzun süreli korunması amacıyla kullanılan tuzdan kaynaklandığı muhtemeldir. Deriler eğer homojen bir şekilde tuzlanmazsa, ortam koşulları da (nem, sıcaklık, derilerin istiflenme sürecindeki hatalar, yanlış depolama koşulları) mikrobiyal gelişime müsaitse halofil bakteri ve arkeler için mükemmel bir ortam oluşur (Berber, 2009; Birbir ve ark., 2020). Daha önceki yapılan çalışmalarda derilerin yapısında bulunan yüksek yağ ve protein içeriklerinin mikroorganizmaların çoğalması için uygun bir ortam oluşturduğunu ve ham derilerin üzerinde 6 saat gibi kısa bir süre içerisinde mikroorganizmaların gelişebildiği bildirilmiştir (Birbir, 1991). Özellikle halofilik bakteriler yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilmekte ve bu ekstrem koşullara adapte olabilmektedir (Ventosa, 2006). Halofil mikroorganizmalara dair yapılan daha önceki çalışmalara bakıldığında hipersalin sularda ve çeşitli tuzlu toprak örneklerinde bu mikroorganizmaların izolasyonlarının yapıldığı görülmektedir (Birbir ve Sesal, 2003; Elevi ve ark., 2004; Ventosa, 2006; De La Haba ve ark., 2011; Ali ve ark., 2016).

Ayrıca tuz birikintilerinden, tuzlanmış balık ve etlerden, fermente gıdalardan, tuzlanmış deri örneklerinden ve tuzlardan halofil mikroorganizmaların izole edildiği bildirilmiştir (Birbir, 1991; Berber, 2009; Ventosa, 2006). Daha önceki yapılan araştırmaların sonuçları bizim çalışmamızdaki sonuçları desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar beş adet tuzlanmış deri örneğinden ılımlı halofil bakterileri izole etmişlerdir. Bu deri örneklerinde toplam ılımlı halofil bakteri sayısını 10^2 - 10^7 kob/g olarak, proteolitik ılımlı halofil bakteri sayısını 10^1 - 10^5 kob/g olarak ve lipolitik ılımlı halofil bakteri sayısını 10^5 - 10^6 kob/g olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Caglayan ve ark., 2015). Berber (2009), yaptığı çalışmada tuzlanmış deri örneklerinde bulunan aşırı halofil bakteri sayısını 11 örnekte 10^6 - 10^8 kob/g, 25 örnekte 10^3 - 10^8 kob/g olarak tespit etmiştir. Ayrıca proteolitik aşırı halofil bakteri sayısını 11 örnekte 10^5 - 10^6 kob/g, 23 örnekte 10^2 - 10^4 kob/g olarak, lipolitik aşırı halofil bakteri sayısını 4 örnekte 10^5 - 10^6 kob/g, 25 örnekte 10^2 - 10^4 kob/g olarak tespit etmiştir (Berber, 2009). Bir başka çalışmada Yılmaz (2010), İngiltere ve Avusturalya'dan ithal edilmiş ve tuzla kürlenerek muhafaza edilmiş deri örnekleri üzerine çalışmalar yapmış ve İngiltere'den alınmış olan deri örneklerindeki halofil bakteri sayısını 10^6 - 10^7 kob/g olarak, proteolitik aktiviteye sahip halofil bakteri sayısını 10^5 kob/g olarak, lipolitik aktiviteye sahip halofil bakteri sayısını 10^5 - 10^6 kob/g olarak tespit etmiştir. Avusturalya'dan alınan deri örneklerindeki toplam halofil bakteri sayısını 10^2 kob/g olarak, proteolitik aktiviteye sahip halofil bakteri sayısını 10^1 - 10^2 kob/g olarak tespit etmiştir. Avusturalya'dan alınan örneklerde lipolitik aktivite gösteren bakteri izole edemediğini ve bu durumun Avusturalya'da derilerin daha doğru bir şekilde tuzlanarak saklanmasıyla kaynaklanabileceğini bildirmiştir (Yılmaz, 2010). Bir diğer çalışmada ise kırmızı ve sarı renklenmeler içeren, İspanya'dan alınan tuzlanmış koyun derilerinden ılımlı halofil bakteri ve aşırı halofil arkeler izole edilmiştir. Bu çalışmada ılımlı halofil bakteri sayısı 10^5 - 10^8 kob/g olarak, aşırı halofil arke sayısı ise 10^5 - 10^7 kob/g olarak tespit edilmiştir (Akpolat ve ark., 2015). Çalışmanın devamında koyun derilerinin çoğunlukla aşırı halofil arkelerin ve ılımlı halofil bakterilerin farklı proteolitik ve lipolitik türlerini içeren tuzların kullanımından dolayı derilerin kontamine olduğunu doğrulamıştır. Bu nedenle bu durumun üstesinden gelmek için derilerin salamura kürü esnasında antimikrobiyal maddelerle kombine şekilde uygulanmasının mikrobiyal hasarı önleyebileceğini belirtmişlerdir (Akpolat ve ark., 2015). Tuzla muhafaza edilmiş koyun derisi örneklerinin incelendiği bir çalışmada deri örneklerinden izole edilen proteolitik ve lipolitik halofilik arkelerin 47 günlük depolama sırasında deriye ciddi zarar verdiği elektron mikroskobu ile doğrulanmıştır (Birbir ve ark., 2020).

Çalışmanın sonucunda tuzlanmış derilerin yüksek sayıda proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip halofilik arkeleri bulundurduğu tespit edilmiştir (Birbir ve ark., 2020). Rusya ve Fransa'dan ithal edilen 35 adet tuzla kürlenmiş deri örneklerinin incelendiği bir çalışmada ise deri örneklerinin %29 oranında halotolerant bakteri, %37 oranında zayıf halofil bakteri, %86 oranında ılımlı halofil bakteri ve %91 oranında aşırı halofil arke içerdiği bildirilmiştir (Birbir, 1997). Deriler işlenmemiş kuru tuzla tuzlandığında halofilik bakterilerin ve arkelerin çoğalması için uygun bir ortam oluşturduğu anlaşılmaktadır.

3.4. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyon Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Elde ettiğimiz 20 adet zayıf halofilik bakteri izolatının %0, 0.5, 3, 5, 7.5, 10, 15'lik tuz konsantrasyonlarında gelişme durumları araştırılmıştır. Her bir zayıf halofil bakteri izolatı tuz içermeyen ve %0.5, 3, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 tuz içeren Kompleks Agar Besiyeri üzerine ekimi yapılarak 37 °C'de etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. TKD1a, TKD1b, TKD2b, TKD3a, TKD3b, TKD4b, TKD5b, TKD10a, TKD10b bakteri izolatları %0.5-10 tuz konsantrasyon aralığında TKD5a, TKD8b, TKD9a, TKD9b bakteri izolatları %0.5-7.5 tuz konsantrasyon aralığında TKD2a, TKD4a, TKD6a, TKD6b, TKD7a, TKD7b, TKD8a bakteri izolatları %0.5-12.5 tuz konsantrasyon aralığında gelişebildiği saptanmıştır. Hiçbir izolat %0 ve %15 tuz konsantrasyonunda gelişme göstermemiştir. Bu izolatların en iyi geliştiği tuz konsantrasyonu %3-5 aralığında tespit edilmiştir ve bu kapsamda zayıf halofil olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.3). Bu sonuçlara göre çalışmamızda besiyerleri hazırlanırken zayıf halofil bakterilerin optimum geliştiği %3 tuz konsantrasyonu değeri kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Durumları.

	İzolat Adı	% 0	% 0.5	% 3	% 5	% 7.5	% 10	% 12.5	% 15
1	TKD1a	-	+	++	++	+	+	-	-
2	TKD1b	-	+	++	++	+	+	-	-
3	TKD2a	-	+	++	++	+	+	+	-
4	TKD2b	-	+	++	++	+	+	-	-
5	TKD3a	-	+	++	++	+	+	-	-
6	TKD3b	-	+	++	++	+	+	-	-
7	TKD4a	-	+	++	++	+	+	+	-
8	TKD4b	-	+	++	++	+	+	-	-
9	TKD5a	-	+	++	++	+	-	-	-
10	TKD5b	-	+	++	++	+	+	-	-
11	TKD6a	-	+	++	++	+	+	+	-
12	TKD6b	-	+	++	++	+	+	+	-
13	TKD7a	-	+	++	++	+	+	+	-
14	TKD7b	-	+	++	++	+	+	+	-
15	TKD8a	-	+	++	++	+	+	+	-
16	TKD8b	-	+	++	++	+	-	-	-
17	TKD9a	-	+	++	++	+	-	-	-
18	TKD9b	-	+	++	++	+	-	-	-
19	TKD10a	-	+	++	++	+	+	-	-
20	TKD10b	-	+	++	++	+	+	-	-

*Tablodaki (++) değeri iyi üreme, (+) değeri zayıf bir üreme, (-) değeri üreme yok anlamında kullanılmıştır.

Daha önce zayıf halofil bakterilerin çeşitli tuzcul ortamlardan izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; bir çalışmada Kore Cumhuriyeti'nin Jeju Adası'ndan alınan bir deniz suyu örneğinden *Roseovarius aquimarinus* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiş olup optimum %2 NaCl varlığında gelişebildiği belirtilmiştir (Kang ve ark., 2015). Bir başka yapılan çalışmada Korede bulunan Sarıdeniz'den *Alteromonas litorea* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilerek optimum %2-5 NaCl aralığında geliştiği bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2004). İspanya'da yapılan bir çalışmada hipersalin bir ortamdan *Marinobacterium ramblicola* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilerek optimum %3 NaCl'de gelişebildiği bildirilmiştir (Durán-Viseras ve ark., 2021). Hong Kong'ta yapılan bir çalışmada ise *Altererythrobacter salegens* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu sediment örneklerinden izole edilmiş %2-10 NaCl varlığında gelişim gösterebildiği optimum olarak da %3-8 NaCl konsantrasyon aralığında gelişebildiği bildirilmiştir (Liang ve ark., 2017).

İranda yapılan bir çalışmada alınan tuzlu toprak örneklerinden *Planomicrobium iranicum* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilerek %1-7.5 NaCl varlığında gelişim gösterebildiği, optimum olarak ise %3 NaCl varlığında geliştiği bildirilmiştir (Ramezani ve ark., 2019). Bu çalışmalara ve bizim çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında zayıf halofil bakteri suşlarının düşük tuz konsantrasyonlarında optimum gelişim gösterdiği anlaşılmaktadır.

3.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı pH Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Elde ettiğimiz 20 adet zayıf halofilik bakteri izolatının 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olarak ayarlanan pH değerlerinde gelişme durumları araştırılmıştır. Tuzlanmış derilerden izole edilen her bir zayıf halofil izolatı %3 tuz (zayıf halofil bakterilerin optimum geliştiği konsantrasyon) içeren ve pH'ları 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olarak ayarlanan %3 tuz içeren Kompleks Agar Besiyeri üzerine çizgi ekim tekniği ile ekilmiştir. Ardından petriler 37°C etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. TKD9a izolatı sadece pH 7 ve 8'de gelişme göstermiştir (Tablo 3.4). Hiçbir izolat pH 5 ve pH 12 de gelişim gösterememiştir. İzolatların en iyi geliştiği değerler pH 7 ve pH 8 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.4. İzolatların Gelişebildiği pH Değerleri.

	İzolat Adı	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
1	TKD1a	-	+	++	++	+	+	+	-
2	TKD1b	-	+	++	++	+	+	+	-
3	TKD2a	-	+	++	++	+	+	+	-
4	TKD2b	-	+	++	++	+	+	+	-
5	TKD3a	-	+	++	++	+	+	+	-
6	TKD3b	-	+	++	++	+	+	+	-
7	TKD4a	-	+	++	++	+	+	+	-
8	TKD4b	-	+	++	++	+	+	+	-
9	TKD5a	-	+	++	++	+	+	+	-
10	TKD5b	-	+	++	++	+	+	+	-
11	TKD6a	-	+	++	++	+	+	+	-
12	TKD6b	-	+	++	++	+	+	+	-
13	TKD7a	-	+	++	++	+	+	+	-
14	TKD7b	-	+	++	++	+	+	+	-
15	TKD8a	-	+	++	++	+	+	+	-
16	TKD8b	-	+	++	++	+	+	+	-
17	TKD9a	-	-	++	++	-	-	-	-
18	TKD9b	-	+	++	++	+	+	+	-
19	TKD10a	-	+	++	++	+	+	+	-
20	TKD10b	-	+	++	++	+	+	+	-

Araştırmacılar yaptığı çalışmada derin denizlerden alınan örneklerden *Altererythrobacter salegens* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir ve pH 6.5-8’de gelişebildiği, optimum pH değerinin ise 7.0-7.5 olduğu belirtilmiştir (Liang ve ark., 2017). Almanya’da yapılan bir çalışmada ise sediment örneğinden izole edilen *Fundibacter jadensis* zayıf halofil bakteri suşu ilk defa tanımlanmıştır ve bu suşun pH 6-8.5 aralığında gelişebildiği, optimum ise pH 7’de gelişebildiği bildirilmiştir (Bruns ve Berthe-Corti, 1999). Kore’de bir tuzlu fermente deniz ürünü olan Jeotgal’dan *Cobetia crustatorum* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşunun izole edildiği bir çalışmada bakterinin pH 5-10 aralığında gelişebildiği, optimum pH değerinin ise pH 5-6 olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2010). Çin’de yapılmış bir araştırmada ise araştırmacılar Zhaodong şehrinde bulunan tuzlu-alkalin topraklardan örnek alarak *Halomonas zhaodongensis* sp.nov., zayıf halofil bakteri suşunu izole etmişlerdir. Bu bakteri suşunun pH 6-12 aralığında gelişim gösterebildiğini bildirmişlerdir (Jiang ve ark., 2013).

3.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumlarının Araştırılması

Elde ettiğimiz 20 adet zayıf halofil bakteri izolatının farklı sıcaklık değerlerinde gelişme durumlarını araştırmak amacıyla bu izolatlar %3 tuz içeren Kompleks Agar Besiyeri üzerine ekildikten sonra 4, 10, 20, 28, 37, 45, 55 °C olarak ayarlanmış olan etüvlerde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon süresince izolatlar incelenmiştir. İzolatların hiçbiri 4°C ve 55°C’de gelişim göstermemiştir. TKD1a, TKD1b, TKD2b, TKD3a, TKD3b, TKD4b, TKD5b, TKD10a, TKD10b izolatları 10-45°C sıcaklık aralığında, TKD2a, TKD4a, TKD5a, TKD6a, TKD6b, TKD7a, TKD7b, TKD8a, TKD8b, TKD9a izolatları 20-45°C sıcaklık aralığında, TKD9b izolatı ise 28-45°C sıcaklık aralığında gelişim göstermiştir. İzolatların en iyi gelişim gösterdiği sıcaklık aralığı 37°C ve 45°C olarak belirlenmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Farklı Sıcaklık Değerlerinde Gelişme Durumları.

	İzolat Adı	4°C	10°C	20°C	28°C	37°C	45°C	55°C
1	TKD1a	-	+	+	+	++	++	-
2	TKD1b	-	+	+	+	++	++	-
3	TKD2a	-	-	+	+	++	++	-
4	TKD2b	-	+	+	+	++	++	-
5	TKD3a	-	+	+	+	++	++	-
6	TKD3b	-	+	+	+	++	++	-
7	TKD4a	-	-	+	+	++	++	-
8	TKD4b	-	+	+	+	++	++	-
9	TKD5a	-	-	+	+	++	++	-
10	TKD5b	-	+	+	+	++	++	-
11	TKD6a	-	-	+	+	++	++	-
12	TKD6b	-	-	+	+	++	++	-
13	TKD7a	-	-	+	+	++	++	-
14	TKD7b	-	-	+	+	++	++	-
15	TKD8a	-	-	+	+	++	++	-
16	TKD8b	-	-	+	+	++	++	-
17	TKD9a	-	-	+	+	++	++	-
18	TKD9b	-	-	-	+	++	++	-
19	TKD10a	-	+	+	+	++	++	-
20	TKD10b	-	+	+	+	++	++	-

Yapılan bir çalışmada sediment örneklerinden izole edilen *Altererythrobacter salegens* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşunun geliştiği sıcaklık 10°C-35°C aralığında, optimum gelişmenin ise 30°C’de gerçekleştiği bildirilmiştir (Liang ve ark., 2017). Başka bir çalışmada Irak’ın Kerbela kentinin batısındaki Razazah Gölü’nden toplam 218 halofilik bakteri izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlardan zayıf halofil bakteriler %68 sıklıkta en bol izolat olarak tespit edilmiştir. İzolatların geliştiği optimum sıcaklık 37°C, pH ise 7.5 olarak belirtilmiştir (Al-Rubaye ve ark., 2017). Tuzlu ıslak topraklardan *Planomicrobium iranicum* sp. nov., zayıf halofil bakteri suşunun izole edildiği bir çalışmada ise optimum olarak 37°C’de geliştiği belirtilmiştir (Ramezani ve ark., 2019). Derin denizden alınan su örneklerinin incelendiği bir çalışmada *Clostridium caminithermale* sp., termotolerant zayıf halofil bakteri suşu izole edilerek 20-58°C sıcaklık aralığında gelişebildiği, optimum ise 45°C sıcaklıkta geliştiği bildirilmiştir (Brisbarre ve ark., 2003). Güney Çin Denizi’nden alınan örneklerin incelendiği bir çalışmada *Bacillus oceani* sp.nov., Gram-pozitif, zorunlu aerobik zayıf halofil bakteri suşu izole edilmiştir ve optimum geliştiği sıcaklık değeri 30°C olarak bildirilmiştir (Liu ve ark., 2013).

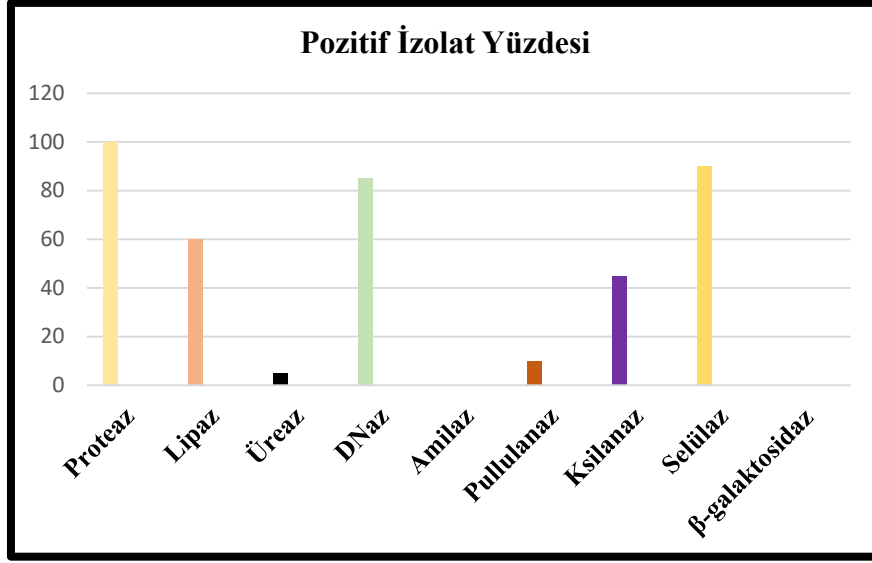
3.7. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivite Sonuçları

Çalışmamızda tuzlanmış koyun derilerinden izole ettiğimiz zayıf halofil bakteri suşlarının çeşitli hidrolitik enzimleri üretme durumları araştırılmıştır (Tablo 3.6). Bu bakterilerin yüksek bir hidrolitik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda izole edilen 20 adet zayıf halofil bakteri izolatının tamamı proteaz aktivitesi (%100), 12 izolat lipaz aktivitesi (%60), 1 izolat üreaz aktivitesi (%5), 17 izolat DNaz aktivitesi (%85), 2 izolat pullulanaz aktivitesi (%10), 9 izolat ksilanaz aktivitesi (%45), 18 izolat selülaz aktivitesi (%90) göstermiştir. Hiçbir izolat amilaz ve β -galaktosidaz aktivitesi göstermemiştir (Şekil 3.5). İncelenen zayıf halofil izolatlarında en fazla 5 hidrolitik (proteaz, lipaz, DNaz, ksilanaz, selülaz) aktivite görülmüştür. Bu izolatlar TKD5a, TKD7a, TKD8b olarak tespit edilmiştir. İncelenen zayıf halofil bakteri izolatlarında en az 2 hidrolitik aktivite görülmüştür. Bu izolatlar TKD6a (proteaz, pullulanaz), TKD9a (proteaz, DNaz) olarak belirlenmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Enzimatik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi.

	İzolat Adı	Proteaz	DNaz	Üreaz	Lipaz	Selülaz	Pullulanaz	Ksilanaz	Amilaz	β -galaktosidaz
1	TKD1a	+	+	-	+	+	-	-	-	-
2	TKD1b	+	-	-	+	+	-	+	-	-
3	TKD2a	+	+	-	-	+	-	+	-	-
4	TKD2b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
5	TKD3a	+	+	-	+	+	-	-	-	-
6	TKD3b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
7	TKD4a	+	+	-	-	+	-	+	-	-
8	TKD4b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
9	TKD5a	+	+	-	+	+	-	+	-	-
10	TKD5b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
11	TKD6a	+	-	-	-	-	+	-	-	-
12	TKD6b	+	-	-	-	+	+	+	-	-
13	TKD7a	+	+	+	-	+	-	+	-	-
14	TKD7b	+	+	-	-	+	-	+	-	-
15	TKD8a	+	+	-	-	+	-	+	-	-
16	TKD8b	+	+	-	+	+	-	+	-	-
17	TKD9a	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18	TKD9b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
19	TKD10a	+	+	-	+	+	-	-	-	-
20	TKD10b	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Pozitif İzolat Sayısı		20	17	1	12	18	2	9	0	0
Pozitif İzolat Yüzdesi (%)		100	85	5	60	90	10	45	0	0

*(+) : Enzimatik aktivitenin varlığını, (-) : enzimatik aktivitenin olmadığını temsil etmektedir.



Şekil 3.5. İzolatların Hidrolitik Aktivitelerinin Yüzdesel Dağılımı.

Halofil bakteriler tarafından üretilen enzimler yüksek tuzluluk koşullarında, yüksek sıcaklıklara kadar stabil kalabilmesi, az su bulunduran ya da susuz ortamlarda yüksek katalitik yetenek göstermesi ve denatüre edici koşullarda yüksek direnç göstermesi gibi sebeplerle biyoteknolojik olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu anlaşılarak son yıllarda dikkat çekmeye başlamıştır (Kumar ve Tiwari, 2019). Proteaz enzimi gıda endüstrisi, farmasötik ürün üretimi, deterjanlar endüstrisi, zirai kimyasal ürünlerinin üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Proteazlar özellikle küresel market piyasasında çok önemli bir yere sahiptir (Adrio ve Demain, 2014). Bir diğer önemli enzim halofil selülazlardır. Bu enzim son yıllarda biyoyakıt üretiminde ilgi çekmeye başlamıştır. Bitki biyokütlesi özellikle de biyoyakıt üretiminde başlangıç meteryali olarak işlev görmektedir ve esas olarak selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Bu açıdan selülozun parçalanmasında bu enzimin önemi büyüktür (Adrio ve Demain, 2014). Lipaz enzimi kozmetik, ilaç, deri sanayi, biyopolimer, biyodizel üretimi, gıda modifikasyonu ve deterjan formülasyonu gibi pek çok sektörde kullanım potansiyeline sahip bir diğer enzimdir. Halofil bakterilerin enzimlerinin biyoteknolojik olarak en dikkat çekenleri proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, ksilanaz, nükleaz, katalaz olarak belirtilmektedir (Gupta ve ark., 2016). Çalışmamızda zayıf halofil bakterilerin bu enzimleri üretim yetenekleri tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında tuzlanmış derilerden izole ettiğimiz zayıf halofil bakterilerin yüksek hidrolitik aktiviteye sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Daha önce çeşitli tuzcul ortamlardan izole edilmiş halofil bakterilerin enzim potansiyellerinin incelendiği pek çok çalışma mevcuttur. Araştırmacılar İspanyadaki farklı hipersalin çevrelerden toplam 122 adet orta derecede halofil bakteri izole etmişlerdir. Bu bakteri suşlarının DNaz, amilaz, proteaz, lipaz ve pullulanaz aktivitesi gösterdiğini açıklamışlardır ancak izolatların hiçbirinin ksilanaz aktivitesi göstermediğini belirtmişlerdir (Sanchez-Porro ve ark., 2003). Hindistan'ın çeşitli tuzlu habitatlarındaki toprak ve su örneklerinin incelendiği bir çalışmada 108 adet halofilik bakteri izole edilmiş ve endüstriyel açıdan önemli hidrolitik (amilaz, lipaz, proteaz) aktiviteleri incelenmiştir. 21 adet yüksek hidrolitik aktiviteye sahip izolatin moleküler olarak tanımlamaları yapılmıştır. Bu halofil bakterilerin %3-20 arasındaki tuz konsantrasyonlarında gelişebildikleri için ılımlı halofil bakteri oldukları tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda halofilik bakteriler tarafından üretilen bu enzimlerin zorlu koşullar altında gerçekleşen (yüksek tuzluluk, sıcaklık, organik çözücü maddelerin varlığı) biyoteknolojik çalışmalar için kullanım potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Kumar ve Tiwari, 2019). Hindistan'da Pradesh isimli bölgede bulunan tuzlu sudan alınan örneklerin incelendiği bir çalışmada beş halofil bakteri izole edilmiş ve hidrolitik enzim aktiviteleri (amilaz, lipaz, proteaz, glutaminaz) incelenmiştir (Gupta ve ark., 2016). Bu halofil bakteri suşları *Halobacillus trueperi*, *Marinomonas* sp., *Halobacillus trueperi*, *Shewanella alga*, *Halomonas venusta* olarak tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda ise bu bakteri türlerinin yüksek hidrolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Organik materyallerin endüstride faydalı ürünlere dönüştürebilmesi için biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir (Gupta ve ark., 2016). Tuzköy Tuz Madeni'nde yapılan bir çalışmada araştırmacılar 3 farklı lokasyondan tuz örneklerini alarak halofilik arkeleri izole etmişlerdir ve bu izolatların hidrolitik aktivitelerini araştırmışlardır. Bu izolatların jelatinaz, kazeinaz, amilaz, selüloz ve lipaz aktivitesine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca bu izolatların hidrolitik aktivitelerinin tuzla muamele edilmiş gıdalarda ve derilerde bozulmaya sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Birbir ve ark., 2004). Başka bir çalışmada araştırmacılar 5 adet ithal deri örneğinden izole ettikleri ılımlı halofilik bakterilerin proteaz, kazeinaz, amilaz, lipaz, üreaz, pullulanaz aktivitesi gösterdiğini ancak ksilanaz aktivitesi göstermediğini bildirmişlerdir (Caglayan ve ark., 2015). ABD'den ithal edilen tuzla kürlenmiş 131 sığır derisi örneğinin incelendiği bir çalışmada, tuzlanmış deri örneklerinin halofilik arkeler (332 suş) tarafından kontamine olduğu bildirilmiştir (Bailey ve Birbir, 1993). Bu çalışmanın devamında deri örneklerinden izole edilmiş olan halofil arkelerin %94'lük kısmının proteolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Bailey ve Birbir, 1993).

Farklı ülkelerden ithal edilen tuzla kürlenmiş 8 adet deri örneğinin incelendiği bir çalışmada araştırmacılar 186 adet aşırı halofil arke izole etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, izolatlarda %12 kazeinaz, %57 proteaz, %11 amilaz, %35 esteraz ve %18 lipaz aktivitesi tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların tamamının DNaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Bilgi ve ark., 2015). Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir ve tuzlanmış koyun derilerinden izole ettiğimiz zayıf halofil bakterilerin yüksek hidrolitik aktiviteye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Hücre dışı enzim aktivitelerinin yüksek olması derilerde bozulmaya sebep olarak derilerin yapısında yüksek oranda bulunan protein ve yağ içeriğini sindirmektedir. Özellikle  alışmamızda kullandığımız koyun derisi örnekleri diğer küçükbaş hayvanlara kıyasla yüksek oranda yağ içeren (%15-25) bir yapıya sahip olduğu için lipolitik zayıf halofil bakteriler tarafından sindirilip yapısı bozulabilmektedir (Birbir ve ark., 2020). Ancak bu metabolik aktiflik yüksek tuz konsantrasyonlarında gerçekleştirilen biyoteknolojik çalışmalardaki kullanımı için  mit vericidir (De Lourdes Moreno ve ark., 2013). Daha sonra yapılacak araştırmalarda bu izolatların ürettiği enzimlerin farklı sektörlerde kullanılıp kullanılamayacağı çeşitli parametreler değerlendirilerek incelenebilir.

3.8. Zayıf Halofil Bakterileri İzolatlarının Biyokimyasal Testlerinin Sonuçları

Zayıf halofil bakteri izolatlarının biyokimyasal test sonuçlarına bakıldığında tüm izolatların (%100) katalaz ve oksidaz pozitif olduğu saptanmıştır. Gram boyama sonuçlarına bakıldığında, izolatların tamamının Gram pozitif ve  omak şekilli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların sitrat aktivitesine bakıldığında, 8 izolatta (%40) sitrat aktivitesi görülmüştür. İzolatların farklı karbon kaynaklarından asit üretebilme durumları incelendiğinde 9 izolatın (%45) D-ksiloz, 17 izolatın (%85) D-mannoz, 15 izolatın (%75) D-riboz, 18 izolatın (%90) sukrozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği tespit edilmiştir. Hiçbir izolat ksilitol  karbon kaynağı olarak kullanamamıştır (Tablo 3.7). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde zayıf halofil bakteri izolatlarının farklı karbon kaynaklarından asit üretebildiği anlaşılmaktadır. Derilerde bulunan amino asitler glisin, prolin, alanin, hidroksiprolin, glutamik asit, arjinin, serin, lizin, lösin, valin, izolösin, histidin, tirozin, sistein olarak belirtilmiştir (Caglayan, 2015). Bu kapsamda zayıf halofil bakteri izolatlarının derilerde bulunan sistein, glisin, alanin, treonin, arjinin gibi amino asitleri parçalayıp par alayamadıkları çalışmamızda araştırılmıştır. Bu amino asitler deride bulunduğu için izolatların bu amino asitleri kullanma durumları önem taşımaktadır.

Sonuçlara bakıldığında 6 adet izolatın (%30) L-sistein, 6 adet izolatın (%30) L-glisin, 4 adet izolatın (%20) L-alanin, 4 adet izolatın (%20) L-treonin amino asidini kullanabildiği tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirisi L-arjinin amino asidini kullanmamıştır (Tablo 3.7). Daha önceki çalışmalara bakıldığında araştırmacılar tuzla muhafaza edilmiş koyun ve keçi deri örneklerinden 137 adet ılımlı halofil bakteri suşunu izole ederek deride bulunan amino asitleri kullanma durumlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre ılımlı halofil bakteri izolatlarının hepsi arjinin amino asidini kullanmıştır. Ayrıca izolatların %66'sı hidroksiprolin, %64'ü prolin, %85'i alanin ve %66'sının glisini kullandığı ancak sistein amino asidini yalnızca izolatların %4'ünün kullandığı belirtilmiştir (Birbir ve Caglayan, 2018). Bu sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermiştir. İzolatların metabolik olarak aktif olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 3.7. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları.

Karakteristikler	TKD1a	TKD1b	TKD2a	TKD2b	TKD3a	TKD3b	TKD4a	TKD4b	TKD5a	TKD5b
Gram Boyamaları	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hücre Morfolojileri	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak
Tuz toleransı	0.5-10	0.5-10	0.5-12.5	0.5-10	0.5-10	0.5-10	0.5-12.5	0.5-10	0.5-7.5	0.5-10
Gelişebildiği Optimum pH Aralığı	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11
Gelişebildiği Optimum Sıcaklık Aralığı (°C)	10-45	10-45	20-45	10-45	10-45	10-45	20-45	10-45	20-45	10-45
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Kullanımı	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Farklı Karbon Kaynaklarından Asit Üretimi										
D-ksiloz	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannoz	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-riboz	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dekarboksilaz Testi										
L-sistein	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-glisin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-alanin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-treonin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-arjinin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 3.7. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları (Devamı).

Karakteristikler	TKD6a	TKD6b	TKD7a	TKD7b	TKD8a	KD8b	TKD9a	TKD9b	TKD10a	TKD10b
Gram Boyamaları	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hücre Morfolojileri	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak
Tuz toleransı	0.5-12.5	0.5-12.5	0.5-12.5	0.5-12.5	0.5-12.5	0.5-7.5	0.5-7.5	0.5-7.5	0.5-10	0.5-10
Gelişebildiği Optimum pH Aralığı	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	6-11	7-8	6-11	6-11	6-11
Gelişebildiği Optimum Sıcaklık Aralığı (°C)	20-45	20-45	20-45	20-45	20-45	20-45	20-45	28-45	10-45	10-45
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Farklı Karbon Kaynaklarından Asit Üretimi										
D-ksiloz	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannoz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-riboz	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Sukroz	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Dekarboksilaz Testi										
L-sistein	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
L-glisin	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
L-alanin	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L-treonin	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
L-arjinin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.9. Moleküler Tanımlama Sonuçları

Çalışmamızda Tuzla-İstanbul Organize Deri Sanayi Bölgesinden aldığımız 10 adet tuzlanmış ve 6 ay 20°C’de depolanmış koyun derisi örneklerinden toplam 20 adet zayıf halofil bakteri izole edilmiştir. İzole ettiğimiz zayıf halofil bakterilerin tanımlanmasında ilk aşamada biyokimyasal testler kullanılmıştır. Daha kesin sonuçlar elde etmek için zayıf halofil bakteri izolatlarının moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmıştır. İzolatların ilk olarak materyal-metot kısmında belirtildiği şekilde DNA izolasyonları yapılmıştır. Ardından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA gen dizileri çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin kontrolü için Agaro Jel Elektroferezinde DNA-ladder (marker) ile boyutu kıyaslanacak şekilde yürütülmüştür. İzolatlara ait olan 16S rRNA gen dizi analizi Artı Biyoteknoloji Laboratuvarında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgeleri NCBI internet sitesindeki nükleotid BLAST seçeneği ile analiz edilmiş daha sonra gen bankasında bulunan 16S rRNA gen dizileriyle karşılaştırılmıştır. Zayıf halofil bakteri izolatlarının filogenetik açıdan benzediği tür GenBank Veritabanı, Eztaxon Veritabanı ve BLAST gibi programlar yardımıyla tespit edilmiştir (İzolatlara ait 16S rRNA gen dizileri EKLER kısmında verilmiştir).

Çalışmamızda tanımlanan 18 adet zayıf halofil bakteri izolatının kodu, baz uzunluğu (bp), benzerlik oranı, filogenetik açıdan benzediği tür ve GenBank'tan alınan erişim numaralarına ait bilgiler tabloda verilmiştir (Tablo 3.8). Çalışmamızda TKD7a ve TKD9b izolatlarından DNA izolasyonu yapılamadığı için tabloda gösterilmemiştir.

Tablo 3.8. Tuzlanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofilik Bakteri İzolatlarının İzolat Kodları, Baz Uzunluğu, Benzerlik Oranı (%), Filogenetik Açıdan Benzediği Tür ve Erişim Numaraları.

	İzolatın Kodu	Baz Uzunluğu (bp)	Benzerlik Oranı (%)	Filogenetik Açıdan Benzediği Tür	GenBank Erişim Numarası
1	TKD1a	1508	99.53	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133543
2	TKD1b	1548	99.25	<i>Bacillus rugosus</i>	OR133544
3	TKD2a	1474	99.63	<i>Bacillus safensis</i>	OR133545
4	TKD2b	1508	99.54	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133546
5	TKD3a	1508	99.32	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133547
6	TKD3b	1508	99.18	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133548
7	TKD4a	1474	99.90	<i>Bacillus safensis</i>	OR133549
8	TKD4b	1508	99.50	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133550
9	TKD5a	1407	99.69	<i>Bacillus mojavensis</i>	OR133551
10	TKD5b	1508	99.17	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133552
11	TKD6a	1475	99.56	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OR133553
12	TKD6b	1468	99.47	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	OR133554
13	TKD7b	1466	99.46	<i>Bacillus aerius</i>	OR133555
14	TKD8a	1474	99.90	<i>Bacillus safensis</i>	OR133556
15	TKD8b	1434	99.48	<i>Bacillus pumilus</i>	OR133557
16	TKD9a	1511	99.37	<i>Bacillus kochii</i>	OR133558
17	TKD10a	1508	99.29	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133559
18	TKD10b	1508	99.74	<i>Bacillus haynesii</i>	OR133560

Çalışmamızda tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole edip tanımlandığımız bakteri izolatlarının (n=18) *Bacillaceae* familyası ve *Firmicutes* şubesinde bulunan *Bacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. *Bacillaceae* familyası üyeleri çoğunlukla Gram pozitif ve çomak şeklinde izolatlarıyla tanımlanmaktadır. *Bacillus* cinsine ait izolatlar doğada farklı alanlarda bulunmaktadır ve bu bakterileri izolatlarının termofilik, halofilik/halotolerant, psikrofilik, alkalifilik ve asidofilik özellikler gösteren türleri olduğu bildirilmiştir (Logan ve Vos, 2015).

Bacillus türlerinin daha önce hava, gıda örnekleri, tuzlu bataklıklar, toprak örnekleri, deniz, çeşitli klinik örnekler ve termal kaplıca suları gibi ekstrem birçok habitattan izole edildiği bildirilmiştir (Gopal ve ark., 2015). Çalışmamızda *Bacillus* cinsine ait toplamda 9 farklı tür tanımlanmıştır. İzole ettiğimiz bu türlerden 8 adedi *Bacillus haynesii* (TKD1a, TKD2b, TKD3a, TKD3b, TKD4b, TKD5b, TKD10a, TKD10b), 1 adedi *Bacillus rugosus* (TKD1b), 1 adedi *Bacillus mojavenensis* (TKD5a), 3 adedi *Bacillus safensis* (TKD2a, TKD4a, TKD8a), 1 adedi *Bacillus amyloliquefaciens* (TKD6b), 1 adedi *Bacillus atrophaeus* (TKD6a), 1 adedi *Bacillus aerius* (TKD7b), 1 adedi *Bacillus pumilus* (TKD8b), 1 adedi *Bacillus kochii* (TKD9a) olarak tanımlanmıştır (Tablo 3.8). Çalışmamızda tuzlanmış ve depolanmış koyun derilerinde en fazla bulunan tür *Bacillus haynesii* (8 adet) olarak tespit edilmiştir. Tanımladığımız izolatların daha önce çeşitli alanlardan izole edildiği çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Bacillus haynesii* bakteri suşu daha önce yapılmış olan bir çalışmada İsrail’de bulunan çöl toprağından izole edilmiştir (Dunlap ve ark., 2017). Başka bir çalışmada Mısır’da alınan deniz suyu örneğinden (%0.5 tuz içeren besiyerinde) izole edilerek tanımlanmıştır (Bakry ve ark., 2022). Hindistan’da yapılan bir çalışmada alınan toprak örneklerinden *Bacillus haynesii* JUB2 bakteri suşu (%3 tuz içeren besiyerinde) izole edilmiştir (Brinda Bojamma Kotramada ve ark., 2020). Hindistan’da yapılan bir çalışmada Thar Çölü’nün tuzcul habitatlarından alınan toprak örneklerinden *Bacillus haynesii* suşu izole edilmiştir (Verma ve ark., 2014). Salda Gölü’nden alınan su örneklerinin incelendiği bir çalışmada *Bacillus haynesii* bakteri izolatının izole edildiği, yüksek oranda proteaz ve katalaz aktivitesine sahip olduğu ayrıca optimum %1.5 tuz konsantrasyonunda gelişebildiği bildirilmiştir (Caglayan, 2021). Bu durum çalışmamızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden izole edilen *Bacillus rugosus* bakteri suşu daha önce yapılan bir çalışmada Hindistan’da denizden alınan bir süngerden (*Suppongia officinalis*) izole edilmiştir ve optimum %2 tuz konsantrasyonunda gelişebildiği bildirilmiştir (Bhattacharya ve ark., 2020). Mısır’da alınan toprak örneklerinin incelendiği bir çalışmada *Bacillus rugosus* bakteri suşu izole edilmiş (%0.85 tuz içeren ortamda) yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızla bu açıdan benzerlik göstermektedir (Zalma ve El-Sharoud, 2021). Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus safensis* bakteri suşu izole edilmiştir. Daha önce bu bakterinin izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada tuzlanmış koyun derisi örneklerinden bu suş izole edilmiştir (Caglayan, 2015). Bir diğer yapılan çalışmada Maş fasulyesi tohumundan izole edilmiş ve çeşitli klinik patojenlere karşı bakteriyosin benzeri bir madde ürettiği tespit edilmiştir (Romero-Severson ve ark., 2021).

Tunus'ta açık deniz petrol sahasından alınan örneklerin incelendiği bir çalışma *Bacillus safensis* RH12 bakteri suşu izole edilmiştir ve biyoteknolojik önemi araştırılmıştır. Çalışmanın devamında yüksek proteaz aktivitesinden dolayı deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği ön görülmüştür (Rekik ve ark., 2019). Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus mojavensis* bakteri suşu izole edilmiştir. Bu bakteri üzerine yapılan daha önceki çalışmalara bakıldığında Mojave isimli bir çölden alınan toprak örneklerinden izole edilerek tanımlanmıştır (Roberts, 2005). Bir diğer çalışmada *Bacillus mojavensis* A21 bakteri suşu Tunus'ta tuzlu deniz suyu örneklerinden izole edilmiştir (Luria Bertani besiyeri, %5 tuz içeren) (Ben Ayed ve ark., 2014). Daha önce yapılan bir çalışmada *Bacillus mojavensis* KJS-3 bakteri suşu yüksek proteaz aktivitesi gösterdiği için bitki büyümesinde ayrıca gıda atıklarının temizlenmesindeki kullanım potansiyelinden dolayı oldukça ilgi çekmiştir (Choi ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da bu bakteri suşu proteolitik aktivite göstermiştir ki bu durumda deri örneklerinde bulunan yüksek oranda protein içeriğini sindirebilme potansiyelinden dolayı derilere zarar vermektedir. Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus atrophaeus* bakteri suşu izole edilmiştir. Bu bakteri suşunun taksonomik ismi zaman içerisinde değişmiştir. Gram-pozitif, aerobik bir bakteridir. Bu bakteri ürettiği pigment maddesinden dolayı 'ater' siyah, 'phaeus' kahverengi kelimelerinin birleşimi şeklinde isimlendirilmiştir. Bu bakteri suşu spor inaktivasyonu, bitki büyüme destekleyicisi, mahsul koruma ve farklı biyomoleküllerin üreticisi olarak büyük biyoteknolojik öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca olumsuz koşullar altında oluşturduğu dayanıklı spor yapısıyla bilinmektedir (Sella ve ark., 2015). Bu durum derileri kontamine edebilmesini kolaylaştırdığı gibi bu bakteri suşuyla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu bakterinin daha önce çeşitli alanlardan izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada toprak örneğinden izole edilmiştir (Enez, 2019). Bir diğer çalışmada Çin'de toprak örneklerinden *Bacillus atrophaeus* HAB-5 bakteri suşu izole edilmiş olup bu bakterinin bitki hastalıklarını kontrol etmedeki rolü araştırılmıştır (Rajaofera ve ark., 2019). Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus amyloliquefaciens* bakteri suşu izole edilmiştir. Bu bakterinin daha önce izole edildiği çalışmalara bakıldığında; *Bacillus amyloliquefaciens* B10 bakteri suşu Rize'de alınan bir toprak örneğinden izole edilmiş ve bakteriyosin benzeri bir madde üreterek çeşitli patojen bakterilerin kontrolünde kullanım potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Karaoğlu ve ark., 2014). Bir başka yapılan çalışmada ise Hindistan'da bir deniz yosunundan *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 12713 bakteri suşu izole edilmiş ve çeşitli klinik patojenlere karşı ümit verici bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Chakraborty ve ark., 2022).

Endonezya’da yapılan bir çalışmada tuzlu toprak örneklerinden *Bacillus amyloliquefaciens* UBC bakteri suşu izole edilmiştir ve proteaz üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca %5 tuz içeren besiyerinde optimum geliştiği için halofil olarak değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu bakteri suşu proteaz üreticisi olarak tanımlanmıştır bu durum diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (Prihanto ve ark., 2020). Derilerin korunmasında kullanılan tuzların incelendiği bir çalışmada tuz örneklerinden *Bacillus amyloliquefaciens* suşunun izole edildiği bildirilmiştir (Yılmaz, 2019). Bu bakterinin çalışmamızdaki deri örneklerinde de saptanması tuzla korunan derilerin tuzda bulunan halofil mikroorganizmalarla kontamine olduğunun bir göstergesidir. Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus aerius* bakteri suşu izole edilmiştir. Bu bakteri suşunun biyoteknolojik uygulamalar için hidrolitik enzim potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Örneğin; kaplıcalardan *Bacillus aerius* bakteri suşunun izole edildiği bir çalışmada lipaz üretimi için optimum şartlar incelenmiştir ve en iyi koşulun 55°C sıcaklık ve pH 8 olduğu bildirilmiştir (Saun ve ark., 2014). Bir çalışmada Hindistan’da bulunan kaplıcalardan alınan örneklerden *Bacillus aerius* CMCP51 bakteri suşu izole edilmiştir. Yüksek selüloz aktivitesine sahip olduğu ve yüksek sıcaklıklara kadar bu enzim stabil kaldığı için biyoteknolojik olarak önemli olduğu vurgulanmıştır (Ganesan ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da tuzlanmış ve depolanmış koyun derisi örneklerinden izole ettiğimiz *Bacillus aerius* bakteri suşu selüloz aktivitesine sahiptir bu kapsamda çalışmamız diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden *Bacillus pumilus* bakteri suşu izole edilmiştir. Yapılan bir çalışmada tuzlanmış koyun derisi örneklerinin 5 adedinde *Bacillus pumilus* bakteri suşunun izole edildiği bildirilmiştir (Caglayan, 2015). Ayrıca bu bakterinin daha önce toprakta, havada, suda, tuzlanmış fermente gıdalarda, çürüyen bitki ve hayvan dokularında bulunabildiği bildirilmiştir (Reyes-Cortes ve ark., 2021). Salda Gölü’nden alınan su örneklerinin incelendiği bir çalışmada *Bacillus pumilus* bakteri suşu izole edilmiş olup pozitif proteaz ve lipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Caglayan, 2021). Bizim çalışmamızda da bu bakteri suşu tuzlanmış koyun derilerinden izole edilerek proteaz ve lipaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir bu açıdan derilere zarar verme potansiyeli taşımaktadır. Çalışmamızda tuzlanmış deri örneğinden izole edilen *Bacillus kochii* bakteri suşu Güney Almanya’da yapılan bir çalışmada fermente bir gıdadan izole edilmiş olup optimum büyüme %0.5 (w/v) tuz varlığında gerçekleşmiştir (Seiler ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada ise toprak örneklerinden *Bacillus kochii* AHV-KH14 halofil bakteri suşu izole edilmiş olup biyoremediasyon potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda hidrokarbonlarla kirlenmiş toprak örneklerinin biyoremediasyonu için kullanılabileceği ön görülmüştür (Feizi ve ark., 2020).

Tuzlanmış ve 6 ay 20°C’de muhafaza edilmiş 10 adet koyun derisi örneğinden izole ederek tanımladığımız *Bacillus* cinsine ait izolatların koyun derisi örneklerinde bulunma sıklık durumları araştırılmıştır (Tablo 3.9). Deri örneklerinde en sık bulunan türün *Bacillus haynesii* (6 farklı deri örneğinde) olduğu saptanmıştır. Ardından en sık bulunan bir diğer tür *Bacillus safensis* (3 farklı deri örneği) olarak tespit edilmiştir. Diğer tanımlanan izolatlar (*Bacillus mojavenensis*, *Bacillus rugosus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus aerius*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus kochii*) ise 1 adet deri örneğinde saptanmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Tanımlanan İzolatların Deri Örneklerinde Bulunma Sıklığı.

Tanımlanan İzolatlar	Tuzlanmış Koyun Derisi Örnekleri										Saptandığı Toplam Deri Sayısı
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Bacillus haynesii</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	6
<i>Bacillus rugosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus safensis</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	3
<i>Bacillus mojavenensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Bacillus aerius</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Bacillus kochii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1

*(+) değeri bakterinin varlığını, (-) değeri bakterinin bulunmadığını temsil etmektedir.

Tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole ettiğimiz ve önce geleneksel ardından moleküler yöntemlerle tanımladığımız *Bacillus* cinsine ait izolatların daha önce çeşitli deri örneklerinden izole edildiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada Güney Afrika ve Avusturalya'dan alınan tuzla muhafaza edilmiş deri örneklerinden yüksek tuz koşulları altında önemli derece kolajenik aktiviteye sahip bakterilerin izole edildiği bildirilmiştir. Avusturalya'dan alınan tuzlanmış deri örneklerinde nispeten az sayıda kolajenik bakterinin bulunduğunu, bu durumun derilerin iyi korunmasından kaynaklandığını ve tuzlamanın düzgün şekilde yapılmasının önemli olduğu belirtilmiştir (Woods ve ark., 1972). Bir başka çalışmada araştırmacılar yeni kesilmiş 10 adet sığır derisi örneklerinden *B. subtilis* (7), *Bacillus megaterium* (2), *B. cereus* (4), *B. sphaericus* (3), *Micrococcus roseus* (2), *Kurthia variabilis* (1) ve *Staphylococcus aureus* (2) türlerini izole etmiş ve *Bacillus* cinsi bakterilerin çoğunlukta olduğunu bildirmişlerdir (Birbir ve Ilgaz, 1996). Polkade (2007), kesim yapıldıktan hemen sonra taze olarak alınmış bufalo derilerini incelediği bir çalışmada *Bacillus* cinsine ait bakteri suşlarını izole ettiğini ve bu bakterilerin diğer bakteri suşlarına göre daha yüksek hidrolitik aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Deri örneklerinde *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Escherichia* bakteri cinslerinin bulunduğunu bildirmiştir. Özellikle *Bacillus megaterium* bakteri suşunun derilere önemli ölçüde zarar verecek kadar proteolitik aktiviteye sahip olduğunu vurgulamıştır (Polkade, 2007).

Bir diğer çalışmada deri örneklerinden 668 adet bakteri izole edilerek tanımlanmıştır. Tuzlanmış deri örneklerinde 36 farklı cinse ait 108 adet bakteri izole edilmiştir. Çalışmanın sonucunda deri örneklerindeki en yaygın bakteri cinslerinin *Bacillus* (111), *Enterobacter* (66), *Pseudomonas* (59), *Enterococcus* (75) ve *Staphylococcus* (115) olduğu bildirilmiştir (Aslan, 2009). Tuzlama işleminin derinin her bölgesine homojen bir şekilde yapılmadığı bu sebeple derinin farklı bölgelerinden izole edilen bakteri suşlarının sayılarında farklılıklar gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Tuzlanmış deri örneklerindeki tuz kristali bulunan bölgelerinden alınan örneklerde çok sayıda Gram-pozitif, kok ve basil (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*) bakteri suşlarını izole ettiklerini bildirmişlerdir (Aslan, 2009). Yapılan bir çalışmada deride kokuşmanın olduğu bölgelerden alınan örneklerden *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. anthracoides* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları izole edilmiştir. Bu bakterilerin aynı zamanda deriler üzerinde delik oluşumuna da sebep olduğu bildirilmiştir (Orlita, 2004).

2 aylık tuzla salamura edilen deri örneklerinin incelendiği bir çalışmada *S. aerius* (3), *B. subtilis* (34), *B. sphaericus* (8), *B. cereus* (3), *B. megaterium* (7), *K. variabilis* (1) ve *M. roseus* (6) bakterilerinin izole edildiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda *Bacillus* ve *Micrococcus* gibi bakterilerin tuzlu ortamlarda gelişme gösterebildiği bildirilmiştir (Birbir, 1991).

Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızla kıyaslandığında taze derilerde bulunarak derilerde bozulmaya sebep olan *Bacillus* cinsine ait türlerin tuzla muhafaza edilerek 6 ay 20°C’de depolanmış koyun derisi örneklerinde de bulunması tuzlama işleminin bu mikroorganizmaların gelişmesini önlemede yetersiz kaldığı olgusunu desteklemektedir. Bu durum derilerin rastgele tuzlanması, tuz miktarının yeterli miktarda kullanılmamasından, depolama koşullarına gerekli önemin verilmemesinden ayrıca istifleme koşullarındaki hatalardan kaynaklanabileceği muhtemeldir. Ayrıca ülkemizde Tuz Gölü ve Salda Gölü gibi alanlardan alınan tuzların derilerin korunmasındaki kullanımından dolayı bu tuzcul alanlarda bulunan mikroorganizmaların tuzlar yoluyla derilere bulaşarak kontamine etmesi de bir diğer ihtimaldir. Örneğin; araştırmacılar Çorlu ve Tuzlada bulunan 14 farklı deri fabrikasından aldıkları tuz örneklerinden 83 adet halotolerant bakteri izole ettiklerini ve bu bakteri suşlarının 12 tanesinin *Bacillus* cinsine (*B. atrophaeus*, *B. paralicheniformis*, *B. safensis*, *B. tequilensis*, *B. siamensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. amyloliquefaciens*) ait olduğunu bildirmişlerdir (Yılmaz ve Birbir, 2019).

3.10. Tuzlanmış Koyun Derilerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakteri İzolatlarının Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması ve Birbirlerine Karşı Oluşturduğu İnhibisyonların Belirlenmesi

Çalışmamızda tuzlanmış koyun derisi örneklerinden izole ederek tanımladığımız *Bacillus* cinsine ait 9 farklı bakteri izolatının bakteriyosin üretim kapasitesi ve birbirlerine karşı oluşturdukları antagonistik etki araştırılmıştır. İzolatların materyal-metot kısmında belirtildiği şekilde hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatatları (CFS) elde edildikten sonra %3 tuz içeren Kompleks Besiyeri üzerine ekimi yapılan diğer bakteriler üzerine mikropipet yardımıyla 3 µl alınarak konulmuş ve oluşan zonlar incelenmiştir. İzolatların birbirlerine karşı bakteriyosin üretim sonuçlarına göre *Bacillus haynesii* (TKD1a) izolatı 3 izolat (*Bacillus mojavensis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus kochii*) üzerine, *Bacillus amyloliquefaciens* (TKD6b) izolatı 1 izolat (*Bacillus atrophaeus*) üzerine, *Bacillus aerius* (TKD7b) izolatı 5 izolat (*Bacillus haynesii*, *Bacillus rugosus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*) üzerine, *Bacillus safensis* (TKD2a) izolatı 1 izolat (*Bacillus atrophaeus*) üzerine antagonistik etki göstermiştir.

Bacillus rugosus, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus kochii* bakteri suşları diğer suşlara karşı bakteriyosin üretmediği için tabloda gösterilmemiştir (Tablo 3.10).

Tablo 3.10. İzolatların Birbirine Karşı Bakteriyosin Üretimlerinin İncelenmesi.

İzolat Kodu	Bakteriyosin Üreten İzolatlar	Bakteriyosinden Etkilenen İzolatlar								
		<i>Bacillus haynesii</i>	<i>Bacillus rugosus</i>	<i>Bacillus safensis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus kochii</i>
TKD1a	<i>Bacillus haynesii</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+
TKD2a	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TKD6b	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TKD7b	<i>Bacillus aerius</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-

*(+) : İnhibisyon zonu görülen, (-) : İnhibisyon zonu görülmeyen anlamında kullanılmıştır.

Çalışmamızda en fazla sayıda izolatin ürettiği bakteriyosinden etkilenen suş *Bacillus atrophaeus*'tur ve 3 adet izolatin (*B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aerius*) ürettiği bakteriyosinden etkilenmiştir. *B. amyloliquefaciens* bakteri suşu ise diğer izolatların ürettiği bakteriyosinden etkilenmemiştir (Tablo 3.10). Bakteriyosinler ribozomlarda sentezlenen, düşük moleküler ağırlığa sahip protein veya peptitlerdir. Bakteriyosinler aynı veya farklı bakteri grupları tarafından sentezlenip ilgili veya ilgisiz bakteriler üzerinde antagonistik etki yaparak bakterilerin üremesini durdurarak (bakteriyostatik) ya da bakterileri öldürerek (bakteriyosidal) etki ederler (Zafar ve ark., 2022). Antibiyotiklerle kıyaslandığında nispeten dar bir aralıkta etkili olan bakteriyosinler biyoteknolojik olarak önemli kullanım potansiyeli göstermektedirler. Bakteriyosin molekülleri fermente gıda ürünlerden, toprak örneklerine kadar çeşitli farklı habitatlardaki mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Xie ve ark., 2009). Çalışmamızda izole edilen *Bacillus* cinsine ait izolatların daha önce antimikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; tuzlu deniz örneklerinden izole edilen *Bacillus pumilus* SF214 bakteri suşunun *S. aureus* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı Pumilasidin adı verilen bakteriyosin benzeri bir antimikrobiyal madde ürettiği bildirilmiştir. Bu antimikrobiyal maddenin geniş pH aralığında aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Saggese ve ark., 2018).

Araştırmacılar *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65 bakteri suşunun kavunlarda bozulmaya sebep olan *L. monocytogenes* gıda patojenine karşı inhibe edici etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (Tran ve ark., 2020). Bir diğer yapılan çalışmada araştırmacılar *Bacillus amyloliquefaciens* BTSS3 bakteri suşundan bakteriyosin BaCf3'ü kullanarak gıda kaynaklı patojenler üzerine etkilerini araştırmışlar. Bu bakteriyosinin ısı stabil olduğu ve geniş pH (2-13) aralıklarında aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca gıda maddeleri üzerindeki biyofilm oluşumunu da %80 oranında azalttığını belirtmişlerdir (Bindiya ve ark., 2019). Araştırmacılar *Bacillus amyloliquefaciens* RX7 bakteri suşunun gıda patojenlerine ve *Candida albicans* mantarına karşı bakteriyosin ürettiğini bildirmişlerdir (Lim ve ark., 2016). Gaziantep ilinden alınan toprak örneklerinin incelendiği bir çalışmada bu örneklerden 121 adet *Bacillus* cinsine ait bakterinin izole edildiği bildirilmiştir (Topçal ve ark., 2014). Bu bakteri izolatlarından sadece *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides*, *B. megaterium* ve *B. subtilis* türlerinin *E.coli* ve *M. luteus*'a karşı bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir (Topçal ve ark., 2014). Ayrıca, *B. pumilus* da dâhil olmak üzere *Bacillus* spp. tarafından üretilen bakteriyosinlerin, Gram-pozitif ve az sayıda Gram-negatif mikroorganizmanın gelişmesini engellediği bildirilmiştir (Das Sarma ve Arora, 1997). Araştırmacılar bir çalışmada *Bacillus licheniformis* suşu tarafından Bacillocin 490 isimli bakteriyosinin üretildiğini tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında ise bu bakteriyosinin yakından ilişkili olduğu diğer *Bacillus* spp. suşları üzerine aktif olduğunu bildirmişlerdir (Martirani ve ark., 2002). *Bacillus* cinsine ait izolatların antibiyotik, bakteriyosin, lipopeptit, antimikrobiyal peptit gibi aktif bileşikler ürettiği uzun zamandır bilinmektedir. Özellikle *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* bakteri türleri tarafından uzun zamandır antibiyotik üretimleri üzerine çalışmalar yapıldığı bildirilmiştir (Sansinenea ve Ortiz, 2011). *B. licheniformis* tarafından üretilen basitrasin, *B. brevis* tarafından üretilen gramisidin, *B. polymyxa* tarafından üretilen polimiksin gibi antibiyotiklerin ilaç endüstrisinde kullanımı bilinmektedir (Hong ve ark., 2022).

3.11. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Sıcaklık, pH, Tuz Konsantrasyon Değerlerinin ve Enzim Etkisinin İncelenmesi

Bacillus aerius (TKD7b) izolatı diğer izolatlarla kıyaslandığında geniş bir antibakteriyel etki gösterdiği için (5 izolat üzerine) bu izolatla bakteriyosin deneylerine devam edilmiştir ve daha detaylı çalışılmıştır. *Bacillus aerius* izolatı *Bacillus haynesii*, *Bacillus rugosus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus atrophaeus* ve *Bacillus pumilus* izolatları üzerine antibakteriyel etki göstermiştir.

Bu izolatın ürettiği bakteriyosin için optimum koşulların tespit edilmesi için hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatant (CFS) farklı sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonlarıyla ayrıca proteinaz K ve lipaz gibi enzimlerle muamele edilerek araştırılmıştır (Tablo 3.11).

Tablo 3.11. *Bacillus aerius* Bakteri İzolatından Elden Edilen Bakteriyosinin Farklı Sıcaklık, pH, Tuz Konsantrasyonu Ayrıca Proteinaz K ve Lipaz Gibi Enzim Koşullarında Diğer Bakteriler Üzerindeki İnhibisyon Sonuçları.

<i>Bacillus aerius</i> (TKD7b) izolatından elde edilen bakteriyosinin etki ettiği türler					
	<i>Bacillus haynesii</i>	<i>Bacillus rugosus</i>	<i>Bacillus safensis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
İzolat Kodu	TKD1a	TKD1b	TKD2a	TKD6a	TKD8b
Parametreler					
Enzim Üretimi	Proteaz ve lipaz	Proteaz ve lipaz	Proteaz	Proteaz	Proteaz ve lipaz
Farklı Sıcaklık Değerleri (°C) (15 dk)					
4	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+
60	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-
pH (3 saat)					
4	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+
7	-	+	-	+	+
8	-	+	-	+	+
9	-	+	-	+	+
10	-	-	-	+	+
Tuz Konsantrasyon Değerleri (%)					
3	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+
10	-	-	+	+	-
20	-	-	-	+	-
Enzim (2 saat)					
Proteinaz K	-	-	-	-	-
Lipaz	+	+	+	+	+

*(+) : İnhibisyon var (-) : İnhibisyon yok anlamında kullanılmıştır.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine farklı çevresel faktörlerin etkisi değerlendirildiğinde; *Bacillus aerius* (TKD7b) bakteri izolatından elde edilen bakteriyosinin 4, 19, 24, 37 ve 50°C’de, 15 dakika ısıtılma işlemde antimikrobiyal aktivitesinin kaybetmediği ve dayanıklı olduğu, ancak 60°C ve 70°C’de 15 dakikalık ısı muamelesinden sonra bakteriyosinin inhibitör aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir (Tablo 3.11).

Daha önce yapılan çalışmalarda tuzlanmış derilerden ve çeşitli tuzcul ortamlardan izole edilen halofil/halotolerant organizmalara ait birkaç cinsin bakteriyosin üretme yeteneğinde olduğu bildirilmiştir (Xie ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada tuzlanmış balık ve soya sosundan izole edilen halofilik bakteri izolatlarının *S. aureus* suşuna karşı bakteriyosin üretimi ve bakteriyosin kodlayan gen bölgeleri araştırılmıştır. Toplam 124 izolattan 37 izolatın inhibe edici etki gösterdiği ve bu 37 izolatın %24.3’ünün subtilisin genini (*spaS*) kodladığını tespit etmişlerdir (Chhetri ve ark., 2019). Bir diğer çalışılan bakteriyosin örneği ise halofilik arkeler tarafından üretilen halosindir ve daha çok denizel organizmalar tarafından üretilmektedirler. Özellikle bu moleküller yüksek tuzcul ortamlarında stabil kalabildiği için özel bir öneme sahiptir (Xie ve ark., 2009). Şimdiye kadarki 15 farklı halosin tespit edilmiştir. Bunlardan üzerinde en fazla çalışılanlar ise Halosin S8 (36 amino asit) ve *Haloferax mediterranei* tarafından üretilen Halosin H4 olduğu bildirilmiştir (Price ve Shand, 2000). Halosinlere dair yapılan birkaç çalışma mevcuttur. Tuz Gölü’nden, Kaldırım ve Kayacık Tuzlalarından alınan örneklerin incelendiği bir çalışmada aşırı derecede halofilik arkeler izole edilerek bu izolatların ürettiği halosinlerin tuzla kürlenmiş derilerde halofilik mikroorganizmaların verdiği hasarı önlemek için kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda Tuz Gölü’nden izole ettikleri 19 suştan 7’si, Kaldırım Tuzlası’ndan izole ettikleri 18 suştan 16’sı, Kayacık Tuzlası’ndan izole edilen 7 suştan 2’si ve Tuzköy Tuz Madeni’nden izole ettikleri 12 suştan 10’u birbirine karşı halosin üretmiştir. Ayrıca çalışmanın devamında en güçlü halosin üreticisi suşların Kaldırım Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni’nde bulunduğunu bildirmişlerdir (Birbir ve Eryılmaz, 2004). Çalışmada halosin üreticisi suşların Gram negatif ve hareketli olduğu belirtilmiştir (Birbir ve Eryılmaz, 2004). Tüm bu örneklerle bakıldığında çeşitli halofil/halotolerant bakteri ve arke türlerinin bakteriyosin üretme potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

Yapılan daha önceki araştırmalara bakıldığında araştırmacılar deri örneklerinden izole ettikleri *Haloferox larsenii* HA1 halofilik arke suşu tarafından üretilen Halocin HA1'in aktivitesinin 60, 80, 100°C hatta 121°C'de 15 dakika ısıtılma tabii tutulduktan sonra bile aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir (Kumar ve Tiwari, 2017). Bir diğer çalışmada Hindistan'da bulunan tuzlulardan *Natrinema* sp. BTSH10 halofil arke suşunun ürettiği Halosin SH10'un 45°C sıcaklığa kadar inhibisyon aktivitesini koruduğu, 42°C'de ise optimumum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Karthikeyan ve ark., 2013). Hindistan'da deniz kenarında bulunan tuzlu toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin bakteriyosin üretimlerinin incelendiği bir çalışmada en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip suş tespit edilip tanımlamaya gidildiğinde bu bakterinin biyokimyasal ve moleküler analizler sonucu *Bacillus pumilus* olduğu tespit edilmiştir (Rajesh ve ark., 2012). Çalışmanın devamında Pumiviticin olarak adlandırdıkları bu bakteriyosinin 1M NaCl varlığında, pH 8'de en iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 110°C sıcaklıkla 2 saat muameleden sonra bile aktivitesini kaybetmediği için termostabil kabul edilmiştir (Rajesh ve ark., 2012). Tuzlu peynirlerden izole edilen halotolerant *Brevibacterium linens* bakteri suşunun bakteriyosin üretimi üzerine farklı çevresel koşulların etkilerinin incelendiği bir çalışmada farklı sıcaklıklarda bakteriyosin aktivitesinde 25°C ve 30°C'de aktivite kaybı olmadığı fakat 37°C'de aktivite kaybının meydana geldiği belirtilmiştir (Motta ve Brandelli, 2003). Bizim çalışmamız ve diğer çalışmalara bakıldığında halofil/halotolerant bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin ya da halofilik arkeler tarafından üretilen halosinlerin yüksek sıcaklıklara kadar aktivitesini koruyabildiği anlaşılmaktadır. Bakteriyosinlerin termostabil yapıda olması pek çok gıda işleme sürecinde yüksek ısılarla maruz kalan gıda maddelerinde biyokoruyucu olarak kullanımı için önemlidir (Biscola ve ark., 2013; Zafar ve ark., 2022).

Bakteriyosin aktivitesi farklı pH değerlerinde (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) incelendiğinde *Bacillus aerius* (TKD7b) izolatı tarafından üretilen bakteriyosinin *Bacillus rugosus* (TKD1b) (pH 4-9), *Bacillus atrophaeus* (TKD6a) ve *Bacillus pumilus* (TKD8b) (pH 4-10) izolatlarına karşı geniş pH aralıklarında antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 3.11). Yapılan bir çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* RX7 bakteri suşunun ürettiği bakteriyosinin geniş pH (3-8) aralıklarına kadar stabil kaldığını bildirmişlerdir (Lim ve ark., 2016). Genenekselle Kore fermente soya fasulyesi ezmesi Doenjang'dan *Bacillus subtilis* HD15 suşunun izole edildiği bir çalışmada *B. cereus* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı bakteriyosin sentezlediği ve bu bakteriyosinin geniş pH (2-10) aralıklarında yapısının stabil kaldığı bildirilmiştir (Hong ve ark., 2022).

Bir diğerk yapılan araştırmada *Bacillus thuringiensis* bakteri suşunun ürettiğı bakteriyosinin geniş pH (3-9) aralıklarında aktivitesini kaybetmediğı ve *Paenibacillus larvae*, *L. monocytogenes* gibi bakteri suşları üzerine ayrıca Gram-pozitif *Bacillus* cinsi bakteriler üzerine etkili olduğı bildirilmiştir (Cherif ve ark., 2008).

Bakteriyosin aktivitesi %3, 5, 10, 20'lik tuz konsantrasyonlarında incelenmiştir. %3 tuz konsantrasyonunda tüm izolatlarda inhibisyon gözlenmiştir. *Bacillus safensis* (TKD2a) ve *Bacillus atrophaeus* (TKD6a) izolatlarına karşı inhibisyon zonları yüksek tuz (%3, 5 ve 10) konsantrasyonlarında gözlemlenebilmiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça bakteriyosin aktivitesinde azalma olmuştur. Bu durumun bakteriyosinlerin protein yapısında olmasından kaynaklı olduğı kuvvetli muhtemeldir.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine proteinaz K ve lipaz enzimlerinin etkisi incelendiğinde *Bacillus aerius* (TKD7b) izolatu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesinin proteinaz K enzimi ile muamele edildikten sonra aktivitesini kaybettiğı ancak lipaz enzimiyle muamele edildikten sonra aktivitesini kaybetmediğı ve inhibisyon zonu oluştuğı tespit edilmiştir (Tablo 3.11). Yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* H27 bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin proteinaz K ve proteaz enzimleriyle muameleden sonra aktivitesini kaybettiğı, tripsin ve pepsin gibi enzimlerle muamele edildikten sonra ise aktivitesini koruduğı bildirilmiştir (Kindoli ve ark., 2012). Bir diğerk çalışmada, *Bacillus subtilis* HD15 bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin proteinaz K ve pronaz E enzimleriyle muameleden sonra aktivitesini tamamen kaybettiğı, lipaz ve α -amilaz enzimleriyle muameleden sonra ise aktivitesini koruduğı bildirilmiştir (Hong ve ark., 2022). Topraktan alınan örneklerden *Bacillus cereus* bakteri suşunun ürettiğı bakteriyosin örneğinin proteinaz K enzimi ile muameleden sonra aktivitesini tamamen kaybettiğı, tripsin enzimiyle 1 saat muamele edildikten sonra ise aktivitesini büyük oranda koruduğı sadece %25'ini kaybettiğı bildirilmiştir (Kaya şen ve Katı, 2023). Çin bitkilerinden izole edilen suşlardan *Bacillus subtilis* LFB112 bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Micrococcus luteus* gibi evcil hayvanlarda hastalık yapan bakterilere karşı etkili olduğı bildirilmiştir. Çalışmanın devamında bu bakteriyosinin proteinaz K ve pronaz E enzimlerine karşı duyarlı olduğı pepsin, papain, tripsin gibi enzimlere karşı dayanıklı olduğı bildirilmiştir (Xie ve ark., 2009). Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızla paraleldir ve bakteriyosinlerin protein doğasında olduğunun göstergesidir.

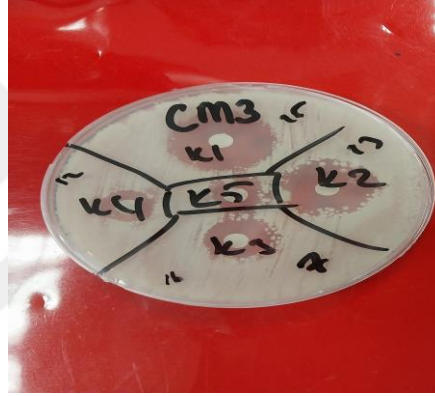
Daha önceki araştırmalarda bir ürünün bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi ve kullanılabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerektiği bildirilmiştir. Bu kriterler şu şekilde sıralanabilir:

1. Bakterisidal (bakterileri öldürebilen) etki göstermeli,
2. Biyolojik olarak aktif bir protein yapısına sahip olmalı,
3. Spesifik bir hücre reseptörüne bağlanabilmeli,
4. Üretimlerini lethal biyosentez yolağı ile gerçekleştirebilmeli ayrıca konakçı ve hücre arasındaki etkileşimleri plazmid kökenli determinantlara bağlı olmalı,
5. Antibiyotiklere kıyasla bakteriyosinler nispeten dar bir etki spektrumuna sahip olmalıdır (Evren ve ark., 2006).

Çalışmamızda tuzlanmış koyun derilerinden izole ettiğimiz bakteri izolatlarının bakteriyosin üretim kapasitesi araştırılmıştır. Bu izolatlardan *Bacillus aerius* (TKD7b) bakteri izolatı diğer suşlara oranla yüksek antibakteriyel etki gösterdiği için çalışmaya bu izolatla devam edilmiştir. Ardından bu izolat tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine çevresel faktörlerin etkisini tespit etmek için hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatant (CFS) farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılarak ayrıca proteinaz K ve lipaz enzimleriyle muamele edilerek antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz bakteriyosin 4, 19, 24 ve 37°C sıcaklık değerlerinde, pH 4'de, %3 tuz konsantrasyonunda ve lipaz enzimi varlığında tüm izolatlar üzerinde aktivite göstermiştir. Ortaya çıkan sonuçlara bakıldığında çalışmamızda tanımlanan bakterilerin birbirine karşı bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu ve bu bakteriyosinlerin derileri işleme sürecinde antimikrobiyal maddelere alternatif olarak kullanılabilme potansiyelinin bulunduğu anlaşılmaktadır. Özellikle antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımından dolayı ortaya çıkan antibiyotik direnci sorununun üstesinden gelmek için farklı alternatifler değerlendirilmektedir. Ayrıca deri endüstrisinde kullanılan kimyasalların ortaya çıkardığı tehlikeli atıkların çevre kirlenmesi ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri de göz önüne alınırsa bu kapsamda bakteriyosinler alternatif olarak düşünülebilir. Yukarda saydığımız kriterler de göz önüne alınarak bu çalışmanın devamında *Bacillus aerius* (TKD7b) suşuna ait bakteriyosinin deri endüstrisinde antibakteriyel ajan olarak kullanımı için bakteriyosin örneğinin saflaştırılması, protein profilinin incelenmesi ve diğer fiziksel parametrelerin (deterjanların varlığı, ağır metal gibi stres koşulları) değerlendirilmesi bu kapsamda ileri hedefler olarak düşünülebilir.

3.12. Tuzlanmış ve Depolanmış Koyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen Zayıf Halofil Bakterilerin Sodyum dimetilditiyokarbamat Aktif İçeriğe Sahip Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Tespit Edilmesi

Tuzlanarak depolanmış koyun derisi numunelerinden izole ederek tanımladığımız *Bacillus haynesii*, *Bacillus rugosus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus aerius*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus kochii* izolatlarına karşı deri endüstrisinde kullanılan sodyum dimetilditiyokarbamat aktif içeriğe (%40) sahip antimikrobiyal maddenin materyal-metot kısmında belirtildiği şekilde hazırlanmış olan 18 farklı konsantrasyon değerine karşı duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile tespit edilmiştir (EUCAST, 2000). Oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Antimikrobiyal Maddeye Karşı Oluşan İnhibisyon Zonu.

Çalışmamızın sonuçlarına göre antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu arttıkça izolatlardaki inhibisyon çapının da arttığı saptanmıştır. Antimikrobiyal madde 4000 µg/mL konsantrasyonda tüm bakteri izolatlarında 25 mm üzerinde inhibisyon zonu oluşturmuştur. 4000 µg/mL'lik konsantrasyonda *Bacillus haynesii* izolatında 25 mm, *Bacillus rugosus* izolatında 25 mm, *Bacillus safensis* izolatında 32 mm, *Bacillus mojavensis* izolatında 27 mm, *Bacillus atrophaeus* izolatında 25 mm, *Bacillus amyloliquefaciens* izolatında 30 mm, *Bacillus aerius* izolatında 27 mm, *Bacillus pumilus* izolatında 28 mm, *Bacillus kochii* izolatında 30 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur (Tablo 3.12). Antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu azaldıkça izolatlardaki inhibisyon çapı da düşmüştür. Antimikrobiyal maddenin izole ettiğimiz bakterileri inhibe ettiği en düşük konsantrasyon değerleri şu şekildedir: *Bacillus haynesii* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 31.25 µg/mL olarak, *Bacillus rugosus* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 62.50 µg/mL olarak, *Bacillus safensis* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 31.25 µg/mL olarak, *Bacillus*

mojavensis için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 31.25 µg/mL olarak, *Bacillus atrophaeus* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 3.90 µg/mL olarak, *Bacillus amyloliquefaciens* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 15.62 µg/mL olarak, *Bacillus aerius* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 15.62 µg/mL olarak, *Bacillus pumilus* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 7.81 µg/mL olarak, *Bacillus kochii* için antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyon değeri 15.62 µg/mL olarak saptanmıştır (Tablo 3.12). İzolatların antimikrobiyal maddeye karşı en düşük konsantrasyon değeri (MİK) tabloda kırmızı renk ile belirtilmiştir (Tablo 3.12).

Tablo 3.12. Tuzlanmış ve Depolanmış Derilerden İzole Ederek Tanımladığımız Bakteri İzolatlarının 18 Farklı Konsantrasyonda Hazırlanmış Sodyum dimetilditiyokarbomat Aktif İçeriğe Sahip Antimikrobiyal Maddeye Karşı Duyarlılık Durumlarının Sonuçları.

	Son Konsantrasyon (µg/mL)	<i>Bacillus haynesii</i> (TKD1a)	<i>Bacillus rugosus</i> (TKD1b)	<i>Bacillus safensis</i> (TKD2a)	<i>Bacillus mojavensis</i> (TKD5a)	<i>Bacillus atrophaeus</i> (TKD6a)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (TKD6b)	<i>Bacillus aerius</i> (TKD7b)	<i>Bacillus pumilus</i> (TKD8b)	<i>Bacillus kochii</i> (TKD9a)
		Zon Çapları (mm)								
1	4000	25	25	32	27	25	30	27	28	30
2	2000	19	20	31	25	18	22	23	24	25
3	1000	18	19	30	15	14	20	21	20	20
4	500	15	17	25	12	13	15	18	17	19
5	250	14	15	17	11	10	15	17	15	16
6	125	14	13	10	9	10	14	16	13	15
7	62.50	11	-	9	7	9	10	12	12	12
8	31.25	-	-	-	-	9	10	9	12	10
9	15.62	-	-	-	-	8	-	-	10	-
10	7.81	-	-	-	-	6	-	-	-	-
11	3.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Deriler işlem görmeyen kuru tuz ile tuzlandığında çeşitli halofil bakterileri ve halofil arkeleri barındırdığı için deri kalitesini etkilemekte ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu sebeple tuza ek yada tuzu tamamlayıcı çeşitli biyositler, dezenfektanlar, antiseptikler, potasyum klorür (KCl), borik asit (H_3BO_3), naftalin, kloritler, karbamik asit tuzları vb. bazı kimyasalların kullanımı uzun zamandır bilinmektedir (Orlita, 2004; Garg ve ark., 2019). Derilerin korunmasında birçok formülasyon kullanılmaktadır. Fakat bunlardan sadece birkaçı çevre koruma açısından uygundur. Modern çevre koruma yöntemlerine göre kimyasal koruyucular zararlı metabolitler oluşturmada kimyasal ve biyolojik yollarla bozulmalıdır ve çevreye toksik olmamalıdır (Falkiewicz-Dulík, 2015). Tuzlanmış derilerin korunmasında daha önceki araştırmalara bakıldığında derilerde hasara sebep olan halofilik bakterilere karşı çeşitli inhibisyon yöntemleri denenmiştir. Araştırmacılar alkiltrimetilamonyum bromür (ATMB) ve klorheksid-diglukonatin (CDG) sinerjistik etkinliğini tuzla kürlenmiş deri üzerinde kırmızı ısı ve mor leke bozulmalarına neden olarak deri kalitesini etkileyen seçilmiş mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğini değerlendirmiş ve etkili bulmuşlardır (Hussain ve ark., 2021). Diğer bir çalışmada koyun derisi üzerine gümüş nanopartikülleri denenmiş ve antibakteriyel etkisinin koyun derisi üzerindeki etkileri SEM ile görüntülenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı %98.9'luk bir oranda antibakteriyel inhibisyon görülmüştür (Yang ve ark., 2012). *Aloe vera* bitki ekstraktının işlenmiş deriler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada süet derilerinin tabaklanma işleminin ardından *A. vera* bitki ekstraktı beş farklı konsantrasyonda (%2, 4, 6, 8 ve 10) uygulanmış ve *A. vera* konsantrasyonuna göre derinin nem içeriği ve yumuşaklığının arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda etanol bazlı ve su bazlı hazırlanmış ekstraktların çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşları üzerinde ayrıca *Candida albicans* mantarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Bitlisli ve ark., 2010). NaCl ve borik asitin birlikte uygulandığı bir çalışmada Gram-pozitif bakterilerin (*S. epidermidis*, *E. faecium*), Gram-pozitif spor oluşturabilen bakterilerin (*B. pumilus*, *B. licheniformis*) ayrıca Gram-negatif bakterilerin (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) ve bu bakterilerin karma kültürleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen veriler yüksek konsantrasyonlarda NaCl ve borik asitin birlikte uygulanmasıyla bakteri gelişimini önlediği ancak bakterilerin hâlâ canlı olduğu ve tamamen yok edilemediği bildirilmiştir (Birbir ve ark., 2013). *Aphanamixis polystacyha* tohumundan elde edilen yağ kullanıldığı bir başka çalışmada %15 yağ kaynaklı koruma tekniğinin keçi derisini 30 gün boyunca koruyabildiği bildirilmiştir (Nur-A-Tomal ve ark., 2021).

Ayrıca deri endüstrisinde büyük oranda 1-2 diklorobenzen, naftalin, sodyum bisülfid, asetik asit, sodyum sülfat, alkil fenol etoksilat kullanımı da bildirilmiştir (Veyselova ve ark., 2013). Diğer kullanılan bakterisitlere örnek olarak potasyum dimetilditiyokarbamat, metilen bistiyosiyamid verilebilir. Bu listeye aynı zamanda BNPD (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) ve gümüş nanopartükülleri de eklenebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada bizim de çalışmamızda kullanmış olduğumuz sodyum dimetilditiyokarbamat içerikli antimikrobiyalın farklı konsantrasyonlarının çeşitli bakteri suşları üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *M. luteus* ve bunların karışık kültürleri üzerine 1000 µg/ml konsantrasyonda, *B. cereus* ve *E. coli* üzerine 500 µg/ml konsantrasyonda, *E. faecalis*, *S. epidermidis* üzerine 15.6 µg/ml konsantrasyonda, *B. subtilis* üzerine ise 3.9 µg/ml'lik konsantrasyonda etki gösterdiği saptanmıştır (Caglayan, 2018). Ayrıca çeşitli liken ekstraktları, bitki özleri ve antibiyotikler de deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Örneğin; *Acalypha indica*, *Luquidambar orientalis*, *Aloe vera*, *Azadirachta indica*, *Lawsonia inermis*, organosülfür bileşikler, *Sesuvium portulacastrum* deri endüstrisinde daha önce denenmiş çeşitli antimikrobiyal ajanlardır (Bitlisli ve ark., 2010; Veyselova ve ark., 2013). Yapılan bir araştırmada *Usnea* sp., *Bryoria capillaris*, *Pseudevernia furfuracea*, *Ramalina farinacea*, *Hypogymnia tubulosa*, *Lobaria pulmonaria*, *Platismatia glauca*, *Evernia divaricata* türlerine ait liken ekstraktlarının *Staphylococcus saprophyticus* ve *Salinicoccus roseus* Gram-pozitif ılımlı halofil bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Bu liken ekstraktlarından *L. pulmonaria*, *P. glauca*, *P. furfuracea*, *B. capillaris* türlerine ait ekstraktlar test bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermezken, *H. tubulosa*, *Usnea* sp., *R. farinacea*, *E. divaricata* liken ekstraktları önemli ölçüde antibakteriyel etki göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda liken ekstraktlarının ham derilerin/postların korunmasında ılımlı halofil bakterileri kontrol etmek için kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Toksoz ve ark., 2023). *Evernia divaricata*, *Pseudevernia furfuracea*, *Usnea* sp., *Hypogymnia physodes* liken ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *Bacillus toyonensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* bakterileri suşlarına karşı inhibe edici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *E. divaricata* ekstraktının *B. mojavensis*, *B. toyonensis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* suşlarını tamamen öldürdüğü aynı zamanda bu liken ekstraktının 240 µg/ml'lik konsantrasyonda *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* suşlarına karşı da antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda liken ekstraktlarının deri endüstrisinde kullanılabilme potansiyelinin olduğu bildirilmiştir (Berber, 2020).

Tüm bu çalışmalar incelendiğinde tuzla koruma yöntemi en sık kullanılan geleneksel yöntemlerden biri olmasına rağmen halofil/halotolerant bakterilerin ve halofilik arkelerin gelişimi için uygun bir ortam oluşturduğundan, tuza ek olarak çeşitli biyositler, bitki ekstraktları ya da bazı kimyasalların kombine kullanımı önerilmektedir. Ayrıca fiziksel yöntemlerden soğutma yöntemi, vakumla presleme yöntemi, elektrik akımı veya elektron ışınlarının kullanımı gibi yöntemler de daha önce denenmiştir (Bailey, 1999; Birbir ve ark., 2020; Gaidau ve ark., 2021). Bu çalışmada sodyum dimetilditiyokarbomat aktif içerikli kimyasalın tuzlanmış koyun derilerinden izole edilerek moleküler olarak tanımlamasını yaptığımız bakteri izolatları üzerindeki inhibe edici etkisi incelenmiştir. Bu bakteri suşlarının kullandığımız antimikrobiyal maddeye karşı hassas olduğu konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bakteri suşlarının deri endüstrisindeki kontrolü için kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmüştür.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Tuzla koruma yöntemi en eski koruma yöntemlerinden biridir. Çeşitli gıdalar (balık, sebzeler) ve hayvan derileri tuzla kürlenerek uzun süreler saklanabilmektedir. Tuzlama yönteminde tuz deriye nüfus ederek deriden suyun çekilmesine neden olur ve mikrobiyal enzimlerin çalışması için gerekli olan su miktarı bu şekilde düşürülmüş olur (Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir ve Caglayan, 2018). Bu yöntemle tuza tolerans gösteremeyen mikroorganizmaların gelişimi önlenirse de yüksek tuz koşullarında halofilik mikroorganizmalar gelişebilmektedir. Özellikle işlem görmemiş tuzların kullanımı ve çeşitli tuzcul alanlardan metabolik olarak aktif mikroorganizmaları bulunduran tuz örneklerinin derilerde rastgele kullanımı dolayısıyla derilere geçen halofil mikroorganizmaların derilerde bulunan yüksek orandaki protein (%33) ve yağ (%2-5) içeriğini sindirerek derinin yapısının bozulmasına, kalitenin düşüklüğüne ve nihai olarak da ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Birbir, 1991; Berber, 2009). Bu nedenle bu mikroorganizmalar hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak önem arz etmektedir. Ham deri örnekleri hayvandan alındıktan sonra mamül deri haline getirilmeden önce depolanmaktadır. Biz de bu kapsamda depolama süresinin uzunluğunun deri kalitesi ve mikroorganizma sayısı üzerine olan etkilerini tespit etmeyi amaçladık. Bu maksatla çalışmamızda tuzlanarak 6 ay 20°C’de depolanmış koyun derisi örnekleri kullanılmıştır. Deri örneklerindeki toplam zayıf halofil bakteri sayısı 1×10^4 - 4×10^5 kob/g olarak, proteolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı 2×10^3 - 4×10^4 kob/g olarak ve lipolitik aktiviteye sahip zayıf halofil bakteri sayısı 1×10^2 - 3×10^4 kob/g olarak saptanmıştır. Bu deri örneklerinden 20 adet bakteri izole edilmiştir. Önce mikrobiyolojik ardından moleküler yöntemlerle tanımlaması yapılmıştır. Bu izolatların tuzsuz ortamda gelişemediği ve nispeten düşük tuz konsantrasyonlarında (%3-5 tuz varlığı) optimum geliştiği için zayıf halofil olarak değerlendirilmiştir. Ardından yapılan moleküler analiz sonucu bakteri izolatlarının *Bacillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. *Bacillus* cinsi bakteriler Gram-pozitif, çomak şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anerob özelliklerine sahiptir (Sansinenea ve Ortiz, 2011). İzole ettiğimiz bakterilerin tamamı Gram-pozitif özellik göstermiştir ve çomak şekillidir. Ayrıca bakteri izolatlarının tamamı proteaz aktivitesi (%100), 12 izolat lipaz aktivitesi (%60), 1 izolat üreaz aktivitesi (%5), 17 izolat DNaz aktivitesi (%85), 2 izolat pullulanaz aktivitesi (%10), 9 izolat ksilanaz aktivitesi (%45), 18 izolat selüloz aktivitesi (%90) göstermiştir. Hiçbir izolat amilaz ve β -galaktosidaz aktivitesi göstermemiştir. İzolatların yüksek hidrolitik aktivite göstermesi özellikle proteaz ve lipaz enzimleri yoluyla derilerin yapısında yüksek oranda bulunan yağ ve protein içeriğini sindirdiği için deri kalitesini etkilemektedir.

Diğer yandan ekstrem koşullar altında stabil kalan bu enzimler biyoteknolojik olarak önemlidir. Özellikle bakteriler tarafından üretilen enzimler yüksek katalitik aktivite, maliyetinin nispeten düşük olması, istenmeyen yan ürünler oluşturmaması, kolay üretilibilme gibi sebeplerle bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre avantajlıdır. Bunlar da göz önüne alınarak izole ettiğimiz bakteri suşlarının ürettiği enzimlerin biyoteknolojik olarak kullanılabilirliği daha sonra yapılacak çalışmalarda çeşitli fiziksel ve kimyasal parametreler kullanılarak araştırılabilir. Çalışmamızın devamında izole ettiğimiz *Bacillus* cinsine ait bakterilerin birbirine karşı bakteriyosin üretim yetenekleri araştırılmıştır. *Bacillus aerius* bakteri suşu diğer suşlara oranla daha fazla tür üzerinde inhibe edici etki gösterdiği için çalışmaya bu izolatla devam edilmiştir. Ardından bu bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin çevresel koşullardaki etkinliğini değerlendirmek için hücre içermeyen bakteriyosin içeren süpernatant farklı sıcaklık, pH, tuz ve enzimlerle muamele edilmiştir. Sonuç olarak bu bakteriyosinin daha sonra yapılacak çalışmalarda saflaştırılarak deri endüstrisinde kullanılan kimyasal maddelere ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmüştür. Özellikle son zamanlarda artan antibiyotik direnci sorunu ayrıca deri endüstrisinde mikroorganizma kontrolü için kullanılan kimyasal maddelerin oluşturduğu zararlı atık maddelerin hem insan sağlığı hem de çevre için olumsuz etkileri de göz önüne alınırsa bakteriyosinlerin deri endüstrisinde kimyasal maddelerin ve antibiyotiklerin yerine kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Bunlara ek olarak *Bacillus* cinsine ait bakteri suşlarının oluşturduğu endospor yapısıyla kendini koruma altına alması bu bakterilerle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu durumun önüne geçebilmek ve derileri kontamine etmesini engellemek için derilerin istiflenme yerlerinin belirli aralıklarla değiştirilerek spor yapısının aktif hale geçmesi sağlanmalı ve uygun konsantrasyonlarda bakterisidal ajanlar uygulanmalıdır. Ayrıca derilerin depolandığı yerin temizliği, derilerde sıcaklık kontrolünün yapılması, koruyucu ekipman kullanımı gibi gerekli tedbirlerin de alınması ile kaynak ve malzeme tasarrufu da sağlanabilir.

KAYNAKÇA

- [1] Adrio, J., Demain, A. (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- [2] Akpolat, C., Antonio, V., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., Caglayan, P. (2015) Molecular Identification of Moderately Halophilic Bacteria and Extremely Halophilic Archaea Isolated from Salted Sheep Skins Containing Red and Yellow Discolorations. *Journal of American Leather Chemists Association*, 110(7), 211-226.
- [3] Albarracín, W., Sánchez, I. C., Grau, R., Barat, J. M. (2011) Salt in Food Processing; Usage and Reduction: A review: Salt in Food Processing; Usage and Reduction. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1329-1336.
- [4] Ali, I., Prasongsuk, S., Akbar, A., Buzdar, M., Lotrakul, P., Punnapayak, H., Rakshit, S. (2016) Hypersaline Habitats and Halophilic Microorganisms. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 10(3), 330-345.
- [5] Al-Rubaye, M., H. J. Al-Musawi, M., Fakhari, J., Hosseini, M. (2017) Screening and Characterization of Halophilic Bacteria With Industrial Enzymes from Salt Lake Razazah, Karbala, Iraq. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 14(2), 531-539.
- [6] Aroutcheva, A., Simoes, J. A., Shott, S., Faro, S. (2001) The Inhibitory Effect of Clindamycin on *Lactobacillus* in vitro. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 9(4), 239-244.
- [7] Aslan, E. (2009) Tuzlanmış Derilerde Bulunan Mikroorganizma Türlerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye, 150-154.
- [8] Atanasova, N. S., Pietilä, M. K., Oksanen, H. M. (2013) Diverse Antimicrobial Interactions of Halophilic Archaea and Bacteria Extend Over Geographical Distances and Cross the Domain Barrier. *Microbiology Open*, 2(5), 811-825.
- [9] Avcı, S. (2003) Ekonomik Coğrafya Açısından Önemli Bir Maden: Tuz (Tarihi, Önemi ve Dünya Tuz Ekonomisi). *Coğrafya Dergisi*, 11, 21-45.
- [10] Ayaz, A. (2008) Tuz Tüketimi ve Sağlık. *Klasmat Matbacılık*, Ankara, 15-19.
- [11] Azemin, A., Klappa, P., Omar, M. S. S. (2015) Bacteriocin Isolated from *Halomonas* sp.: A Bacterial Ding Protein. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(4), 831-840.

- [12] Badaoui Najjar, M., Kashtanov, D., Chikindas, M. L. (2009) Natural Antimicrobials ϵ -Poly-l-lysine and Nisin A for Control of Oral Microflora. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1(2), 143-147.
- [13] Bailey, D. G. (1999) Gamma Radiation Preservation of Cattle Hides. A New Twist on an Old Story. Journal of the American Leather Chemists Association, 94(7), 259-266.
- [14] Bailey, D. G., Birbir, M. (1993) A Study of the Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine-Cured Cattle Hides. The Journal of the American Leather Chemists Association, 88(8), 285-293.
- [15] Bakry, M. M., Salem, S. S., Atta, H. M., El Gamal, M. S., Fouda, A. (2022) Xylanase From Thermotolerant *Bacillus haynesii* strain, Synthesis, Characterization, Optimization Using Box-Behnken Design, and Biobleaching Activity. Biomass Conversion and Biorefinery. Biomass Conversion and Biorefinery, 2190-6823.
- [16] Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S., Gan, R. R., Hung, P., Date, S. V., Marcotte, E., Hood, L., Ng, W. V. (2004) Genome Sequence of *Haloarcula marismortui*: A Halophilic Archaeon from the Dead Sea. Genome Research, 14(11), 2221-2234.
- [17] Barkia, I., Al-Haj, L., Abdul Hamid, A., Zakaria, M., Saari, N., Zadjali, F. (2019) Indigenous Marine Diatoms as Novel Sources of Bioactive Peptides with Antihypertensive and Antioxidant Properties. International Journal of Food Science & Technology, 54(5), 1514-1522.
- [18] Bediz-Ölçer, A., Gönül, N. (2008) Perkütan Absorpsiyon ve Perkütan Absorpsiyonu Etkileyen Faktörler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 33-49.
- [19] Ben Ayed, H., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., Nasri, M. (2014) Identification and Biochemical Characteristics of Lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. Process Biochemistry, 49(10), 1699-1707.
- [20] Berber, D. (2009) Tuzlarda, Tuzlanmış ve Islatılmış Ham Derilerdeki Bakteriyel Popülasyonun İncelenmesi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye, 120-124.

- [21] Berber, D. (2020) Antibacterial Activities of Lichen Derived Extracts against Different *Bacillus* Species from Soak Liquor Samples. Journal of the American Leather Chemists Association, 115(03), 96-104.
- [22] Bhattacharya, D., De Los Santos Villalobos, S., Ruiz, V. V., Selvin, J., Mukherjee, J. (2020) *Bacillus rugosus* sp. nov. Producer of a Diketopiperazine Antimicrobial, Isolated from Marine Sponge *Spongia officinalis*. L. Antonie van Leeuwenhoek, 113(11), 1675-1687.
- [23] Bierbaum, G., Sahl, H.G. (2009) Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. Current Pharmaceutical Biotechnology, 10(1), 2-18.
- [24] Bilgi, T., Yapici, B. M., Karaboz, İ. (2015) Determination of Hydrolytic Enzyme Capabilities of Halophilic Archaea Isolated from Hides and Skins and Their Phenotypic and Phylogenetic Identification. Journal of American Leather Chemists Association, 110, 33-42.
- [25] Bindiya, E. S., Tina, K. J., Sasidharan, R. S., Bhat, S. G. (2019) BaCf3: Highly Thermostable Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* BTSS3 Antagonistic on Food-Borne Pathogens. 3 Biotech, 9(4), 136.
- [26] Birbir, M. (1991) Deri Endüstrisinde Kullanılan İşlenmiş ve İşlenmemiş Sığır Derilerinde Derinin Kalitesine Etki Eden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye, 83-86.
- [27] Birbir, M. (1997) Investigation of Salt-cured France and Russian Hides for Halophilic Bacteria. Journal of Turkish Microbiology Society, 27, 68-73.
- [28] Birbir, M., Caglayan, P., Birbir, Y. (2020) The Destructive Effects of Extremely Halophilic Archaeal Strains on Sheepskins, and Proposals for Remedial Curing Processes: Use of Sterile Brine or Direct Electric Current to Prevent Red Heat Damage on Salted Sheepskins. Johnson Matthey Technology Review, 64(4), 489-503.
- [29] Birbir, M., Çicek, R., Caglayan, P., Aslan, E. (2013) An Examination of Inactivation Efficacy of NaCl and Boric Acid on Bacteria Isolated from Salted Hides. Journal of The American Leather Chemists Association, 108, 171-179.

- [30] Birbir, M., Caglayan, P. (2018) A Review on Catabolic Activity of Microorganisms in Leather Industry. In International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCOTP, 301-306.
- [31] Birbir, M., Eryılmaz, S. (2004) Prevention of Halobacterial Damage on Hide Caused by Lipolytic Halophilic Archaea with Halocins. Journal of the Society Leather Technologists Chemists, 88(3), 99-104.
- [32] Birbir, M., Ilgaz, A. (1996) Isolation and Identification of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality. Journal of Society Leather Technologists Chemists, 80, 147-153.
- [33] Birbir, M., Ogan, A., Calli, B., Mertoglu, B. (2004) Enzyme Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(6), 613-621.
- [34] Birbir, M., Sesal, C. (2003) Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Türkiye. Turk Journal of Biology, 1(27).
- [35] Biscola, V., Todorov, S. D., Capuano, V. S. C., Abriouel, H., Gálvez, A., Franco, B. D. G. M. (2013) Isolation and Characterization of a Nisin-like Bacteriocin Produced by a *Lactococcus lactis* strain Isolated from Charqui, a Brazilian fermented, Salted and Dried Meat Product. Meat Science, 93(3), 607-613.
- [36] Bitlisli, B., Yaşar, İ., Aslan, A., Çadırcı, B., Başaran, B. (2010) Physical and Antimicrobial Characteristics of *Aloe vera* Treated Split Suede Leathers. Journal-American Leather Chemists Association, 105(02).
- [37] Bozoğlu, C. (2014) Ağrı Diyadin Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik *Brevibacillus* sp. (Z1) Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum/Türkiye.
- [38] Brinda Bojamma Kotramada, B., Diana Aiyandra Nanda, K., Kohini, B., Lucky, D., Manoj Kumar Ramanayakanahalli Venkatesh, R., Ashrini Bhaktavalsala, S., Varalakshmi Kilingar, N. (2020) Purification, Characterization, and Antiproliferative Activity of L-methioninase from a New Isolate of *Bacillus haynesii* JUB2. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 10(10).

- [39] Brisbarre, N., Fardeau, M.L., Cueff, V., Cayol, J.L., Barbier, G., Cilia, V., Ravot, G., Thomas, P., Garcia, J.L., Ollivier, B. (2003) *Clostridium caminithermale* sp. nov., a Slightly Halophilic and Moderately Thermophilic Bacterium Isolated from an Atlantic Deep-sea Hydrothermal Chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1043-1049.
- [40] Bruns, A., Berthe-Corti, L. (1999) *Fundibacter jadensis* gen. nov., sp. nov., a New Slightly Halophilic Bacterium, Isolated from Intertidal Sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 441-448.
- [41] Cao, J., Liu, P., Liu, R., Su, H., Wei, Y., Fang, J. (2019) *Marinobacter profundus* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium Isolated from a Deep-sea Sediment Sample of the New Britain Trench. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(3), 425-434.
- [42] Černohlávková, J., Hofman, J., Bartoš, T., Sáňka, M., Anděl, P. (2008) Effects of Road Deicing Salts on Soil Microorganisms. *Plant, Soil and Environment*, 54(11), 479-485.
- [43] Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V. K., Joy, M. (2022) Polyketide-derived Macrobrevins from Marine Macroalga-associated *Bacillus amyloliquefaciens* as Promising Antibacterial Agents Against Pathogens Causing Nosocomial Infections. *Phytochemistry*, 193, 112983.
- [44] Chattopadhyay, M. K., Kern, R., Mistou, M.Y., Dandekar, A. M., Uratsu, S. L., Richarme, G. (2004) The Chemical Chaperone Proline Relieves the Thermosensitivity of a dnaK Deletion Mutant at 42°C. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 8149-8152.
- [45] Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D., Boudabous, A. (2008) Characterization and Partial Purification of Entomocin 110, a Newly Identified Bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Entomocidus HD110. *Microbiological Research*, 163(6), 684-692.
- [46] Chhetri, V., Prakitchaiwattana, C., Settachaimongkon, S. (2019) A Potential Protective Culture; Halophilic *Bacillus* Isolates with Bacteriocin Encoding Gene Against *Staphylococcus aureus* in Salt Added Foods. *Food Control*, 104, 292-299.
- [47] Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M., Kang, J. S. (2011) Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for Industrial Applications. *Archives of Pharmacal Research*, 34(2), 289-298.

- [48] Corral, P., Amoozegar, M., Ventosa, A. (2019) Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine Drugs*, 18(1), 33.
- [49] Coşkun, S. (2018) Türk Kültüründe Deri ve Deri Ürünlerinin Bakımı. *The Journal of Academic Social Science Studies*, 71, 277-290.
- [50] Caglayan, P. (2015) Küçükbaş Hayvan Derilerindeki Ilımlı Halofil Bakterilerin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye.
- [51] Caglayan, P. (2018) Aktif İçeriği Sodyum dimetilditiyokarbamat Olan Antimikrobiyal Maddenin Antibiyotiklere Dirençli Referans Bakteri Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının Araştırılması. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(4), 415-421.
- [52] Caglayan, P. (2021) Determination of Important Enzymes and Antimicrobial Resistances of Gram-positive Haloalkaliphilic Bacteria Isolated from Salda Lake. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(3), 375-382.
- [53] Caglayan, P., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., Antonio, V. (2017) Screening of Industrially Important Enzymes Produced by Moderately Halophilic Bacteria Isolated From Salted Sheep Skins of Diverse Origin. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 112(6), 207-216.
- [54] Caglayan, P., Sánchez, C., Ventosa, A., Birbir, M. (2015) Characterization of Moderately Halophilic Bacteria from Salt-Pack-Cured Hides. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 99(5), 250-254.
- [55] Çınar, N., Tozun, H. (2020) Kültürel Miras Bağlamında Derilerin Fiziksel Özellikleri ve Ham Derinin İşlenmesi. *Sanat Tarihi Dergisi*, 29(2), 371-397.
- [56] Daba, G. M., Elnahas, M. O., Elkhateeb, W. A. (2022) Beyond Biopreservatives, Bacteriocins Biotechnological Applications: History, Current Status, and Promising Potentials. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102248.
- [57] Daoud, L., Ben Ali, M. (2020) Halophilic microorganisms: Interesting Group of Extremophiles with Important Applications in Biotechnology and Environment. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, (5), 51-64.
- [58] Daroonpant, R., Yiamsombut, S., Sitdhipol, J., Tanasupawat, S. (2019) *Bacillus salaceticus* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium from Thai shrimp paste (Ka-pi). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(4), 1162-1168.

- [59] Das Sarma, S., Arora, P. (1997) Genetic Analysis of the Gas Vehicle Gene Cluster in *Haloarchaea*. FEMS Microbiology Letters, 153, 1-10.
- [60] De La Haba, R., Sánchez-Porro, C., Marquez, M., Ventosa, A., (2011) Taxonomy of Halophiles. Extremophiles Handbook (255-308).
- [61] De Lourdes Moreno, M., Pérez, D. García, M., Mellado, E., (2013) Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. Life, 3(1), 38-51.
- [62] Demirkol, Ş., Çifçi, İ., Çifçi, H. (2018) Kaya Tuzunun Gastronomi ve İnanç Açısından Önemi: Hacıbektaş Kaya Tuzu. 1.Uluslararası Turizmde Yeni Jenerasyonlar ve Yeni Trendler Konferansı, Sakarya, Türkiye, 298-309.
- [63] Deri ve Deri Mamulleri Sektörü Raporu (Ticaret Bakanlığı İhracat Genel Müdürlüğü). (2023) İDMİB Sektör Şubesi, 2-5.
- [64] Des Marais, D., Walter, M. (1999) Astrobiology: Exploring the Origins, Evolution, and Distribution of Life in the Universe. Annual Review of Ecology and Systematics, 30, 397-420.
- [65] Detkova, E. N., Boltianskaia, I. V. (2007) Osmoadaptation of Haloalkaliphilic Bacteria: Role of Osmoregulators and Their Possible Practical Application. Mikrobiologiya, 76(5), 581-593.
- [66] Díaz-Cárdenas, C., López, G., Patel, B. K. C., Baena, S. (2010) *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov., an Anaerobic, Slightly Halophilic Bacterium Isolated from a Saline Spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(4), 850-853.
- [67] Díaz-Cárdenas, C., Rojas, L. Y., Fiorentino, S., Cala, M. P., Díaz, J. I., Ramos, F. A., Armengaud, J., Restrepo, S., Baena, S. (2020) Bioactive Potential of Extracts of *Labrenzia aggregata* strain USBA 371, a Halophilic Bacterium Isolated from a Terrestrial Source. Molecules, 25(11), 2546.
- [68] Diba, H., Cohan, R. A., Salimian, M., Mirjani, R., Soleimani, M., Khodabakhsh, F. (2021) Isolation and Characterization of Halophilic Bacteria with the Ability of Heavy Metal Bioremediation and Nanoparticle Synthesis from Khara salt lake in Iran. Archives of Microbiology, 203(7), 3893-3903.

- [69] Duhan, J. S., Nehra, K., Gahlawat, S. K., Saharan, P., Surekha, D. (2013) Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology: Prospects and Applications*, India (127-141).
- [70] Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Perry, E. B., Connor, N., Cohan, F. M., Rooney, A. P. (2017) *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., Isolated from Desert Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2720-2725.
- [71] Durack, E., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2008) Salt: A Review of its Role in Food Science and Public Health. *Current Nutrition & Food Science*, 4(4), 290-297.
- [72] Durán-Viseras, A., Castro, D. J., Reina, J. C., Béjar, V., Martínez-Checa, F. (2021) Taxogenomic and Metabolic Insights into *Marinobacterium ramblicola* sp. nov., a New Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Rambla Salada, Murcia. *Microorganisms*, 9(8), 1654.
- [73] Dutta, B., Bandopadhyay, R. (2022) Biotechnological Potentials of Halophilic Microorganisms and Their Impact on Mankind. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 75.
- [74] Egamberdieva, D., Kucharova, Z. (2009) Selection For Root Colonising Bacteria Stimulating Wheat Growth in Saline Soils. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 563-571.
- [75] Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A. (2004) Characterization of Extremely Halophilic Archaea Isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20(7), 719-725.
- [76] Enez, B. (2019) Işığının Kök Toprağından *Bacillus atrophaeus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması: α -Amilaz'ın Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu. *European Journal of Science and Technology*, 17, 736-743.
- [77] Ergin, Z. (1988) Tuzun Üretim Teknolojisi ve İnsan Sağlığındaki Yeri. *Scientific Mining Journal*, 27(1), 9-30.
- [78] EUCAST. (2000) Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Agar Dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 509-515.
- [79] Evren, M., Albayram, C., Apan, M. (2006) Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyel Maddeler. *Türkiye 9.Gıda Kongresi*, Bolu.

- [80] Falb, M., Pfeiffer, F., Palm, P., Rodewald, K., Hickmann, V., Tittor, J., Oesterhelt, D. (2005) Living with Two Extremes: Conclusions from the Genome Sequence of *Natronomonas Pharaonis*. *Genome Research*, 15(10), 1336-1343.
- [81] Falkiewicz-Dulík, M. (2015) Leather and Leather Products. *Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization*, 133-256.
- [82] Feizi, R., Jorfi, S., Takdastan, A. (2020) Bioremediation of Phenanthrene-polluted Soil Using *Bacillus kochii* AHV-KH14 as a Halo-tolerant strain Isolated from Compost. *Environmental Health Engineering and Management*, 7(1), 23-30.
- [83] Gaidau, C., Stanculescu, I. R., Stanca, M., Cutrubinis, M., Trandafir, L., Alexandru, M., Alexe, C.A. (2021) Gamma Irradiation a Green Alternative for Hides and Leather Conservation. *Radiation Physics and Chemistry*, 182(7), 109369.
- [84] Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., Ventosa, A. (2010) Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6971-6981.
- [85] Ganesan, M., Mathivani Vinayakamoorthy, R., Thankappan, S., Muniraj, I., Uthandi, S. (2020) Thermotolerant Glycosyl Hydrolases-producing *Bacillus aerius* CMCP51 and its Saccharification Efficiency on HCR-laccase (LccH)-pretreated Corncob Biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 124.
- [86] García, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2005) Catabolic Versatility of Aromatic Compound-degrading Halophilic Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(1), 97-109.
- [87] Garg, R., Khalid, M. A., Singh, Y. P. (2019) Review on Tanning of Hides and Skins- Low Salt Option in Hide Preservation, 6(2).
- [88] Gonzales C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978) *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an Amylolytic and Carbohydrate-Metabolizing, Extremely Halophilic Bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 710-715.
- [89] Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., Cotter, P. D. (2015) The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, (6), 1418.
- [90] Gorospe, C. M., Han, S.H., Kim, S.G., Park, J.Y., Kang, C.H., Jeong, J.H., So, J.S. (2013) Effects of Different Calcium Salts on Calcium Carbonate Crystal Formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(5), 903-908.

- [91] Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., Lucas, R. (2014) The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12),
- [92] Guiga, W., Swesi, Y., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., Sebti, I. (2010) Innovative Multilayer Antimicrobial films made with Nisaplin or Nisin and Cellulosic Ethers: Physico-chemical Characterization, Bioactivity and Nisin Desorption Kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 352-360.
- [93] Gupta, S., Sharma, P., Dev, K., Sourirajan, A. (2016) Halophilic Bacteria of Lunsu Produce an Array of Industrially Important Enzymes with Salt Tolerant Activity. *Biochemistry Research International*, 2016(1), 1-10.
- [94] Gut, I. M., Blanke, S. R., Van der Donk, W. A. (2011) Mechanism of Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth by the Lantibiotic Nisin. *ACS Chemical Biology*, 6(7), 744-752.
- [95] Habib, A. (2015) Effect of some Skin Defects on Physical Properties of the Leather. *Journal of Applied and Industrial Sciences*, 3(3), 112-119.
- [96] Harley, J. P., Prescott, L. M. (2002). *Mikrobiyolojide Laboratuvar Egzersizleri*, 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York.
- [97] Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., de Kruijff, B., Breukink, E. (2006) An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637.
- [98] Henciya, S., Vengateshwaran, T. D., Gokul, M. S., Dahms, H.U., James, R. A. (2020) Antibacterial Activity of Halophilic Bacteria Against Drug-Resistant Microbes Associated with Diabetic Foot Infections. *Current Microbiology*, 77(11), 3711-3723.
- [99] Hien, N. (2006) A Rapid Quantitative Assay for Bacterial Protease Activity, Master Thesis, The Graduate Faculty of Texas Tech University.
- [100] Hong, S. W., Kim, J.H., Cha, H. A., Chung, K. S., Bae, H. J., Park, W. S., Ham, J.S., Park, B. Y., Oh, M. H. (2022) Identification and Characterization of a Bacteriocin from the Newly Isolated *Bacillus subtilis* HD15 with Inhibitory Effects Against *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1462-1470.

- [101] Horikoshi, K., Antranikian, G. (2011) *Extremophiles Handbook*, Japan, Vol (1), 255-308.
- [102] Hu, C.B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2010) Enterocin X, a Novel Two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from Those of its Component Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4542-4545.
- [103] Hussain, S. A., Sarker, M. I., Yosief, H. O. (2021) Synergistic Efficacy of Alkyltrimethylammonium bromide, Chlorhexidine digluconate on Diverse Bacterial Strains Causing Red-heat and Purple-stain Deteriorations of Leather. *Archives of Microbiology*, 203(2), 629-634.
- [104] Hussein, H. A., Abdullah, M. A. (2020) Anticancer Compounds Derived from Marine Diatoms. *Marine Drugs*, 18(7), 356.
- [105] Imhoff, J. F. (1986) Survival Strategies of Microorganisms in Extreme Saline Environments. *Advances in Space Research: The Official Journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, 6(12), 299-306.
- [106] Jiang, J., Pan, Y., Meng, L., Hu, S., Zhang, X., Hu, B., Meng, J., Li, C., Huang, H., Wang, K., Su, T. (2013) *Halomonas zhaodongensis* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Saline-alkaline Soils in Zhaodong, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(5), 685-694.
- [107] Joo, W.A., Kim, C.W. (2005) Proteomics of Halophilic Archaea. *Journal of Chromatography B*, 815(1), 237-250.
- [108] Kanagaraj, J., Sastry, T., Rose, C. (2005) Effective Preservation of Raw Goat Skins for the Reduction of Total Dissolved Solids. *Journal of Cleaner Production*, 13(9), 959-964.
- [109] Kang, H., Kim, J.H., Jeon, C. O., Yoon, J.H., Kim, W. (2015) *Roseovarius aquimarinus* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4514-4520.
- [110] Karaoğlu, S. S., Sevim, A., Sevim, E. (2014) Production and characterization of Bacteriocin-like Peptide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B10. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi Enstitüsü*, 30(5), 338-345.
- [111] Karthikeyan, P., Bhat, S. G., Chandrasekaran, M. (2013) Halocin SH10 Production by an Extreme Haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 Isolated from Salt Pans of South India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(2), 205-212.

- [112] Kaur, B., Balgir, P. P., Mittu, B., Kumar, B., Garg, N. (2013) Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. BioMed Research International, 2013, 1-8.
- [113] Kaya Şen, S., Katı, H. (2023) Biochemical Characterization and Partial Purification of a Bacteriocin Like-Inhibitory Substance Produced from *Bacillus* sp. T68 strain. Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology A-Applied Sciences and Engineering, 24(1), 1-13.
- [114] Kim, M.S., Roh, S. W., Bae, J.W. (2010) *Cobetia crustatorum* sp. nov., a Novel Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Traditional Fermented Seafood in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(3), 620-626.
- [115] Kindoli, S., Lee, H. A., Heo, K., Kim, J. H. (2012) Properties of a Bacteriocin from *Bacillus subtilis* H27 Isolated from Cheonggukjang. Food Science and Biotechnology, 21(6), 1745-1751.
- [116] Kolp, S., Pietsch, M., Galinski, E., Gütschow, M. (2006) Compatible Solutes as Protectants for Zymogens Against Proteolysis. Biochimica et Biophysica Acta, 1764(7), 1234-1242.
- [117] Kumar, V., Tiwari, S. K. (2017) Halocin HA1: An Archaeocin Produced by the Haloarchaeon *Haloferax larsenii* HA1. Process Biochemistry, 61, 202-208.
- [118] Kumar, V., Tiwari, S. K. (2019) Halocin Diversity Among Halophilic Archaea and Their Applications. Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications, Singapore, Chapter: (16), 497-532.
- [119] Kushner, D. J. (1978) Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria, in Microbial Life in Extreme Environment. Academic Press, London, 317-368.
- [120] Kushner, D. J., Kamekura, M. (1988) Physiology of Halophilic Eubacteria. CRC Press: Boca Raton, Volume 1, 109-138.
- [121] Lequerica, J., O'Connor, J.E., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreblanca, M., Moya, A., Colom Valiente, M., Soria, B. (2007) A halocin Acting on Na⁺/H⁺ Exchanger of *Haloarchaea* as a New type of Inhibitor in NHE of Mammals. Journal of Physiology and Biochemistry, 62(4), 253-262.
- [122] Leuko, S., Rettberg, P., Pontifex, A. L., Burns, B. P. (2014) On the Response of Halophilic Archaea to Space Conditions. Life, 4(1), Article 1.

- [123] Li, M., Yoneyama, F., Toshimitsu, N., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2013) Lethal Hydroxyl Radical Accumulation by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3897-3902.
- [124] Liang, X., Lin, H., Wang, K., Liao, Y., Lai, Q., Xu, Y., Wang, C. (2017) *Altererythrobacter salegens* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Surface Sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 909-913.
- [125] Lim, K. B., Balolong, M. P., Kim, S. H., Oh, J. K., Lee, J. Y., Kang, D.K. (2016) Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *BioMed Research International*, 2016, 1-7.
- [126] Liu, Y.J., Long, L.J., Huang, X.F., You, Z.Q., Wang, F.Z., Li, J., Kim, C.J., Tian, X.P., Zhang, S. (2013) *Bacillus oceani* sp. nov., a New Slightly Halophilic Bacterium, Isolated from a Deep Sea Sediment Environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(5), 829-836.
- [127] Logan, N. A., Vos, P. D. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-163.
- [128] Manikandan, P., Moopantakath, J., Imchen, M., Kumavath, R., SenthilKumar, P. K. (2021) Identification of Multi-Potent Protein Subtilisin a from Halophilic Bacterium *Bacillus firmus* VE2. *Microbial Pathogenesis*, 157, 105007.
- [129] Margesin, R., Schinner, F. (2001) Biodegradation and Bioremediation of Hydrocarbons in Extreme Environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 650-663.
- [130] Martinez, B., Rodrı Guez, A., Suárez, J. E. (2000) Lactococcin 972, a Bacteriocin that Inhibits Septum Formation in Lactococci. *Microbiology (Reading, England)*, 146(4), 949-955.
- [131] Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., De, M. (2002) Purification and Partial Characterization of Bacillocin 490, a Novel Bacteriocin Produced by a Thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 1(1), 1.
- [132] Matsuzaki, K. (1999) Why and How are Peptide–lipid Interactions Utilized for Self-Defense. *Magainins and Tachyplesins as Archetypes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1-2), 1-10.

- [133] McClure, P. (2005) *Escherichia coli*: Virulence, Stress Response and Resistance. Understanding Pathogen Behavior, 240-278.
- [134] Mescher, A. (2009) Junqueira's Basic Histology, McGraw-Hill, 16th Edition.
- [135] Migliore, L., Perini, N., Mercuri, F., Orlanducci, S., Rubechini, A., Thaller, M. (2019) Three Ancient Documents Solve the Jigsaw of the Parchment Purple Spot Deterioration and Validate the Microbial Succession Model. Scientific Reports, 9(1), 1623.
- [136] Mokashe, N., Chaudhari, B., Patil, U. (2018) Operative Utility of Salt-stable Proteases of Halophilic and Halotolerant Bacteria in the Biotechnology Sector. International Journal of Biological Macromolecules, 117, 493-522.
- [137] Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., ve Nero, L. A. (2010) Protocols for the Isolation and Detection of Lactic Acid Bacteria with Bacteriocinogenic Potential. LWT-Food Science and Technology, 43(9), 1320-1324.
- [138] Motta, A. S., Brandelli, A. (2003) Influence of Growth Conditions on Bacteriocin Production by *Brevibacterium linens*. Applied Microbiology and Biotechnology, 62(2-3), 163-167.
- [139] Negash, A. W., Tsehai, B. A. (2020) Current Applications of Bacteriocin. International Journal of Microbiology Volume 2020, 1-7.
- [140] Nisa, M., Dar, R. A., Fomda, B. A., Nazir, R. (2023) Combating Food Spoilage and Pathogenic Microbes via Bacteriocins: A Natural and Eco-friendly Substitute to Antibiotics. Food Control, 149(5), 109710.
- [141] Nur-A-Tomal, Md. S., Hashem, Md. A., Zahin, Md. E. H., Pulok, Md. L. H., Das, M. R., Mim, S. (2021) Goatskin Preservation with Plant oil: Significant Chloride Reduction in Tannery Wastewater. Environmental Science and Pollution Research, 28(10), 12889-12897.
- [142] Oren, A. (2006) Life at High Salt Concentrations. The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, New York (263-282).
- [143] Oren, A. (2008) Microbial Life at High Salt Concentrations: Phylogenetic and Metabolic Diversity. Saline Systems, 4(1), 2.
- [144] Oren, A. (2010) Industrial and Environmental Applications of Halophilic Microorganisms. Environmental Technology, 31(8-9), 825-834.

- [145] Orhan, F. (2016) Alleviation of Salt Stress by Halotolerant and Halophilic Plant Growth-Promoting Bacteria in Wheat (*Triticum aestivum*). Brazilian Journal of Microbiology, 47(3), 621-627.
- [146] Orlita, A. (2004) Microbial Biodeterioration of Leather and its Control: A Review. International Biodeterioration & Biodegradation, 53(3), 157-163.
- [147] Özgök, Ö., İlhan, S. (2020) Diversity and Distribution of Dematiaceous Fungi in Çamaltı Saltern in İzmir Province, Turkey. 11(1), 29-39.
- [148] Öztürk, N. (2019) Tuzlanmış Küçükbaş Hayvan Derilerinden İzole Edilen Ilımlı Halofil Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul /Türkiye, 29-30.
- [149] Özyaral, O., Birbir, M. (2005) Examination of the Fungal Community on Salt Used in Turkish Leather Industry. Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, 89(6), 237-241.
- [150] Park, J. S., Simpson, A. G. B., Lee, W. J., Cho, B. C. (2007) Ultrastructure and Phylogenetic Placement within Heterolobosea of the Previously Unclassified, Extremely Halophilic Heterotrophic Flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). Protist, 158(3), 397-413.
- [151] Polkade, A. V. (2007) Molecular and Phylogenetic Studies on Microbial Diversity of Raw Buffalo Hide to be Used in Leather Manufacturing, Doctorate Thesis, University of Pune, Faculty of Science, India, Pune, 104.
- [152] Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J. K., Zillig, W. (2000) Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus *Sulfolobus*. Journal of Bacteriology, 182(10), 2985-2988.
- [153] Price, L. B., Shand, R. F. (2000) Halocin S8: A 36-Amino-Acid Microhalocin from the *Haloarchaeal* strain S8a. Journal of Bacteriology, 182(17), 4951-4958.
- [154] Prihanto, A. A., Nurdiani, R., Muyasharoh, H., Afifah, J. (2020) Identification of Protease-Producing Halophilic Bacteria Isolated from Salt-Pond Soil. Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan, 12(1), 181-187.

- [155] Rajaofera, M. J. N., Wang, Y., Dahar, G. Y., Jin, P., Fan, L., Xu, L., Liu, W., Miao, W. (2019) Volatile Organic Compounds of *Bacillus atrophaeus* HAB-5 Inhibit the Growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 170-176.
- [156] Rajesh, D., Karthikeyan, S., Jayaraman, G. (2012) Isolation and Partial Characterization of A New Bacteriocin from *Bacillus pumilus* Dr2 Isolated from Sea Water. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1(2-3), 33-41.
- [157] Ramezani, M., Nikou, M. M., Pourmohyadini, M., Spröer, C., Schumann, P., Harirchi, S., Aryaefar, M., Fazeli, S. A. S., Amoozegar, M. A., Ventosa, A. (2019) *Planomicrobium iranicum* sp. nov., a Novel Slightly Halophilic Bacterium Isolated from a Hypersaline Wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(5), 1433-1437.
- [158] Rekik, H., Zraï Jaouadi, N., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S., Jaouadi, B. (2019) Production, Purification and Biochemical Characterization of a Novel Detergent-stable Serine Alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1227-1239.
- [159] Reyes-Cortes, J. L., Azaola-Espinosa, A., Lozano-Aguirre, L., Ponce-Alquicira, E. (2021) Physiological and Genomic Analysis of *Bacillus pumilus* UAMX Isolated from the Gastrointestinal Tract of Overweight Individuals. *Microorganisms*, 9(5), 1076.
- [160] Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002) Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 117-137.
- [161] Roberts, M. F. (2005) Organic Compatible Solutes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms. *Saline Systems*, (1), 5.
- [162] Rogers, L. A., Whittier, E. O. (1928) Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16(4), 211-229.
- [163] Romero-Severson, J., Moran, T. E., Shrader, D. G., Fields, F. R., Pandey-Joshi, S., Thomas, C. L., Palmer, E. C., Shrout, J. D., Pfrender, M. E., Lee, S. W. (2021) A Seed-Endophytic *Bacillus safensis* Strain With Antimicrobial Activity Has Genes for Novel Bacteriocin-Like Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology*, 12, 734216.
- [164] Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. (2001) Life in Extreme Environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.

- [165] Saggese, A., Culurciello, R., Casillo, A., Corsaro, M., Ricca, E., Baccigalupi, L. (2018) A Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*, 16(6), 180.
- [166] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, 239, 487-491.
- [167] Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor.
- [168] Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A. (2003) Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300.
- [169] Sansinenea, E., Ortiz, A. (2011) Secondary Metabolites of Soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523-1538.
- [170] Santos, L., Mariliz, G., Aquim, P., Priebe, G. (2016) Influence of Fats During Leathermaking. *Departamento de Engenharia Química-Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 1-6.
- [171] Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S. (2005) Extremophilic Microbes: Diversity and Perspectives. *Microbial Diversity*, 89(1).
- [172] Saun, N. K., Mehta, P., Gupta, R. (2014) Purification and Physicochemical Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus aerius*. *Journal of Oleo Science*, 63(12), 1261-1268.
- [173] Seiler, H., Schmidt, V., Wenning, M., Scherer, S. (2012) *Bacillus kochii* sp. nov., Isolated from Foods and a Pharmaceuticals Manufacturing Site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1092-1097.
- [174] Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R. (2015) *Bacillus atrophaeus*: Main Characteristics and Biotechnological Applications—a Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 533-545.
- [175] Sharma, M., Akhter, Y., Chatterjee, S. (2019) A Review on Remediation of Cyanide Containing Industrial Wastes Using Biological Systems with Special Reference to Enzymatic Degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 70.

- [176] Shivanand, P., Mugeraya, G. (2011) Halophilic Bacteria and Their Compatible Solutes Osmoregulation and Potential Applications. *Current Science*, 100(10), 25.
- [177] Sutherland, J. P., Aherne, A., Beaumont, A. L. (1996) Preparation and Validation of a Growth Model for *Bacillus cereus*: The Effects of Temperature, pH, Sodium chloride and Carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 30(3), 359-372.
- [178] Toksoz, O., Turkmenoglu, I., Berber, D., Caglayan, P., Birbir, M., Sesal, N. C. (2023) Evaluation of Antibacterial Potencies of Eight Lichen Extracts Against Gram-Positive Moderately Halophilic Bacteria: Ecological Materials to Control Moderately Halophilic Bacteria for Leather Preservation. *Johnson Matthey Technology Review*, 67(1), 85-96.
- [179] Topçal, F., Dıǧrak, M., Gündoǧan, R. (2014) Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretimlerinin Belirlenmesi. *Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 57-67.
- [180] Toptaş, A. (1993) *Deri Teknolojisi*. Sade Ofset Matbaacılık, İstanbul/Türkiye.
- [181] Toptaş, A. (1998) *Deride Kalite Tespiti*. Sade Ofset ve Matbaacılık, İstanbul/Türkiye, 13-23.
- [182] Tran, T. D., Del Cid, C., Hnasko, R., Gorski, L., McGarvey, J. A. (2020) *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65 Inhibits the Growth of *Listeria monocytogenes* on Cantaloupe Melons. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1).
- [183] Ventosa, A. (2006) Unusual Micro-organisms from Unusual Habitats: Hypersaline Environments. *Prokaryotic Diversity*, Cambridge University Press, (1), 223-254.
- [184] Ventosa, A. García, M. T., Kamekura, M., Onishi, H., Ruíz- Berraquero, F. (1989) *Bacillus halophilus* sp. nov., a Moderately Halophilic *Bacillus* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 12, 162-166.
- [185] Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995) Biotechnological Applications and Potentialities of Halophilic Microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(1), 85-94.
- [186] Verma, A. K., Banerjee, R., Dwivedi, H. P., Juneja, V. K. (2014) Bacteriocins: Potential in Food Preservation. *Encyclopedia of Food Microbiology* (180-186).

- [187] Veyselova, C., Birbir, M., Berber, D. (2013) Minimal Bactericidal Concentration for a Quaternary Ammonium Compound used in Soak Liquors. Journal-Society of Leather Technologists and Chemists, 97(4).
- [188] Vıbhakara, H., Gupta, D., Jayamaran, K., Mohan, M. (2006) Development of a High-Moisture Shelf-stable Grated Carrot Product Using Hurdle Technology. Journal of Food Processing and Preservation, 30, 134-144.
- [189] Woese, C.R, Kandler, Wheelis, M. (1990) Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of the National of Sciences, 87(12), 4576-4579.
- [190] Woods, D. R., Welton, R. L., Thomson, J. A., Cooper, D. R. (1972) Collagenolytic Activity of Cured Hide Bacteria. The Journal of Applied Bacteriology, 35(1), 123-128.
- [191] Xie, J., Zhang, R., Shang, C., Guo, Y. (2009) Isolation and Characterization of a Bacteriocin Produced by an Isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that Exhibits Antimicrobial Activity Against Domestic Animal Pathogens. African Journal of Biotechnology, 8(20).
- [192] Yang, W., Wang, X., Gong, Y., Li, H., Chen, W., Gaidau, C. (2012) Preparation of Antibacterial Sheepskin with Silver Nanoparticles: Potential for Use as a Mattress for Pressure Ulcer Prevention, 107(3), 85-91.
- [193] Yılmaz, E. (2019) Derilerin Korunmasında Kullanılan Tuzlardaki Tuza Toleranslı Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu, Biyokimyasal Özellikleri, Antibiyotiklere Karşı Hassasiyetleri ve İnaktivasyonu, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye.
- [194] Yılmaz, E., Birbir, M. (2019) Characterization of Halotolerant *Bacillus* species Isolated From Salt Samples Collected From Leather Factories in Turkey. Journal of the American Leather Chemists Association, 114, 118-130.
- [195] Yılmaz, P. (2010) Tuzlanmış Derilerden Ilımlı ve Aşırı Halofil Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye.
- [196] Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., Chen, G.Q. (2015) Halophiles, Coming Stars for Industrial Biotechnology. Biotechnology Advances, 33(7), 1433-1442.

- [197] Yoon, J. H., Kim, H., Kim, I. G., Kang, K. H., Park, Y.H. (2003) *Erythrobacter flavus* sp. nov., a Slight Halophile from the East Sea in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(4), 1169-1174.
- [198] Yoon, J.H., Yeo, S.H., Oh, T.K., Park, Y.H. (2004) *Alteromonas litorea* sp. nov., a Slightly Halophilic Bacterium Isolated from an Intertidal Sediment of the Yellow Sea in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4), 1197-1201.
- [199] Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. APCBEE Procedia, 2, 50-56.
- [200] Zafar, M., Alam, S., Sabir, M., Saba, N., Din, A. U., Ahmad, R., Khan, M. R., Muhammad, A., Dayisoğlu, K. S. (2022) Isolation, Characterization, Bacteriocin Production and Biological Potential of *Bifidobacteria* of Ruminants. Analytical Biochemistry, 658,114926.
- [201] Zalma, S., El Sharoud, W. (2021) Diverse thermophilic *Bacillus* species with Multiple Biotechnological Activities are Associated within the Egyptian Soil and Compost Samples. Science Progress, 104(4).
- [202] Zoumpopoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P., Tarantilis, P., Polissiou, M., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (2013) Incidence of Bacteriocins Produced by Food-Related Lactic Acid Bacteria Active Towards Oral Pathogens. International Journal of Molecular Sciences, 14(3), 4640-4654.

EKLER

Deri Örneklerinden İzole Ettiğimiz İzolatlara Ait 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları

Ek 1. KD1a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.53

GGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAG
GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAA
GAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCG
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAG
GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGA
AGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG
CAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAC
ACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 2. KD1b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus rugosus*

Baz Uzunluğu: 1548

Benzerlik Oranı: %99.25

TTAGCTAGTTGTGAGGTAATGGTTCACCAAGGCAACGATGGGTAGCCGACCTGAG
AGGGGATCGGCCCCACTGGGACTGAGACCCGGCCCAGATTCCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCCTGAG
TGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTT
CGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG
GGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA

CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTT
CCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTTT

Ek 3. KD2a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açından Benzediği Türün Adı: *Bacillus safensis*

Baz Uzunluğu: 1474

Benzerlik Oranı: %99.63

GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACT
GCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAAGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
TCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAAGAGAGAGTGGAAATCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCC
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAG
AGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAA
ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 4. KD2b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.54

TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCG
GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
CGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG
TGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGA
TAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT
GCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 5. KD3a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.32

GCAATGGACGAAAGTTTCGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGA
TCGTAAATTTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCGGGCGG
TTTCTTAAGTGTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGGCGC
AGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCCTTCCCAGGTCTTGACATCCTGTGACAACCCTAGAGATAGGGC
TTCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTCATTTTAGTTGCCAGC

ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
GCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTC
TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGA

Ek 6. KD3b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.18

GGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAGTTTGACGGAGCAACGCCGCCT
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCG
TTCGAATAGGGCGGTACCTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAATTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCGCGCCGGCGGTTTCTTAAGTTTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGA
CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT
CCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCT
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGG

Ek 7. KD4a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus safensis*

Baz Uzunluğu: 1474

Benzerlik Oranı: %99.90

TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG

TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGG
GACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
GCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG
TTTGCAACACCCGAAGTCGGGA

Ek 8. KD4b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açidan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.50

GGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCTTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTTTA
AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGC
GAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTC
TGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGGAATCGCTGGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT
AACACCCGAAGTCGGTGAGG

Ek 9. KD5a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus mojavensis*

Baz Uzunluğu: 1407

Benzerlik Oranı: %99.69

GAATAGGGCGGTACCTGGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCAGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG
GAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
CGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAA
TCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
ATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATC
CCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTTTT
T

Ek 10. KD5b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.17

TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCCGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGT
TTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTA
CTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
CTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTCTCCGCCCTTT
AGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACGAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGA
GATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAG
TTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA

GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAA
ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGG

Ek 11. KD6a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus atrophaeus*

Baz Uzunluğu: 1475

Benzerlik Oranı: %99.56

CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGATTCCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAG
GCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGG
GCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
GCATTACGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACAGAACAAAGGGCAGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGT
TCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 12. KD6b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus amyloliquefaciens*

Baz Uzunluğu: 1468

Benzerlik Oranı: %99.47

GGCCACACTGGGAATGAGACACGGCCCAGATTCCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAG
GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGG
GCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCT

CGCCGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG
TCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA
GATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG
TTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA
TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 13. KD7b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus aerius*

Baz Uzunluğu: 1466

Benzerlik Oranı: %99.46

TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTTTGACGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTCTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCG
CAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCC
GAAGTCGGTGAGGT

Ek 14. KD8a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus safensis*

Baz Uzunluğu: 1474

Benzerlik Oranı: %99.90

CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGG
GACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
GCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
TTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 15. KD8b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus pumilus*

Baz Uzunluğu: 1434

Benzerlik Oranı: %99.48

CGACCTGAGAGGTGATTGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGATTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG

CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTT
TAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGG
TGAGGT

Ek 16. KD9a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus kochii*

Baz Uzunluğu: 1511

Benzerlik Oranı: %99.37

TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCTTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGAAGAA
CAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAAA
GTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACTTTCCCTTTCGGGGGACAGAGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCG
AGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
CCTACATGAAGCCGGAATCGCTGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAA
GTCGGTGGgg

Ek 17. KD10a İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.29

GGGACTGAGACACGGCCCAGATCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCCGACGAGCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGA
CGGTACCTAACCAGAAAGCCAGGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGG
GGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGC
AAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTC
CCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCA
GAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Ek 18. KD10b İzolatına Ait 16S rRNA Dizi Analizi Sonucu

Filogenetik Açıdan Benzediği Türün Adı: *Bacillus haynesii*

Baz Uzunluğu: 1508

Benzerlik Oranı: %99.74

GATTGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGATTCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAAT
AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGG
GTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC
CTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCT
AGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCT
TAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCAC
AAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. 2021-Devam etmekte.

Lisans, Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstanbul, Türkiye 2015-2019.

Yabancı Dil

İngilizce, B2

Sertifika, Kurs ve Eğitimler

Pedagojik Formasyon Belgesi, Marmara Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Fakültesi, 2019.

Tez Bilgileri

Yüksek Lisans, ‘‘Tuzlanmış Derilerden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilerek Tanımlanması ve Biyoteknolojik Önemlerinin Araştırılması’’, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Tezli (Devam ediyor).

Aldığı Burslar

TÜBİTAK 2210 Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Bursu.

Katıldığı Projeler

Dilek Yalçın (Araştırmacı), Doç. Dr. Didem Berber (Araştırmacı), Doç. Dr. Pınar Çağlayan (Yönetici), Tuzlanmış Derilerden Zayıf Halofil Bakterilerin İzole Edilerek Tanımlanması ve Biyoteknolojik Önemlerinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO), Tez Projesi, FYL-2023-11011, 13.07.2023-15.07.2024 (Devam ediyor).

Ödüller

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Lisans Bölüm Birinciliği, 2019.