

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

**HAM DERİLERDEN İZOLE EDİLEN**  
**HALOFİLİK ARKELERİN HİDROLİTİK ENZİM**  
**KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, FENOTİPİK**  
**VE FİLOGENETİK OLARAK TANIMLANMASI**

**Sadi Turgut BİLGİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

Tezin Sunulduğu Tarih: 05. 07. 2012

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI**

**ÇANAKKALE**

## DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SADİ TURGUT BİLGİ tarafından DOÇ. DR. BİNNUR MERİÇLİ YAPICI yönetiminde hazırlanan “HAM DERİLERDEN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK ARKELERİN HİDROLİTİK ENZİM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, FENOTİPİK VE FİLOGENETİK OLARAK TANIMLANMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI

Danışman

Doç. Dr. İhsan YAŞA

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nilgün AYMAN ÖZ

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 05 / 07 / 2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu doktora tezi **BAP** tarafından **2010/23** nolu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

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

Sadi Turgut BİLGİ

## TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı sunan ve araŐtırmalarımın baŐlangıcından bitimine kadar, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI'ya ve değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren 2. tez danışmanım, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ'a teŐekkürü bir borç bilirim.

ÇalıŐmam süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. A. Nail YAPICI'ya, Ege Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya, İstanbul Teknik Üniversitesi ArŐ. Görevlisi Dr. Mustafa KOLUKIRIK'a, laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yardım ve dayanıŐmalarından dolayı Derya DOĞANAY ve Gözde TURHAN'a, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve vermiŐ oldukları eğitimle bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Sadi Turgut BİLGİ

## SİMGELER VE KISALTMALAR

A	:	Absorbans
V	:	Volt
mA	:	Miliamper
ng	:	Nanogram
$\mu$ g	:	Mikrogram
mg	:	Miligram
g	:	Gram
$\mu$ l	:	Mikrolitre
l	:	Litre
nm	:	Nanometre
mm	:	Milimetre
$\mu$ M	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
M	:	Molar (Molarite)
%	:	Yüzde oranı
xg	:	Yerçekimi kuvvetinin katı
rpm	:	Dakikadaki dönüş sayısı
U.V	:	Ultra Viyole
SW	:	Tuzlu Su
kob	:	Koloni oluşturan birim
U	:	Unit (Birim)
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik asit
S	:	Swedberg sedimentasyon katsayısı
dNTP	:	Deoksi Nükleotit Trifosfat
bp	:	Baz çifti
MgCl <sub>2</sub>	:	Magnezyum Klorür
MgSO <sub>4</sub>	:	Magnezyum Sülfat
CaCl <sub>2</sub>	:	Kalsiyum Klorür
KCl	:	Potasyum Klorür
NaHCO <sub>3</sub>	:	Sodyum Bikarbonat
NaBr	:	Sodyum Bromür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	:	Sodyum Karbonat
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	Sodyum Sülfat

### SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

Na <sub>2</sub> S	:	Sodyum Sülfür
NaHS	:	Sodyum Hidrosülfür
HgCl	:	Civa Klorür
ZnCl <sub>2</sub>	:	Çinko Klorür
KNO <sub>3</sub>	:	Potasyum Nitrat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen Peroksit
TCA	:	Trikloro Asetik Asit
pNPL	:	para-Nitrofenil Laurate
pNPB	:	para-Nitrofenil Bütirat
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TAE	:	Tris Asetik Asit Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
PC	:	Fosfatidilkolin
PE	:	Fosfatidiletanolamin
CL	:	Kardiolipin
PG	:	Fosfatidil Gliserol
Me-PGP	:	Metil Ester Fosfatidil Gliserofosfat Dieter
PGS	:	Fosfatidil Gliserosülfat
PHA	:	Poli-3-hidroksialkonat

## ÖZET

### HAM DERİLERDEN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK ARKELERİN HİDROLİTİK ENZİM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, FENOTİPİK VE FİLOGENETİK OLARAK TANIMLANMASI

Sadi Turgut BİLGİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI

05 / 07 / 2012, 112

Bu araştırmada tuzla konservelenmiş ham deri örneklerinden aşırı halofilik arkelerin izolasyonu, hidrolitik enzim kapasitelerinin belirlenmesi, fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Çalışma materyali olarak 8 farklı kaynaktan temin edilen yerli ve yabancı tuzlanmış ham deri örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden 186 adet aşırı halofilik mikroorganizma izole edilmiştir. Bu izolatlar bazı biyokimyasal, antibiyotik duyarlılık, pH, NaCl, sıcaklık toleransları ile nitel ve nicel hidrolitik enzim testleri uygulanmıştır.

İzolatların %100'ü basitrasin ve novobiosin antibiyotiklerine karşı duyarlı bulunmuştur. Nitel enzim aktivitesi sonuçlarına göre 23 izolatın (% 12) kazeinaz, 106 izolatın (% 57) jelatinaz, 21 izolatın (% 11) amilaz, 65 izolatın (% 35) esteraz, 33 izolatın (% 18) lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Nitel enzim aktivitesi gösteren bazı izolatların kazeinaz, keratinaz, kollajenaz, esteraz ve lipaz enzim aktiviteleri nicel olarak ölçülmüştür. Bu izolatlardan 150 numaralı izolatın 9.2 U/ml kazeinaz, 0.6 U/ml keratinaz ve 1.7 U/ml kollajenaz, 140 numaralı izolatın 51 U/ml esteraz, 505 numaralı izolatın 33.8 U/ml lipaz aktivite değerleri ile diğer izolatlardan daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda fenotipik araştırma bulguları dikkate alınarak 186 izolattan 34 izolat seçilmiş ve 16S rRNA dizi analizi ile tanımlamaları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 10 izolat *Natrialba aegyptia* 40, 5 izolat *Halococcus thailandensis*, 4 izolat *Natrinema pallidum* R-fish, 2 izolat *Halococcus dombrowskii* H4, 2 izolat *Halovivax asiaticus*, ve 1'er

izolat *Halovivax* sp. E107, *Halococcus morrhua*, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1 olmak üzere toplam 34 aşırı halofilik arke tanımlanmıştır. Araştırmamızda 8 deri örneğinden 6'sında *Natrialba aegyptia* 40 türünün tespit edilmesi bu türün deri örneklerinde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak araştırmamızda 34 izolattan 16 farklı aşırı halofilik arke straini tanımlanmıştır. Bunlardan iki strain daha önceki çalışmalarda tuzlanmış ham derilerden elde edilmiş olup geriye kalan 14 strain çalışmamızda tuzlanmış ham derilerde ilk kez tanımlanmıştır. Araştırma sonuçlarının bundan sonra yapılacak çalışmalara ve deri endüstrisinin mikrobiyal problemlerinin çözümlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Tuzlanmış Ham Deri, Aşırı Halofilik Arke, Proteaz, Keratinaz, Kollajenaz, Lipaz, Esteraz, 16S rRNA dizi analizi.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF HYDROLYTIC CAPABILITIES OF HALOPHILIC ARCHAEA ISOLATED FROM HIDES AND SKINS AND THEIR PHENOTYPIC AND PHYLOGENETIC IDENTIFICATION

Sadi Turgut BİLGİ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair for Biology Thesis of Doctor of Philosophy

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Binnur MERİÇLİ YAPICI

05 / 07 / 2012, 112

In this research, we aimed to isolate extremely halophilic archaea from salted hides and skins, to determine the capacities of their hydrolytic enzymes, and to identify them by using phenotypic and molecular methods.

Domestic and imported salted hide samples obtained from eight different sources were used as the research material. 186 extremely halophilic microorganisms were isolated from salted raw hides. Some biochemical, antibiotic sensitivity, pH, NaCl, temperature tolerance and quantitative and qualitative hydrolytic enzyme tests were performed on these isolates.

100% of the isolates were found to be susceptible to bacitracin and novobiocin. It was figured out from the qualitative enzyme activity results that 23 isolates (12 %) showed caseinase, 106 isolates (57 %) gelatinase activities, while 21 isolates (11 %) display amylase, 65 isolates (35 %) esterase and 33 isolates (18 %) lipase activity. Caseinase, ceratinase, collagenase, esterase and lipase enzyme activities of some isolates, showing qualitative enzyme activity, were quantitatively measured. It was found that isolate 150 had 9.2 U/ml caseinase, 0.6 U/ml ceratinase, 1.7 U/ml collagenase activity, isolate 140 had 51 U/ml esterase activity, isolate 505 had 33.8 U/ml lipase activities which is higher than other isolates.

In our study, taking into account the phenotypic findings of the research, 34 of 186 isolates were identified by 16S rRNA sequence analysis. According to these results, 34 extremely halophilic archaea were identified, including 10 isolates *Natrialba aegyptia* 40, 5 isolates *Halococcus thailandensis*, 4 isolates *Natrinema pallidum* R-fish, 2 isolates

*Halococcus dombrowskii* H4, 2 isolates *Halovivax asiaticus*, ve 1 isolate each *Halovivax* sp. E107, *Halococcus morrhua*, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1. Detecting *Natrialba aegyptia* 40 in 6 of 8 hide samples showed that this strain is widely found in hide samples.

As a result, in our study 16 different strain of extremely halophilic archaea were identified from 34 isolates. Two of these were obtained from salted raw hides in previous studies, but other 14 strains were identified for first time from salted raw hide in our study. Research results are expected to contribute to other studies and solving microbial problems in leather industry.

**Keywords:** Salted Raw Hide, Extremely Halophilic Archaea, Protease, Keratinase, Collagenase, Lipase, Esterase, 16S rRNA sequence analysis.

## İÇERİK

DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Ham Derilerin Yapısı.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Ham Deri Bileşenleri.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Deri Sektörü.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3.1. Mamul deri üretimi.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2. Ham derilerin işlenmesi.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2.1. Konservasyon.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2.2. Islatma ve yumuşatma basamağı.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2.3. Kıl girme ve kireçlik basamağı .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2.4. Kireç giderme ve sama basamağı .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2.5. Yağ giderme basamağı.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2.6. Pikle basamağı.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2.7. Krom tabaklama basamağı.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2.8. Tabaklama sonrası yaş işlem basamakları .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Tuzla Konservelenmiş Ham Derilerde Mikrobiyal Aktivite.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Mikrobiyal Enzimler.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.1. Hidrolitik enzimler.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.1.1. Haloarkeal ekzoenzimler .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.1.1.1. Proteazlar .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.1.1.2. Lipaz ve esterazlar.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.2. Deri işlemleri ve enzimler .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. Halofilik Mikroorganizmalar.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6.1. Halofilik bakteriler.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6.2. Halofilik arkeler .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6.2.1. Halofilik arkelerin tanımlanması.....</b>	<b>27</b>

## İÇERİK (devam)

2.6.2.2. Halobacteriales takımının özellikleri.....	27
2.7. 16S rRNA dizi analizi.....	28
<b>BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Materyal .....</b>	<b>30</b>
3.1.1. Ham deri .....	30
3.1.2. Besiyerleri .....	30
3.1.3. Antibiyotik duyarlılık diskleri .....	32
3.1.4. Farklı karbon kaynakları.....	32
3.1.5. Kimyasal çözeltiler ve tamponlar .....	32
3.1.5.1. % 20'lik gliserol çözeltisi.....	32
3.1.5.2. Tromsdorf ayırıcı .....	33
3.1.5.3. Alfa ( $\alpha$ ) - naftol çözeltisi.....	33
3.1.5.4. Kovaks ayırıcı .....	33
3.1.5.5. Tetrametil p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisi.....	33
3.1.5.6. % 3'lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çözeltisi .....	34
3.1.5.7. Kristal viyole boya çözeltisi.....	34
3.1.5.8. Gram iyodür çözeltisi.....	34
3.1.5.9. Safranin boya çözeltisi .....	34
3.1.5.10. % 2'lik asetik asit çözeltisi .....	35
3.1.5.11. Frazier ayırıcı .....	35
3.1.5.12. 50mM Tris-HCl pH:7.5 tampon çözeltisi.....	35
3.1.5.13. TCA (Trikloro Asetik Asit) karışımı .....	35
3.1.5.14. % 40 TCA çözeltisi.....	35
3.1.5.15. 2 M NaOH çözeltisi .....	36
3.1.5.16. 10 mM pNP Laurat substrat çözeltisi.....	36
3.1.5.17. 10 mM pNP Bütirat substrat çözeltisi .....	36
3.1.5.18. Lipaz ve esteraz tampon çözeltisi.....	36
3.1.5.19. 0.5 M $Na_2CO_3$ (Sodyum Karbonat) .....	36
3.1.5.20. 10X TAE tamponu .....	37
3.1.5.21. 0.5 M EDTA pH:8 (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) .....	37
3.1.5.22. 6x jel yükleme boyası .....	37
3.1.5.23. Agaroz jel .....	37

## İÇERİK (devam)

3.1.5.24. 400x syber green I jel boya çözeltisi .....	38
3.1.6. Kullanılan başlıca cihaz ve ekipmanlar .....	38
3.2 Yöntem .....	39
3.2.1. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu.....	39
3.2.2. Gram boyama .....	39
3.2.3. Biyokimyasal testler .....	39
3.2.3.1. Oksidaz testi.....	39
3.2.3.2. Katalaz testi .....	40
3.2.3.3. İndol testi.....	40
3.2.3.4. Nitratın gaz oluşumu .....	40
3.2.3.5. Nitratın nitrit oluşumu .....	40
3.2.4. pH toleransı.....	40
3.2.5. Sıcaklık toleransı .....	40
3.2.6. Tuz toleransı .....	41
3.2.7. En düşük maya özütü.....	41
3.2.8. Karbon kaynağı kullanımı .....	41
3.2.9. Minimum Mg ihtiyacı .....	41
3.2.10. Antibiyotik duyarlılık testleri.....	41
3.2.11. Hidrolitik enzim kapasitelerinin belirlenmesi .....	42
3.2.11.1. Nitel enzim aktivitelerinin belirlenmesi .....	42
3.2.11.1.1. Dnaz testi .....	42
3.2.11.1.2. Selülaz testi.....	42
3.2.11.1.3. Kazeinaz testi .....	42
3.2.11.1.4. Jelatinaz testi.....	42
3.2.11.1.5. Amilaz testi.....	42
3.2.11.1.6. Esteraz testi .....	43
3.2.11.1.7. Lipaz testi .....	43
3.2.11.2. Nicel enzim kapasitelerinin belirlenmesi .....	43
3.2.11.2.1. Büyüme grafiğinin oluşturulması .....	43
3.2.11.2.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü .....	43
3.2.11.2.3. Kollajenaz aktivitesinin ölçümü.....	44
3.2.11.2.4. Keratinaz aktivitesinin ölçümü .....	45

## İÇERİK (devam)

3.2.11.2.5. Lipaz aktivitesinin ölçümü.....	46
3.2.11.2.6. Esteraz aktivitesinin ölçümü .....	46
3.2.12. Moleküler tanımlama.....	47
3.2.12.1. DNA izolasyonu .....	47
3.2.12.2. Genomik DNA'ların kontrolü.....	48
3.2.12.3. İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması .....	48
3.2.12.4. 16S rRNA PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü.....	49
3.2.12.5. 16S rRNA dizi analizi.....	49
<b>BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
4.1. Araştırma Bulguları.....	50
4.1.1. İzolatların elde edilmesi.....	50
4.1.2. İzolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri .....	50
4.1.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri .....	52
4.1.4. Büyüme gereksinimleri.....	52
4.1.4.1. En düşük maya özütü.....	52
4.1.4.2. En düşük Mg ihtiyacı.....	52
4.1.5. Sıcaklık toleransı .....	52
4.1.6. pH toleransı.....	64
4.1.7. NaCl toleransı.....	64
4.1.8. Karbon kaynağı kullanımı .....	64
4.1.9. Antibiyotik duyarlılık testi .....	64
4.1.10. Hidrolitik enzim aktivitelerinin nitel bulguları.....	69
4.1.11. Hidrolitik enzim aktivitelerinin nicel bulguları .....	72
4.1.11.1. Proteaz aktivite ölçümü .....	72
4.1.11.2. Keratinaz aktivite ölçümü .....	74
4.1.11.3. Kollajenaz aktivite ölçümü.....	74
4.1.11.4. Esteraz aktivite ölçümü .....	75
4.1.11.5. Lipaz aktivite ölçümü .....	76
4.1.12. Moleküler tanımlama bulguları.....	77
4.2. Tartışma .....	83
4.2.1. Yöntem ve fenotipik bulgular üzerine tartışma .....	83

## **İÇERİK (devam)**

4.2.2.	Hidrolitik enzim aktivitesi ölçüm bulgularının tartışılması.....	85
4.2.3.	Moleküler tanımlama bulgularının tartışılması.....	90
<b>BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>		<b>94</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>		<b>96</b>
<b>Ekler</b>	.....	<b>I</b>
<b>Çizelgeler</b>	.....	<b>XXXV</b>
<b>Şekiller</b>	.....	<b>XXXVII</b>
<b>Özgeçmiş</b>	.....	<b>XXXVIII</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Deri sektörünün temel ham maddesini oluşturan ham deri, kesilen ya da başka bir şekilde öldürülen hayvanın yüzülmesiyle elde edilen organik bir maddedir. Deri sektörü gerek et endüstrisinin bir yan ürününü değerlendirmesi ve gerekse yarattığı istihdam nedeniyle pek çok gelişmekte olan ülke için önemli bir ekonomik faaliyettir. Deri üretiminde kullanılan ham maddenin en önemli kaynağını memeli hayvan derileri oluşturmaktadır. Mamul deri üretiminde kullanılan ham deri; yapısı, dokusu, kimyasal bileşimi ve diğer özellikleri kendine has olan doğal bir üründür (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Derinin protein miktarı oldukça yüksektir. Bu nedenle mikroorganizmalar hızlı bir şekilde çoğalmaktadır (Dahl, 1956; Tancous, 1986; Karaboz, 1994; Birbir, 1997; Orlita, 2004). Bunun sonunda basit kıl gevşemeleri ve kırmızı renkli pigmentasyonlar, ciddi sırça yüzülmeleri ve fibriler yapı dejenerasyonuna kadar birçok mikrobiyolojik hasar oluşmaktadır (Tancous, 1986).

Biyolojik bozulma derinin ve diğer biyopolimer veya organik materyallerin ve onlardan elde edilen ürünlerin estetik, fonksiyonel ve diğer özelliklerini azaltan önemli bir faktördür. Deri konservasyonunda ve işlenmesinde biyolojik bozulmanın önlenmesi çok önemli olduğu için, bu proseslerin mikroorganizmalardan arındırılması ve daha etkili yöntemlerin geliştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır (Orlita, 2004).

Bu amaçla ham deriler işlenmek üzere tabakhanelere geldiğinde genellikle dehidrasyon esasına dayanan koruma koşulları altında bulunmaktadır. Avrupa, Kuzey Amerika ve diğer ılıman iklimlerde ham derilerinin korunmasında kurutma, tuz ve salamura gibi konservasyon çeşitleri kullanılmakla birlikte geleneksel olarak kullanılan en yaygın yöntem tuzla konservelemedir (Thorstensen, 1993).

Ham derinin konservasyonu birçok mikroorganizmanın gelişimini engellemesine rağmen tam koruma için yeterli olmaz. Tuzla konserveleşmiş bu derilerde özellikle kızartılara sebep olan halofilik mikroorganizmalar proteolitik ve lipolitik özellikleriyle deriye zarar verebilmektedir. Bu problemleri önlemek için deri endüstrisinde çeşitli antimikrobiyal maddeler kullanılmakta ve mikroorganizmalar üzerine etkili çevre dostu yeni maddelerin tespiti üzerine çalışılmaktadır. Bunun üzerine çok çeşitli araştırmalar halen devam etmektedir.

Diğer yandan deri üretiminde maddi kayıplara neden olan bu mikroorganizmaların izolasyonu ve moleküler düzeyde tanımlarının yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu mikroorganizmaların özellikle proteolitik ve lipolitik gibi çeşitli hidrolitik enzim aktivitelerinin tespit edilmesiyle de hedef mikroorganizma gruplarına göre mikrobiyal kontrol yöntemleri üzerinde durulabilir.

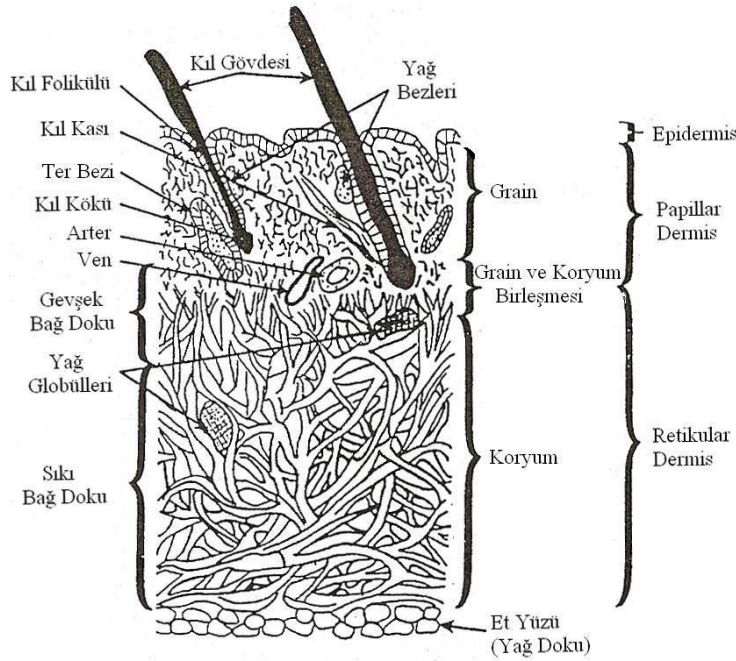
Yapılan literatür taramaları sonunda tuzlanmış ham deriler ile yapılan araştırmaların daha çok halofilik bakteriler ve onların bazı enzimleri üzerine olduğu tespit edilmiş ancak halofilik arkeler ile ilgili yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle araştırmamızda tuzlanmış ham derilerden aşırı halofilik arkelerin izole edilmesi, hidrolitik enzim kapasitelerinin belirlenmesi ve hem fenotipik hem de 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yerli ve yabancı kaynaklı tuzlanmış ham derilerden halofilik mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiş, izolatların bazı biyokimyasal özelliklerinin yanında proteaz, jelatinaz, keratinaz, kollajenaz, amilaz, esteraz ve lipaz gibi hidrolitik enzim aktiviteleri nitel ve nicel olarak belirlenmiştir ve son olarak 16S rRNA dizi analizi ile tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

## BÖLÜM 2

## ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

## 2.1. Ham Derilerin Yapısı

Memeli hayvan derilerinin kesitleri incelendiğinde yapı, gelişim, fizyolojik görev ve kimyasal yapısı farklı olan 3 ayrı tabaka tespit edilir (Toptaş, 1993; Thorstensen, 1993). Bu tabakalar dıştan içe doğru epidermis (üst deri), dermis (asıl deri, koryum veya kutis) ve hipodermis (alt deri, subkutis) olmak üzere sıralanır. Sığır ham derisine ait şematik enine kesit şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Sığır ham derisine ait şematik enine kesit (Bailey, 1999).

Üst deri veya epidermis olarak adlandırılan en dıştaki tabaka kıl, yün, tırnak ve bezlerin deri cildine açıldığı uçları ihtiva eder. Hem yağ bezi, hem de ter bezi derinin dermis katmanındadır. Deri üretiminde esas olan dermis tabakasıdır. En alttaki tabaka alt deri olarak adlandırılır. Canlı hayvan vücudunda epidermis tabakası sürekli olarak yenilenir ve önemli yaşamsal fonksiyonları yerine getirir. En kalın tabaka olan dermis tabakası epidermis tabakasını besler ve vücudu mekanik dış etkilere karşı korur. Deri endüstrisinde ince bir tabaka olan epidermis uzaklaştırıldıktan sonra ana tabaka olarak protein yapıda olan dermis kullanılır. Ham derideki dermis tabakası yaklaşık olarak %90 – 95 oranında mamul deriye dönüştürülmektedir (Sharpouse, 1983). Kürk üretiminde ise üst deri tabakası önemini yitirmediği için muhafaza edilir. Üst deri ve deri tabakası kimyasal

olarak proteinden meydana gelmiştir, ancak üst deri yapısal olarak farklı olan keratinden, dermis tabakası ise kollagen ve az miktarda elastinden oluşur (Toptaş, 1993; Heidemann, 1993).

### **2.2. Ham Deri Bileşenleri**

Genelde derilerin kuru ağırlıklarına göre % 80-93 arasında azotlu madde içermeleri, başta gelen ortak yanlarından birini oluşturur. Azotlu bileşikler arasında derinin önemli bileşenleri ise proteinlerdir. Deri yapısında ayrıca, karbonhidratlar, yağlar, mineral maddeler, vitaminler, enzimler ve önemli miktarda su bulunur. Bu elementlerin başlıcalarının ortalama miktarı; Karbon % 50, Oksijen % 25, Hidrojen % 7, Azot % 17.8, mineral maddeler % 0.2 şeklindedir (Yapıcı, 1994).

Yaş (taze yüzülmüş) bir sığır derisinin bileşenleri incelendiğinde; % 64 su, % 30 proteinler, % 2.5-3.5 karbonhidratlar, % 2.0-2.5 yağlar, % 0.3-0.5 mineral maddeler ve % 0.2-0.5 diğerleri (pigment maddeleri) olduğu gözlenmektedir (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Bu durumda sudan sonra proteinlerin deri bileşenleri yapısında önemli bir yer tuttuğu anlaşılmaktadır. Proteinler ise; basit ve konjuge (bileşik) proteinler olarak iki ayrı sınıfa ayrılabilir. Basit proteinler deri yapısının iskeletini ve temelini oluşturmaktadır ve lifsel (fibriler) proteinler ile globüler (şekilsiz) proteinler olarak iki ayrı grupta sınıflandırılabilir. Lifsel yapılu protein grubunun kollagen, elastin, retikülin ve keratin gibi lifli proteinlerden, buna karşın globüler (şekilsiz) protein grubunun albumin ve globulinlerden oluştuğu anlaşılmaktadır. Bunlar arasında en önemli yeri kollagen tutmaktadır. Globüler ve konjuge proteinlerin tabaklama işleminden önce deriden uzaklaştırılması teknolojik açıdan gereklidir (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Ayrıca bu proteinler arasında kimyasal ve bakteriyel saldırılara sırasıyla en dirençli olan fibrilli proteinler, keratin ve elastin; ardından dirençli olan kollajen ve en az dirençli olan albumin ve globulinler gelmektedir (Thorstensen, 1993).

### **2.3. Deri Sektörü**

Ham deri kaynağı olarak çoğunlukla sığır, koyun gibi insanın beslenmesi amacı ile yetiştirilen hayvanların yanı sıra az miktarda sürüngenler, balıklar ve kuşların derileri kullanılmaktadır. Ham derilerin önemli bir kısmı, insanın et ihtiyacının karşılanması için beslenen hayvanların kesimi sonrası yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Terry ve ark., 1990; Denz, 2009). Bu derilerin küresel üretimi göz önüne alınırsa, deri endüstrisi üretim bakımından dünyanın en geniş endüstrisi haline gelmektedir (Shede ve ark., 2008).

### **2.3.1. Mamul deri üretimi**

Deri sektöründe, işletmeye hammadde girişinden mamul ürün çıkışına kadar geçen süreçte yapılan işlemler çok büyük oranda birbirini etkilemektedir (Ulusoy ve ark., 2004). Deri üretimi tabaklama öncesi, tabaklama ve tabaklama sonrası basamaklar olmak üzere 3 ana safhada gerçekleştirilir. Normal şartlar altında kolaylıkla kokuşabilen, kurutulduğunda kırgınlaşan ham deri, başta tabaklama olmak üzere bir dizi kimyasal ve mekanik işlemden geçirildikten sonra, kullanmakta olduğumuz derinin fiziksel özelliklerine ulaşır. Bu haldeki deri bir ara ürün olup, işlenerek ayakkabı, giysi gibi deri mamulleri ile mobilya gibi günlük hayatta kullanılan eşyalara dönüştürülürler (Denz, 2009).

20. yüzyıl öncesinde deri üretiminde, yağ, şap ve bitkisel tanenler kullanılırken; 20. yüzyıl başında krom tuzlarının tabaklanmada kullanılmaya başlaması ile deri üretimi kabuk değiştirmiştir. Krom tuzlarının kullanılmasıyla birlikte proses süresi kısaltılmış ve mükemmel boyanabilirlik kazandırılmıştır. Günümüzde tabaklanan derilerin % 80-90'ında krom tuzları kullanılmaktadır (Denz, 2009).

Deri üretimi dünyada ağırlıklı olarak sığır, koyun elbiselik, koyun kürk ve keçi derileri kullanılarak yapılmaktadır (Denz, 2009).

### **2.3.2. Ham derilerin işlenmesi**

Genel yaklaşım olarak, sığır derisinden ayakkabılık, giysilik ve astarlık deri üretiminde; koyun derisinden ise giysilik deri üretiminde yararlanılır. Bu derilerin işleme prosesleri, kullanılan kimyasallar ve atık çıktıları büyük oranda birbirine benzerlik göstermesi nedeni ile aynı kapsamda incelenmektedir. Halen dünyada uygulanmakta olan deri işlem prosesleri sırasıyla ıslatma ve yumşatma, kıl giderme ve kireçlik, kireç giderme ve sama, yağ giderme, pikle, tabaklama, tabaklama sonrası yağ işlemler (nötralizasyon, retenaj, boyama, yağlama) ve finisaj basamaklarından oluşur (Thorstensen, 1993; Denz, 2009).

Ancak hayvan derisi kesimden sonra üzerinde barındırdığı ve çevresindeki mikroorganizmaların saldırısına uğrayacağından tabakhaneye getirilmeden önce koruma altına alınmalıdır. Bu yüzden taze ham derilerin öncelikle korunması gerekir (Dahl, 1956; Karaboz, 1994; Birbir, 1997; Orlita, 2004)

#### **2.3.2.1. Konservasyon**

Genellikle iki konservasyon tipi kullanılmaktadır; havayla kurutma ve tuzla kurutma. Her iki koruma biçimi de derinin dehidrasyonuna dayanmaktadır, böylece bakteriler

gelişimleri için gerekli sudan yoksun bırakılır. Taze bir hayvan derisinin su içeriği yaklaşık olarak % 60 seviyesindedir. Deriyi havada basitçe kurutmaktan ibaret olan havayla kurutmada su içeriği yaklaşık % 15'e düşürülür. Bu işlem uygun şekilde yapılırsa, deriye hemen hemen süresiz koruma sağlar. Deri kuru olarak depolanacaksa soğutulur. Deri içini kaplayan su anaerobik bakteriler tarafından kokuşma oluşturacağından parçalanmaya neden olabilir (Dahl, 1956).

Halofilik bakteri ve küflerin gelişmeleri için önemli ihtiyaçlardan birinin uygun nem içeriği olduğu bilinmektedir. İyi korunmuş bir deride nem içeriği deri ağırlığının % 40 - 48'i arasında olmalıdır ve bu nemde en az % 80 - 85 doymuş tuz yeterli olmaktadır (Bitlisli ve ark., 2004).

### **2.3.2.2. İslatma ve yumuşatma basamağı**

Kurutularak veya tuzlanarak konserve edilmiş ham deriye kimyasal ajanların nüfuz edebilmesi için derinin ıslanması gerekmektedir. Bu aşama sığır, koyun (elbiselik), koyun (kürklük), keçi gibi tüm deri çeşitleri için uygulanan bir işlemdir. Temelde bu işlemler için yüzey aktif ıslatıcılar ve biyosidler kullanılır. İslatma işlemi sonucunda ham deri ile birlikte taşınan tuz, kan ve üre deriden uzaklaştırılmış olur (Denz, 2009).

Tabakhanelerde ilk işlem basamağı olarak bilinen ıslatma ve yumuşatmanın amacı, derinin tuzlama işlemi esnasında deriye kaybetmiş olduğu suyu geri kazandırmak, çözünür proteinleri gidermeye başlamak, lif paketlerinin mekaniksel olarak zarar görmelerini önlemek ve deriyi yabancı kirliliklerden arındırmaktır. Derinin durumuna göre bazen kısa bir ıslatmanın ardından 24 – 48 saatlik bir yumuşatma işlemi yapılmaktadır (Reeder, 1999; Orlita, 2004).

Konserve edici tuzun uzaklaştırılması ve derinin kaybettiği suyu tekrar alması bakteriyal gelişim olasılığını arttırmaktadır. Konserve edilmiş deri çok miktarda yoğun bir bakteri çeşitliliği içermektedir ve bu bakteriler ıslatma durumunda aktif olabilirler (Thorstensen, 1993).

Ham derinin konservasyonunda farklı yöntemler kullanıldığı için, nem içerikleri farklı olacağından yumuşatmaları da farklı yapılırlar. Bu yüzden, tuzlu derinin yumuşatılması için daha az çaba gerekirken, kurutulmuş derilere su yavaş yavaş verilir. Tuzlu bir derideki bakteri yükü kurutulmuş deridekinden fazladır. Bu bakterilerin bazıları proteolitik olabilir. İslatma ve yumuşatmada kullanılan su, bakterilerin gelişimini önlemek amacıyla biraz soğuk olmalıdır (Toptaş, 1993).

**2.3.2.3. Kıl giderme ve kireçlik basamağı**

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

Kıl giderme ve kireçlik işleminin birlikte yapıldığı bu proste kullanılan ana kimyasallar sodyum sülfür ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), sodyum hidrosülfür ( $\text{NaHS}$ ) ve kireçten oluşmaktadır (Denz, 2009). Kimyasal maddelerin kıllar üzerine etkisi ile kıllar eriyerek parçalanmakta, mekanik sürtünme etkisi ile epidermis ve kıl artıkları toladan uzaklaştırılmaktadır (Sharphouse, 1983).

Kıl giderme ve kireçlik işleminden sonra derilere etleme (kavaletto) adı verilen mekanik işlem uygulanarak derinin et yüzeyindeki yağ ve et fazlalıkları alınır veya derinin özelliğine göre deri bir miktar inceltir (Denz, 2009).

**2.3.2.4. Kireç giderme ve sama basamağı**

Kireçlik işleminden dolayı ortamın pH değeri aşırı alkalidir ve ortamın nötralize edilmesi gereklidir. Bunun için öncelikli olarak ortamdaki kirecin uzaklaştırılması amaçlandığı için bu işlem basamağına kireç giderme denilmektedir. Kireçlik yapılmış tolaların nötralizasyonu, kireç giderme maddesine ve tolada bulunan kireçlik kimyevi maddelerine göre, tolada şişme ve sertliğin azaltılması yönünde etki eder (Toptaş, 1993; Karaboz, 1994).

Üretim prosesinin bu aşamasında kullanılan kimyasal maddelerin ana bileşenini amonyum tuzları oluşturmaktadır. Amonyum tuzları deriye hızlı penetre olmaları ve pH'ın optimal değerlerde otomatik olarak regülasyonunu sağlayan tamponlama özellikleri nedeniyle pratikte en çok kullanılan kireç giderme maddeleridir (Menteş Çolak ve Kılıç, 2004). Kürklük koyun derisi üretim prosesinin bu aşamasında sadece sama işlemi uygulanır. Kireçlik işlemi yapılmadığından, kireç giderme işlemi ve buna bağlı olarak da amonyum tuzlarının kullanımı uygulanmaz (Denz, 2009).

Kireç gidermeyi izleyen sama işlemi genellikle aynı dolaplarda gerçekleştirilir. Bu yüzden kireçlik giderme ve sama işlemleri bir işlem basamağı olarak kabul edilebilir. Sonuç olarak derideki kirecin uzaklaştırılmasıyla pH düşer ve nötralize olduğunda gerekli sama maddeleri kullanılarak sama işlemi gerçekleştirilir

**2.3.2.5. Yağ giderme basamağı**

Özellikle küçükbaş hayvan derilerinde daha çok koryum bölgesi içinde yer alan tabii yağın tabaklamadan önce uzaklaştırılması gereklidir. Bunların deride kalmaları halinde tabaklayıcı maddelerin içeriye girmesi ve mevcut yapılar ile bağlanması güçleşmektedir. Ayrıca oluşturdukları komplekslerle tabaklamada istenmeyen durumların gelişmesine neden olurlar (Eker ve Artan, 2000).

**2.3.2.6. Pikle basamağı**

Pikle, bir sonraki işlem basamağı olan kromla tabaklama esnasında krom tuzlarının deri yüzeyine çökmeyip tüm kesit boyunca homojen dağılım göstermesi için derilerin tuz ve asitle muamele edilmesidir. Bu sayede sama işleminden sonra blösel konserve edilmiş olup nakledilebilir duruma veya tabaklanmaya hazır duruma getirilmiş olur (Toptaş, 1993; Denz, 2009)

**2.3.2.7. Krom tabaklama basamağı**

Deri teknolojisinde en önemli aşamalardan biri olan tabaklama, ham derilerin teknik proseslerle mamul deriye dönüştürülmesidir (Zengin ve Yılmaz, 2004). Bozulabilir durumdaki ham derinin tabaklayıcı maddelerle uzun süre dayanan, kullanışlı, dış etkilerle bozulmayan, kokuşma ve çürüme yapmayan, esnek bir forma dönüştürülmesi amacıyla tabaklama işlemi uygulanmaktadır. Tabaklama amacıyla kullanılan maddelere tabaklama maddeleri denir. Tabaklama maddeleri bitkisel, mineral, sentetik ve diğer tabaklama maddeleri olarak sınıflandırılırlar (Sarı, 2005). Özellikle mineral tabaklama maddeleri içerisinde yer alan krom tuzları ile tabaklama en ideal tabaklama yöntemi olup dünyada %90 civarında kullanılmaktadır (Yakalı ve Dikmelik, 1994).

Deri işleme aktivitelerinde tabaklama işleminin büyük bir çoğunluğu 3 değerlikli krom tuzları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle tabaklama prosesi denildiğinde de genellikle krom tabaklama anlaşılmaktadır (Yapıcı ve Tozan, 2004).

**2.3.2.8. Tabaklama sonrası yağ işlem basamakları**

Tabaklama öncesinde bir dizi işlem basamağının ardından tabaklama yapılmakta ve bunu nötralizasyon, retenaj, yağlama ve boyama gibi tabaklama sonrası yağ işlemler izlemektedir. Mamul derilerden beklenen özelliklere göre pratikte retenaj, yağlama ve boyama işlemleri ayrı ayrı yapılabildiği gibi ikili kombinasyonlar halinde yada üçü bir arada da yapılabilmektedir.

Nötralizasyon veya asitliği giderme kromla tabaklamadan sonra yapılır. Nötralizasyon işlemiyle kromlu derideki suda erir tuzlar uzaklaştırılır ve serbest asitler nötralize edilir. Başka deyişle nötralizasyon, krom tabaklanmış derinin katyonik karakterini değiştirir. Böylelikle, anyonik dolgu maddeleri, boyar maddeler ve yağlar, sadece yüzeye değil derinin ortalarına kadar nüfuz ederek daha güzel bir cilt görünümü sıkılık ve esneklik meydana getirir (Yakalı ve Dikmelik, 1994). Nötralizasyon sepi maddeleri pH 3–6 arasında büyük bir tamponlama kapasitesine sahiptir (Toptaş, 1993).

Yeniden veya ikinci kez tabaklama anlamına gelen retenaj kromlu deriye daha üstün özellikler kazandırmak amacıyla yapılır. Kromlu deri ne kadar iyi tabaklanırsa tabaklansın yine de arzu edilen özellikleri karşılamaz. İstenilen ve daha önce elde edilmiş sonuçlara göre retenaj maddeleri nötralizasyondan önce, nötralizasyon sırasında veya nötralizasyondan sonra verilebilir. Hatta retenaj-boyama-yağlamadan sonra da yapılabilmektedir (Yakalı ve Dikmelik, 1994; Sarı, 2005).

Derilerin işlenmesinde uygulanan en önemli işlemlerden birisi de yağlamadır. Ham deride bulunan doğal yağlar yumuşatma, kireçleme gibi ön işlemlerle uzaklaştırılmış ve derinin doğal yağ içeriği oldukça azalmıştır (Thorstensen, 1993). Yağlama özellikle alt işlenti basamaklarında kaybedilen doğal yağı yerine koymak için yapılmaktadır. Yağlama genellikle 30-40 dakika süresince yaklaşık 60-66 C<sup>0</sup> sıcaklıkta yağ emülsiyonu kullanılan bir dolapta uygulanır (Anonim, 2000).

Deri endüstrisinde boyama, tabaklama ve bitirme işlemleri arasında yer alan bir procestir. Boyar maddenin üç boyutlu kollagen lifleri arasına bağlanması diğer materyallerden farklı olup, birbirini takip eden birçok olayın bir sonucudur (Yıldırım, 2004).

Deri teknolojisinde ham derinin işlenmesi ve boyanması gibi işlemler derinin kalitesine etki eden en önemli faktörlerdir. Derinin üç boyutlu yapıda olması ve boyanın yapının diplerine kadar nüfuz etmesi pratik bakımdan çok önemlidir. Derinin bir protein-halojen malzeme olması ve aralarında lifli bağların varlığı, tabaklama işlemi için çok önemlidir. Boyanın fiksasyonu, genel olarak tabaklama durumuna ve yağ atık madde, proteinlere bağlı kimyasallar gibi maddelerin durumlarına göre değişir. Esas itibariyle, deride boya fiksasyonu; sıcaklık, kimyasallar, deri dokusunun özellikleri, tabaklama işlemi, su, yağ gibi birçok faktörün dengelenmesiyle gerçekleşen bir işlemdir (Oktay, 2004).

#### **2.4. Tuzla Konservelenmiş Ham Derilerde Mikrobiyal Aktivite**

Birçok endüstriyel ürünün üretiminde ve sonrasında mikroorganizmalar gelişerek ürünün zarar görmesine, ürünün bozulmasına, kalite düşüklüğüne ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar. Avrupa, Kuzey Amerika ve diğer ılıman iklimlerde ham derilerinin korunmasında kurutma, tuz ve salamura gibi konservasyon çeşitleri arasında en yaygın yöntem geleneksel olarak tuzla konserveleme yöntemidir (Thorstensen, 1993). Avrupa Birliği ülkelerinde toplam endüstriyel ürünlerin yaklaşık %2-5'inin mikroorganizmalar tarafından zarara uğratıldığı tahmin edilmektedir (Lindner, 1998).

Tuzlama ile derilerin içerdiği su miktarı yaklaşık olarak % 60-65 seviyelerinden % 35-40 seviyelerine düşmektedir. Su kaybı bakteriyal gelişimi sınırlayan faktörlerden birisidir ancak bu durum tam bir koruma için yeterli değildir. Bununla birlikte böyle derilerin depolanması sırasında istiflerin fazla olması ısıyı yükseltmekte ve bakteri gelişimine olanak tanımaktadır. İstiflerin yerinin sıklıkla değiştirilmesi ise söz konusu derilerin havalanmasını sağlayarak, dinlenen sporların faaliyete geçmesine ve vegetatif forma dönüşmesine neden olmaktadır (Karaboz,1994).

Bununla birlikte derilerin mikroorganizmalar tarafından saldırıya uğramasında deri işletmelerinde kullanılan teknolojiler, prosesin uygulandığı ortam, kullanılan yardımcı kimyasallar, işletmenin genel temizliği ve çalışma prensipleri gibi faktörler de önemli rol oynamaktadır (Sarı ve Eke Bayramoğlu, 2004).

Büyükbaş ve küçükbaş hayvan derilerinin saklanması deri endüstrisinin ana konularından biridir. Ham deri biyolojik yapısı nedeniyle kolayca bozulabilir. Bundan dolayı hayvanlardan yüzülerek elde edilen ham derilerin işleme girmeden önce uygun koşullar altında saklanması gerekmektedir (Bitlisli ve ark., 2004).

Mikroorganizmalar yaygın olarak her yerde bulunurlar. Deri işletmeleri bakteri ve funguslar için yaşam ortamı teşkil eder. Gerek bakteriler, funguslar ve gerekse bunların metabolitleri derilere çeşitli şekillerde zarar verirler (Sarı ve Eke Bayramoğlu, 2004).

Bununla birlikte deri endüstrisindeki biyolojik bozulma, deri imalatı ve ayrıca işlenmiş derilerin ve ürünlerin depolanması esnasında ham derilerdeki makro ve mikro organizmaların aktivitesi sonucu meydana gelir. Deri içerdiği protein ve lipitlerinden dolayı birçok organizma için uygun bir substrat konumundadır. Örneğin ham derilerde bakteri ve küf gelişimine ek olarak onlarla beslenen böcekler, sinekler ve larvalar da parçalanmaya neden olmaktadır ve aynı zamanda parçalanmamış materyallere kontaminasyon vektörü olabilirler (Orlita, 2004).

Bakteriyal saldırı yünlü deriler üzerinde kızartı, çürüme kokusu, kıl dökülmesi, sıvı akması ve son olarak kollajen dokusunda bir bozulma olarak ortaya çıkmaktadır. Mamul deride ise bu durumlar sırça tabakasının kaybı, “pinhole” olarak bilinen iğne deliğine benzer çukurlar, epidermis kaybı, kabarma ve soyulma, boşluk hissi ve delikler olarak görülür (Mitchel, 1987).

Bununla birlikte tuz lekeleri ve kızışma bu bozuklukların ticari gösterimleridir. Her ikisine de öncelikle renk oluşturan halofilik organizmaların gelişiminin neden olduğu düşünülmektedir (Dahl, 1956).

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

Yılmaz (2010) tuzlanmış derilerden ılımlı ve aşırı halofil bakterilerin izolasyonu ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu çalışmasında İngiltere kaynaklı ham deri örneklerinde halofil bakteri sayısının  $10^5$ - $10^6$  kob/g, Avustralya kaynaklı ham deri örneklerinde  $10^2$  kob/g olduğunu bildirmiştir.

Kızışma, derilerin et yüzeyinde pembemsi, kırmızı veya mor renklenme olmasıdır. Bu bozulmaya neden olan bakteriler yüksek bir pH derecesinde gelişebilmekte ve sodyum karbonat ilavesiyle engellenememektedir. *Sarcinae* ve *Micrococcus* cinsleri olarak tanımlanan bu bakterilerin bazıları deniz tuzlarında kirletici olarak ortaya çıkmaktadır (Dahl, 1956).

Halofilik bir organizma olan *Sarcinae litoralis* türünün gelişimi ve renk oluşturması farklı karbon ve nitrojen kaynakları ve birtakım mineral tuzların etkisiyle ilişkili olduğundan çoğunlukla tuzlanmış büyükbaş ve küçükbaş hayvan derilerinde kızışmaya neden olduğu bulunmuştur (Nandy ve ark., 1968).

Hayvan derilerinin depolama şartlarının ve bekletilme sürelerinin kontrollü bir biçimde yapılması, derilerin zedelenmeden yüzülmesi ve tuz doyunluğunun yeterli olması ile birlikte kokuşmayı sağlayacak bakterilerin üremesine olanak sağlayacak bazı şartların ortadan kaldırılması ile derilerin zarar görmeden işlenebilir hale getirilmesi sağlanabilir (Dostbil ve Ağaoğlu, 2004).

Genellikle tuz ile koruma altına alınan konserve derilerde, halofilik veya halotolerant bakteriler gelişebilmektedir. Söz konusu bu bakteriler derilerde kırmızı ve mor kızılaşmaya neden olmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal maddeler büyük ve küçükbaş hayvan derilerin taşınması, depolanması ve işlenmeleri esnasında bozulmaları önlemek için

uygulanabilir. Deri bir antimikrobiyal madde içine daldırılabilir veya antimikrobiyal madde derinin etli yüzeyine püskürtülebilir (Anonim, 2000).

Berber (2009) tuzlarda, tuzlanmış ve ıslatılmış ham derilerdeki bakteriyel popülasyonun incelendiği araştırmasında tuz ve tuzlanmış ham deri örneklerinin çoğunda, proteolitik ve lipolitik aşırı halofil bakteriye rastladığını ve tuzlarda bu bakterilerin sayısının düşük olduğu ancak tuzlanmış ham derilerde ise sayının arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte tuzlama işleminin yetersiz olduğunu, bu nedenle tuzlanmış ve ıslatılmış derilerde bakteri faaliyetinin oldukça yoğun olduğu ve ıslatma işleminde kullanılan antimikrobiyal madde konsantrasyonunun yetersiz kaldığını ifade etmiştir.

Ülkemizde üretilen mamul derilerin kalitesini özellikle ham derilerin konservasyonunda kullanılan tuzun kalitesi belirlemektedir. Ham derilerde rastlanan konservasyon hataları deri kalitesini büyük ölçüde düşürerek önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Birbir, 2004).

Birbir ve ark. (1996) tuzla konservenmiş derilerden elde ettikleri halofil bakterilerin %70'inin proteolitik olduğunu ve deri materyaline zarar verdiğini bildirmişlerdir.

Halofilik arkeler tuzlanmış ham deriler üzerindeki kızartılardan sorumludur. Salamura derilerde bulunan halofilik arkeler, yüksek sıcaklıklarda uzun depolama koşullarında deri yüzeyini parçalayabilen proteazlar içermektedir (Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir ve ark., 1996; Bailey ve Birbir, 1993; Bailey ve Birbir, 1996).

Ham derinin ana bileşeni esas olarak kollajen olup (%33), geri kalanı nem ve yağdan ibarettir. Ham derilerin depolanması esnasında, kollajenin lizozomal otolizis veya bakteriyel proteolitik enzimler ile aşırı proteolizisi düzgün kollajen fibril yapısının parçalanmasına sebep olabilmektedir (Kayalvizhi ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında tuzlanmış ham derilerin zarar görme nedeninin halofilik mikroorganizmalar ve onların hidrolitik enzimleri olduğu dikkat çekmektedir. Bununla birlikte ham deriler ile ilgili araştırmalar halofil ve aşırı halofil bakteriler üzerine yoğunlaşmıştır.

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

Büyükbaş ve küçükbaş ham derilerdeki bakteriyel gelişim ve bozulmanın deri endüstrisinde önemli bir ekonomik probleme neden olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir. Ancak deride zarara neden olan mikroorganizmalar hakkındaki bilgiler

yetersiz kalmaktadır. Deriden izole edilen bu mikroorganizmaların tanımlanması geleneksel yöntemler olarak bilinen morfolojik, kültürel, fizyolojik ve biyokimsal özellikler dikkate alınarak yapılmaktadır. Son dönemlerde bu yöntemler önemli ölçüde nükleik asit teknolojisine dayanan daha yeni ve daha iyi tespit ve tanımlama yöntemleri ile yer değiştirmektedir. Bununla birlikte genetik yöntemlerle tanımlama daha hızlı ve daha doğru sonuçlar vermektedir (Oppong ve ark., 2006).

Orlita (2004) deride delik oluşumuna neden olan *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. anthracoides*, *B. pumilus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi 6 bakteri türünü hem ıslatma suyundan hem de deri üzerinde bozulmuş kısımlardan izole ederek tanımlamıştır.

Yapılan bir diğer araştırmada tuzlanmış derilerden 100 farklı bakteri straini izole edilmiş olup bunların 36'sı halofilik kok ve geri kalan 64'ü çubuk olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda tuzlanmış bir ham deride halofilik bakterilerin hızla gelişerek kırmızı ve menekşe rengi pigment oluşturduğu gözlenmiştir. Renkli lekelerden yapılan izolasyon sonucunda da sıklıkla *Micrococcus roseus*, *M. luteus* ve *M. morhuae* türleri izole edilmiştir (Orlita, 2004).

Aslan (2009) tuzlanmış derilerde bulunan mikroorganizma türlerinin saptanması konulu çalışmasında klasik tanımlama ve API test yöntemini kullanarak 36 cins ve 102 mezofilik bakteri türü izole ederek tanımlamıştır. Tanımladığı izolatlar içerisinde en yaygın bulunan bakteri cinslerinin *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas* olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada derilerin tuz kristali bulunan kısımlarında Gram pozitif kok ve basiller (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus*) ile Gram negatif *Vibrio* gibi tuza toleranslı bakteriler izole ettiğini bildirmiştir.

Çeşitli araştırmacılar tuz gölleri gibi çeşitli aşırı tuzlu çevrelerden farklı tuz gereksinimleri olan ekstrem halofilik mikroorganizmaları izole ederek gerek geleneksel yöntemler gerekse moleküler yöntemlerle tanımlamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda deniz ve göl sularının halofil bakteri içermesi nedeniyle buralardan elde edilen tuzların derileri korumada kullanılmasıyla buradan derilere büyük ölçüde ekstrem halofilik mikroorganizmaların kontamine olabileceği ifade edilmiştir (Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir ve ark., 2002).

Başka bir çalışmada tuzlanmış derilerde bulunan halofilik bakterilerin, doğal tuz göllerinde bulunan ve yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan halofilik mikroorganizmalar olabileceği vurgulanmıştır (Dostbil ve Ağaoğlu, 2004).

Son dönemlerde 16S rRNA gen dizilimi esas alınarak deri endüstrisindeki mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır.

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

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

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

Yapılan tür tanımlamaları çoğunlukla geleneksel yöntemlerle belirlenmiş olup ancak son dönemlerde moleküler yöntemler uygulanmaya başlanmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda tuzlanmış ham deriler ile ilgili aşırı halofilik arke çeşitliliğinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve hidrolitik enzimleri hakkında yeterli düzeyde çalışma olmadığı gözlenmiştir.

### **2.5. Mikrobiyal Enzimler**

Mikrobiyal enzimleri ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler) ve intrasellüler enzimler olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadırlar. Ekzoenzimler hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki substratın ayrışmasını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimlere hidrolitik enzimler adı verilmektedir. Bunlar arasında başlıca proteazlar (peptidaz, jelatinaz, kollajenaz, kazeinaz), karbohidrazlar (sellülaz, amilaz, maltaz, laktaz, sükröz, hiyaluridaz), lipazlar, nükleazlar ve diğer enzimler bulunmaktadır. İntrasellüler enzimler hücre içinde sentezlenmelerine karşın, dışarı çıkmayarak burada dissimilasyon ve assimilasyon reaksiyonlarında etkinlik gösterirler. Bu enzimler arasında başlıca permeazlar (sitoplasmik membranda bulunurlar ve aktif transportta etkinlikleri vardır, beta galaktosidaz gibi), hidrolazlar (hücre içinde hidrolitik reaksiyonlarda görev yaparlar), oksidoredüktazlar (hücre içinde oksidasyon redüksiyon olaylarında elektron transferini katalize ederler), transferazlar (karbonhidrat metabolizmasında ve yüksek enerjili fosfat bağlarının kurulmasında fonksiyonları vardır), DNA polimeraz (DNA replikasyonunda), RNA polimeraz (DNA iplikçiklerinin birinden mRNA meydana gelmesini katalize eder), nükleaz (DNA ve RNA ayrışmasında), restriksiyon endonükleaz (DNA üzerinde belli baz aralıklarından kesmeler yapar), DNA ligaz (DNA'daki kopmaları tamirde ve birleştirmede), peptidil transferaz (iki aminoasit arasında peptid bağlarının kurulmasını katalize eder) ve bunlardan ayrı olarak, sayıları 100'leri geçen diğer fonksiyonel enzimler bulunmaktadır (Arda, 2000).

#### **2.5.1. Hidrolitik enzimler**

Enzimolojinin gelişmesi 2000'li yıllarda dünya çapında yaklaşık 1,5 milyar dolarlık kullanımı ile biyoteknoloji endüstrisinde önemli bir çığır açmıştır. Proteaz, amilaz, amidaz, esteraz ve lipaz gibi hidrolitik enzimler, endüstriyel enzim pazarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Kirk ve ark., 2002).

Proteazlar hücre için önemli olan bir çok işlemde anahtar enzim rolü oynarlar ve biyoteknoloji ve endüstride yaygın şekilde kullanılırlar. Proteazlar hem fizyolojik hemde ticari alanda kendi uygulamalarına göre öncü bir pozisyonda işlev gören enzimlerin bir sınıfıdır. Proteazlar diğer proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen yıkıcı enzimlerdir (Rao ve ark., 1998).

Proteazlar canlı organizmalar için fizyolojik bir gereklilik olduğundan bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaktan her yerde bulunurlar. Bitkisel orjinli olarak

papain, bromelain ve keratinazlar, hayvansal kaynaklı olarak pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve reninler iyi bilinen proteazlara örnek olarak verilebilir (Rao ve ark., 1998).

Mikroorganizmalar geniş biyokimyasal çeşitliliklerinden ve genetik uygulamalara yatkınlığından dolayı mükemmel bir enzim kaynağı oluşturmaktadırlar. Biyoteknolojik uygulamalarda istenen tüm özelliklere sahip oldukları için mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere tercih edilmektedirler (Rao ve ark., 1998).

Proteazlar etki şekillerine bağlı olarak ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Endopeptidazlar substratın uç kısımlarından uzak peptid bağlarını hidrolize uğrattırken ekzopeptidazlar substratın amino veya karboksi ucuna yakın peptid bağlarını hidrolizler. Proteazlar daha ileri sınıflandırmada öne çıkan serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistin proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere 4 gruba ayrılırlar (Şekil 2) (Rao ve ark., 1998).

Proteolizis, bakterilerde ve ökaryotlarda çok çalışılmış olmasına rağmen arkelerdeki protein parçalanması çok az bilinmektedir. Arke domaninin birçok üyesi çoğu hücre için öldürücü koşullarda gelişebilen ekstremofillerdir. Bundan dolayı Arkeler proteazları kapsayan temel enzimolojide olduğu kadar uygulamalı araştırmalar için de önemli bir enzim kaynağıdır (DeCastro ve ark., 2009).

Proteaz	Etki Şekli	E.C. numarası
<b>Ekzopeptidazlar</b>		
Amino peptidaz	●↓○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidil peptidaz	●-●↓○-○-○---	3.4.14
Tripeptidil peptidaz	●-●-●↓○-○-○---	3.4.14
Karboksipeptidaz	---○-○-○-○-○↓●	3.4.16-3.4.18
Serin tip proteaz		3.4.16
Metalloproteaz		3.4.17
Sistin tip proteaz		3.4.18
Peptidil dipeptidaz	---○-○-○-○↓●-●	3.4.15
Dipeptidaz	●↓●	3.4.13
Omega peptidaz	*-●↓○-○-○---	3.4.19
	---○-○-○↓●-*	3.4.19
<b>Endopeptidazlar</b>		
	---○-○-○↓○-○-○---	3.4.21-3.4.34
Serin proteazlar		3.4.21
Sistin proteazlar		3.4.22
Aspartik proteazlar		3.4.23
Metalloproteazlar		3.4.24
Diğer Endopeptidazlar		3.4.99

Şekil 2. Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998).

**2.5.1.1. Haloarkeal ekzoenzimler**

Haloarkeler, yüksek tuzlu çevrelerde (>2.5 M NaCl) baskındırlar. Bu adaptasyonun sonucu olarak haloarkeler ve enzimleri yüksek tuzlu çevrelerde aktif ve stabil durumdadır (Mevarech ve ark., 2000). Bundan dolayı yüksek tuz veya organik çözücüler gibi düşük su aktivitesi gerektiren işlemlerin uygulanmasında haloarkeler ve enzimleri biyokatalizör olarak büyük bir potansiyele sahiptir (DeCastro ve ark., 2008).

**2.5.1.1.1. Proteazlar**

Haloarkeal türlerden izole edilen proteazların tümü serin proteazdır ve çoğu subtilisin benzeri serin proteaz alt ailesi ile ilişkili görülmektedir. Serin proteaz inhibitörleriyle (fenilmetil sülfanil florid, diizopropil florofosfatlar) ve subtilisin-spesifik inhibitörleriyle (streptomyces subtilisin inhibitörü, ovomucoid) enzim inaktivasyonunun gerçekleşmesi bu ilişkiyi destekler niteliktedir (De Castro ve ark., 2006).

Ekstraselüler proteazlar birkaç nötrofilik haloarkeden izole edilmiş ve biyokimyasal düzeyde karakterize edilmiştir (DeCastro ve ark., 2006; Vidyasagar ve ark., 2006). Bu proteazları kodlayan birkaç gen izole edilerek heterolog sistemlerde eksprese edilmiştir (Kamekura ve ark., 1992; Kamekura ve ark., 1996; Shi ve ark., 2006).

Nötrofilik haloarkelere karşı alkalifilik haloarkeler gelişmeleri için yüksek pH (8.5-11) ve yüksek tuza (4-5M NaCl) ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden farklı bir grup olarak nitelendirilirler (Tindall ve ark., 1984).

Nötrofilik haloarke olan *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*), *Natrialba asiatica* ve *Haloferax mediterranei* R4 'den izole edilen proteazlar genellikle 40-66 kDa'dur ve yapısal stabilite için yüksek tuz, bazik pH ve 50°C veya daha yüksek sıcaklıkta optimum aktivite gösterir (De Castro ve ark., 2006). Haloalkalifilik arkelerin birkaç proteaz saflaştırılmış ve biyokimyasal düzeyde karakterize edilmiştir. Bunlardan *Natrialba magadii* ekstraselüler proteazı ekstraselüler ortamdan izole edilerek saflaştırılmış 45 kDa'luk bir serin proteazdır ve yüksek tuz, pH ve organik çözücü konsantrasyonlarında aktif ve stabildir (Gimenez ve ark., 2000).

Haloarkelerin ortama ekstraselüler proteaz salgılama mekanizmaları hakkında tam bir bilgi yoktur ancak protein sekresyonu için genel sekresyon (Sec) ve twin-arjinin-transport (Tat) yol izleri tespit edilmiştir. İn silico analizler ile *Halobacterium* sp. NRC-1'de ana protein sekresyonunun Tat yoliziyle olduğu desteklenmiştir. Tat yolizinin kullanımı haloarkeler için bir avantajdır çünkü yüksek KCl konsantrasyonuna sahip sitoplazmik

ortamda proteinlerin katlanıp yüksek NaCl içeren dış ortama salınımına imkan sağlamaktadır (Ring ve Eichler, 2004; De Castro ve ark., 2006).

#### **2.5.1.1.2. Lipaz ve esterazlar**

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

*Salinivibrio* sp., *Natronococcus* sp., gibi çoğu ılımlı veya aşırı halofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda stabil olan lipazları ürettiği gözlenmiştir (Enache ve Kamekura, 2010). Boutaiba ve ark., (2006) aşırı halofilik bir arke olan *Natronococcus* sp.'un lipaz aktivitesinin ön karakterizasyonunu yapmışlardır.

Esterazlar genellikle kısa yağ asidi zincirlerine olan kısıtlı etkisiyle lipazlardan farklılık gösterirler. Esterazlar çok sayıda alifatik ve aromatik esterleri katalizlerler. Kozmetik, kağıt sanayi, deterjanların işlenmesi veya deterjan bileşenleri, karbonhidrat türevlerinin sentezi, gıda katkıları gibi ana uygulamalarda kullanılan bu enzimler geniş bir endüstriyel uygulama alanına sahiptir. Memelilerden elde edilen bu proteinlerin moleküler ve katalitik özelliklerinin iyi çalışılmış olmasına rağmen mikrobiyal esterazların özellikleriyle ilgili sınırlı araştırma mevcuttur (Meghji ve ark., 1990). Müller-Santos ve ark., (2009) *Haloarcula marismortui* halofilik arke türünden elde ettikleri esteraz aktivitesinin tuza bağımlılığını incelemişlerdir.

#### **2.5.2. Deri işlemleri ve enzimler**

Deri işlemleri ıslatma, kıl giderme, sama ve tabaklama gibi bir seri işlem basamaklarıyla gerçekleştirilir. Deri ve kılların en büyük yapısal engeli proteinli yapıda olmasıdır. Deri işlemede geleneksel yöntemler kirlilik ve atık uzaklaştırma problemlerini yaratan sodyum sülfid gibi tehlikeli kimyasallar içerir. Kimyasallara alternatif olarak enzim kullanımının deri kalitesinin geliştirilmesinde ve çevresel kirliliği azaltılmasında başarılı olduğu anlaşılmıştır (Rao ve ark., 1998).

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

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

Keratin, yün ve tüylerin çözünmez yapıdaki proteindir ve yüksek stabilitesiyle bilinir. Kompozisyonu ve moleküler konfigürasyonu sağlam yapıli aminoasitlerden oluşur. Keratin zinciri mekanik stabiliteyle sonuçlanan süper sarmal bir polipeptid zinciri içerisinde  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ -keratin) veya  $\beta$  sheet ( $\beta$ -keratin) ile sıkıca paketlenmiştir ve pepsin, tripsin ve papin gibi yaygın proteolitik enzimlere karşı dirençlidir. Ek olarak, sistin köprüleriyle protein zincirinin çapraz bağlanması yüksek mekanik stabilite ve keratinin proteolitik parçalanmasına dirençlilik sağlar. Buna rağmen keratin yapısı bazı mikroorganizmalarca parçalanabildiği için tüyler doğada birikim yapmaz. Mevcut çalışmalar proteolitik mikroorganizmalar üzerine odaklanmıştır ancak sistin köprülerinin yıkımı keratin parçalanmasını etkilemede oldukça önemlidir. Keratinolitik enzimler kümes hayvanları ve deri endüstrisinde keratin içeren atıkları kapsayan biyoteknolojik işlemlerde kirletici olmayan proseslerin gelişmesi amacıyla önemli kullanıma sahiptir (Riffel ve ark., 2003a).

Keratinaz üzerine yapılan bir çok çalışma bakteriler ile ilgilidir. Arkeler ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Kublanov ve ark. (2009) keratinolitik aktivite gösteren termofilik prokaryotlar ile yaptıkları çalışmada 68 – 87 °C'de pH 4.1-7 aralığında  $\alpha$ -keratin üzerinde gelişen bir izolatın *Crenarchaeota* alt domaini içerisinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Günümüzde sulu kireç ve sodyum klorid ile alkalın proteazlar kıl gidermede kullanılmaktadır ve bu durum atık su miktarında önemli bir düşüşle sonuçlanmaktadır (Rao ve ark 1998).

Önceleri sama metodları proteaz kaynağı olarak hayvan dışkısının kullanımına dayanmaktaydı. Bu metod hoş ve güvenilir değildi. Böylelikle ilk yöntemler pankreatik tripsin içeren yöntemler ile yer değiştirmiştir. Günümüzde, tripsin sama işlemleri için *Bacillus* ve *Aspergillus* proteazları birlikte kombine edilerek kullanılmaktadır. Elastin ve keratin gibi yapısal proteinler için enzim seçimi onun özgünlüğüne ve gerekli enzim miktarı üretilecek derinin çeşidine bağlıdır. Kıl giderme ve samada enzim kullanımının

artması sadece kirlilik problemini önlemekle kalmaz, enerji korunumunda da etkili olur (Rao ve ark 1998).

### **2.6. Halofilik Mikroorganizmalar**

Halofiller, gelişmek için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna gereksinim duyan ve bu özellikteki tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmiş, hem prokaryotik hem de ökaryotik temsilcileri bulunan geniş bir gruptur. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuz üretim tesislerinde ve tuzlanmış balık ve derilerin yüzeyinde bulunurlar (DasSarma ve Arora, 2001).

Kushner (1985) halofilleri gelişebilmek için ihtiyaç duydukları en uygun NaCl miktarına göre sınıflandırarak 4 gruba ayırmıştır. Organizmaların gelişebilmek için ihtiyaç duydukları NaCl konsantrasyonları %1'in altındakiler halofilik olmayanlar, %1-3 arasındakiler az halofiller, %3-15 arasındakiler ılımlı halofiller ve % 15'den fazla olanlar aşırı halofiller olarak gruplandırılmıştır (Kushner, 1985). Bu gruplandırmaya ek olarak NaCl varlığında veya yokluğunda gelişim gösteren halotolerant organizmalar da bulunmaktadır (DasSarma ve Arora, 2001).

Aşırı halofil organizmaların temsilcileri bakteri, arke ve ökaryot olarak bilinen 3 domainin içerisinde de yer almaktadır. Halofilik metanojenik ya da heterotrofik arkeler, halofilik fotosentetik ya da heterotrofik bakteriler, tek hücreli fotosentetik ökaryotlar ve *Artemia* gibi çok hücreli *Crustaceae* üyeleri ya da *Ephydra* cinsi gibi böcekler tuzcul çevrelerde bulunabilmektedirler. Bununla birlikte farklı yüksek tuzlu çevreler birçok farklı kuş türlerine ev sahipliği yapmaktadır (Oren, 2002).

#### **2.6.1. Halofilik bakteriler**

Halofilik bakteriler içerisinde yer alan *Halomonas elongata* türünün hücre duvarı yapısı hidrofobik özelliğinden dolayı farklılık gösterir. Yüzeyin hidrofobik olması büyük olasılıkla hücre duvarı yapısı ve sitoplazmik membranın ortak bir fonksiyonudur. Yüksek NaCl konsantrasyonunda yüklü fosfolipidlerin sayıca artışı güçlendirilmiş hidrofilik eğilimi açıklayabilir. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzlulukta suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesini önler. Ayrıca peptidoglukan yapısında bulunan hidrofobik bir aminoasit olan lösin tüm hücre duvarının hidrofobisine katkı sağlar (Oren, 2002).

*Halomonas eurihalina* yapısının % 42'si karbonhidrat ve % 15'i protein olan bir ekzopolisakkarit üretir. Bu polimer oldukça viskoz ve özellikle asidik pH koşullarında termostabildir (Oren, 2002).

Farklı halofilik bakteri grupları arasında flagella ile hareket oldukça yaygındır. Özellikle kalın, kılıflı polar flagella haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterisi *Halorhodospira abdelmalehii* türünde gözlenmiştir (Oren, 2002).

Halofilik bakterilerin sitoplazmik membran özellikleri, iyon geçirgenliği ve integral membran proteinlerinin aktivitesi gibi fonksiyonları ayarlamak için hücre dışı tuz konsantrasyonuna göre geniş kapsamda düzenlenmiştir. Tuz adaptasyonu (haloadaptasyon) en azndan hücre zarfının osmotik strese karşı bir cevabıdır (Oren, 2002). Hücre membranının özelliklerinde tuza bağlı değişiklikler hem membran yapısında baskın olan fosfolipid çeşitlerinin düzeyinde hemde lipidlerdeki yağ asidi zincir çeşitlerinde tanımlanmıştır. Çoğu türde bulunan başlıca polar lipidler fosfotidilkolin (PC) ve fosfotidiletanolamin (PE) lipidleridir. Ek olarak difosfotidilgliserol (kardiolipin, CL) ve glikolipidler gibi lipid türleri de bulunabilir. Genellikle tuzluluk arttığında negatif yüklü fosfolipid (PC, CL) içeriği artar (Oren, 2002).

Çubuk şekilli Gram negatif halofilik bakteriler (*Halomonas*, *Chromohalobacter* ve ilgili organizmalar) membran lipidlerinde genellikle düz zincirli doymuş ve monodoymamış yağ asitlerini (C16:0, 16:1 ve özellikle 18:1) içerirler. Siklopropan yağ asitleri birçok izolatta tespit edilmiştir. Dallanmış yağ asitlerinin yoğunluğu düşerken siklopropan yağ asiti ve doymamış yağ asiti içeriği tuz konsantrasyonu ile birlikte artar (Oren, 2002).

Halofilik bakterilerde hem ubiquinon hemde menaquinon tip isoprenoid quinonlar tespit edilmiştir. Fotosentetik prokaryotlar fotosentetik aparatın yer aldığı intraselüler membran sistemlerine sahiptir. İntraselüler fotosentetik membranların çok farklılık gösteren şekilleri halofilik anoksijenik fotosentetik bakteriler arasında görülmektedir (Oren, 2002).

Halofilik Arkelerde sıkça rastlanan gaz veziküllerine, halofilik Bakterilerde nadiren rastlanmaktadır. Siyanobakteri içerisinde gerçek halofil türlerinin gaz vezikülü içerdiği bilinmektedir (Oren, 2002).

Bazı halofilik bakteriler tarafından ısıya toleranslı endosporlar üretilir. Endospor oluşumu *Clostridiaceae* ailesinden *Clostridium halophilum*, *Halanaerobiaceae*, *Halobacteriodaceae*, *Orenia* türleri, *Bacillaceae*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Salibacillus* üyelerinde görülmektedir (Oren, 2002).

**2.6.2. Halofilik arkeler**

Arke domaini Euryarchaeota, Crenarchaeota, Nanoarchaeota ve Korarchaeota olmak üzere 4 alt domaine ayrılmıştır (DasSarma ve ark., 2010). Halofilik arkeler tamamı Euryarchaeota alt domaini içerisinde 3 ailede bulunmaktadır. Bunlar Halobacteriales takımındaki tek aile olan *Halobacteriaceae*, Methanomicrobiales takımındaki *Methanospirillaceae* ailesi ve Methanosarcinales takımındaki *Methanosarcinaceae* ailesidir.

*Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae* tuzlu ve aşırı tuzlu şartlara uyum sağlamış organizmaları olduğu kadar halofilik olmayan organizmaları da içermektedirler. Bunlardan bazıları 300 g/l tuz konsantrasyonlarında dahi gelişebilmektedirler. Halobacteriales takımı içindeki tek aile olan *Halobacteriaceae* tamamen halofillerden oluşmuştur. Tüm mikroorganizmalar içinde en çok tuza ihtiyaç duyan ve tuza en toleranslı olanlar bu aile içinde yer almaktadır (Oren, 2002).

Halobacteriales takımındaki halofilik Arkeler çok çeşitli aşırı tuzlu ekosistemlerde bulunabilirler. Doğadaki dağılımlarının belirlenmesinde başlıca faktörler toplam tuz konsantrasyonu, tuzun iyonik kompozisyonu ve besin kullanımınıdır. Halofilik Arke türlerinin çoğu toplam tuz konsantrasyonu 2.5-3 M altında olan ortamlarda gelişemez, 1-2 M'dan az konsantrasyonda tuz içeren çözeltilerde hücreler geri dönüşümsüz olarak parçalanabilir ve bir çok tür lizise uğrar. Bu yüzden yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunun varlığı ve başlıca tuzluluk değişkenliğinin olmaması halobacteriales takımındaki halofilik arkelerin gelişimi için ön şarttır (Oren, 2006).

$\text{Na}^+$  konsantrasyonuna ek olarak özellikle  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonların konsantrasyonları da önemli derecede ekolojik öneme sahiptir. Deniz suyunun buharlaşmasıyla oluşan deniz kökenli (thalassohaline) çevrelerde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının baskın olmasının yanında oldukça farklı iyonik kompozisyona sahip deniz kökenli olmayan (athalassohaline) çevrelerde bulunmaktadır. Böylelikle Ölü Deniz (İsrail) 1.9 M  $\text{Mg}^{2+}$  ve 0.4 M  $\text{Ca}^{2+}$  içermesiyle iki değerlikli katyonlarca baskın durumdadır. Bunlara ek olarak 1.7 M  $\text{Na}^+$  ve 0.14 M  $\text{K}^+$  katyonu içermektedir (Oren, 2006).

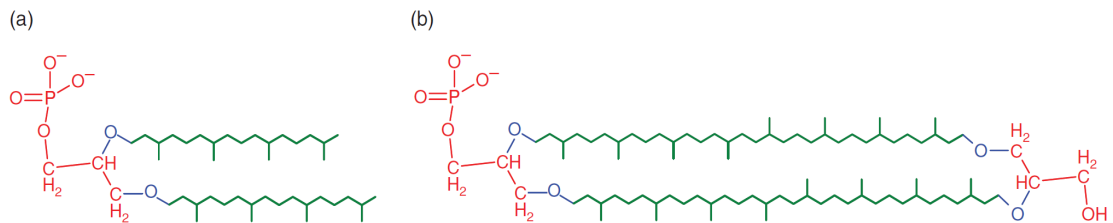
Kırmızı halofilik Arkeler Magadi Gölü (Kenya), Wadi Natrun gölleri (Mısır), Çin ve Hindistan'daki aşırı tuzlu soda göllerinde de bol miktarda bulunmaktadır. Halobacteriales takımının alkalifilik üyelerinin bu göllerde kırmızı renk oluşturduğu bildirilmiştir (Oren, 2006). Asidofilik halofilik arkeler henüz rapor edilmemiştir. Yaklaşık pH 6 değerindeki Ölü Deniz halofilik arkelerin gözlemlendiği muhtemelen en asidik çevredir (Oren ve Gurevich, 1993).

Çoğu haloofilik Arke optimum 35 °C ile 50 °C arasındaki ve bazen de daha yüksek sıcaklıkları tercih ederler (Shand and Perez, 1999). Yüksek sıcaklıkta gelişme yeteneği yüksek tuzlu çevrelerin oluşumuna öncülük eden yüksek oranda buharlaşmanın olduğu tropikal bölgelerdeki tuz göllerinin yüksek sıcaklığı ile ilişkili bir adaptasyon olabilir. Ancak soğuğa adapte olmuş strainlerde mevcuttur. Antartika'daki Deep Lake, mevsime göre sıcaklığı 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarla 11.5 °C arasında değişen, yüksek tuzluluğa sahip bir göldür. Bu gölden izole edilen haloofilik bir Arke türü olan *Halorubrum lacusprofundi* optimum 31 °C ile 37 °C arasında gelişmesine rağmen 4 °C gibi düşük sıcaklıklarda yavaş gelişim göstermektedir (Franzmann ve ark. 1988).

Ayrıca *Halobacteriaceae* üyeleri tuzlanmış gıda, deri ve koruma amaçlı yüksek konsantrasyonda tuz eklenen diğer ürünlerde de gelişebilir (Lochhead, 1934; Oren, 2006).

*Halobacteriaceae* ailesindeki cins ve türler arasında tuz gereksinimi ve toleransı arasında büyük farklılık görülmektedir. *Haloferax* cinsine ait türler *Halobacterium* cinsine ait olanlardan daha düşük tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedirler (Rodriguez-Valera ve ark., 1985). Bununla birlikte nötrofil haloofilik arkelerin büyük çoğunluğu fazla  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna (minimum 50-100 mM) gereksinim duymaktadırlar. Alkalifilik üyeler ise üremeleri için yüksek  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna gerek duymamaktadırlar (Ozcan ve ark., 2006).

Haloofilik arkeler hücresel yapıları bakımından diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında önemli farklılıklara sahiptirler ve bu farklılıklar filogenetik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin aksine arkelerde peptidoglikan yapısında bir hücre duvarı bulunmamaktadır. Bakteri ve ökaryotların hücre zarında gliserole ester bağı ile bağlanan yağ asitleri bulunurken, arkelerin hücre zarında ise gliserole eter bağları ile bağlanmış uzun hidrokarbon zincirleri bulunmaktadır (Şekil 3).



(a) Baş grub olmadan tipik difitanil gliserol dieter fosfolipid. (b) Dibifitanil gliserol tetraeter lipid (termofiller ile ortak). Her iki şekilde de kırmızı renk gliserol-1-fosfat omurgasını, mavi renk eter bağı, yeşil renk izoprenoid hidrokarbon zincirini belirtmektedir.

Şekil 3. Karakteristik Arkeal lipidler (Dassarma ve ark., 2010).

Halobacteriales üyeleri gliserole eter bağlı 20 karbonlu (fitanil, C<sub>20</sub>) ve bazen de 25 karbonlu (sesterpenil, C<sub>25</sub>) zincirler halinde dallanmış lipidlere sahiptir. Çok çeşitli nötral lipidler ve fosfolipid, sülfolipid, glikolipidleri içeren polar lipidler grubun farklı temsilcilerinde karşılaştırılabilir. Polar lipid türleri strainlerin taksonomik sınıflandırılmasında önemli bir karakteristik olarak kullanılmaktadır (Oren, 2006).

Polar lipid yapıları C<sub>20</sub>,C<sub>20</sub> veya C<sub>25</sub>,C<sub>20</sub> temel lipdilerinin türevleridir. Günümüze kadar bilinen tüm halofilik Arkeler fosfotidil gliserol (PG) ve metil ester fosfotidil gliserofosfat (Me-PGP)'in dieter türevlerini içermektedir (Kates, 1996). Fosfatidil gliserosülfat (PGS) çoğu nötrofilik türlerde bulunmaktadır (Hancock ve Kates, 1973). Bazı cinslerde (*Haloferax*, *Natrialba*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Halogeometricum*) PGS yokluğu halobacteriaceae sınıflandırılmasında kullanışlı bir ayırt edici özelliktir. Bu güne kadar karakterize edilen alkalifilik üyelerin tamamı PGS'den yoksundur (Oren, 2006). Bununla birlikte nötral lipitler ise Halobacteriales takımındaki halofilik Arkelerin toplam lipid içeriğinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Başlıca solunum quinonları MK-8 ve MK8(H<sub>2</sub>) olmak üzere 8 izoprenoid birim içeren 2 adet menaquinondur. Quinonlar hücrenin toplam nötral lipid içeriğinin yaklaşık % 9'u kadar geniş miktarlarda bulunur (Kamekura ve Kates 1988).

Halobacteriales üyelerinin çoğu hücre membranlarında yüksek düzeyde karotenoid pigment içermesi ile parlak kırmızı-turuncu renktedir (Oren, 2006). *Halobacterium salinarum* türünde karotenoid pigmentlerin UV (ultra viyole) radyasyona karşı koruyucu ve fotoraktivasyona yardımcı olduğu ileri sürülmüştür (Wu ve ark., 1983). Halofilik Arke karotenoidlerinin çoğu  $\alpha$ -bakterioruberin'in 50 karbonlu (C<sub>50</sub>) düz zincir türevleridir (Kelly ve ark., 1970). Likopen ve  $\beta$ -karoten gibi 40 karbonlu (C<sub>40</sub>) karotenoidler genellikle küçük miktarlarda bulunurlar (Kushwaha ve ark., 1982).

Halobacteriales üyelerinde 4 retinal protein tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ışıkla çalışan dış proton pompası bakteriyorodopsin, ikincisi ışıkla çalışan iç klorid pompası halorodopsin ve son ikisi fototaksi için ışığa duyarlı iki adet alıcı rodopsindir (Oren, 2006). Mor pigmentli bakteriyorodopsin ilk kez *Halobacterium salinarum* türünde tanımlanmıştır (Oesterhelt ve Stoeckenius, 1971). Bu türün bakteriyorodopsin gen kümesi çalışmaları protein ekspresyonunun düşük oksijen stresinde ve ışık ile uyarıldığını göstermiştir (Brock ve Petersen, 1976). Hücrelerde ışık enerjisini direkt kullanmayı sağlayan bakteriyodopsinin varlığı önemli bir ekolojik avantajdır. Pigment içeren hücrelerde düşük besin konsantrasyonlarında ışığın enerji sağladığı (Brock ve Petersen, 1976) ve kemostat kültürlerde gelişim oranı ile ürünleri arttırdığı görülmüştür (Rodriguez-Valera ve ark.,

1983). Ayrıca bakteriyodopsin içeren *Halobacterium salinarum* hücreleri ışıkta anaerobik olarak gelişebilmektedir (Oren, 2006).

Halobacteriales üyelerinin çoğu hareketlidir. Sağ el sarmalı flajellaya sahip oldukları görülmüştür. Saat yönünde rotasyon sonucu hücrenin ileri hareketi, saat yönünün tersi rotasyonda geriye hareket oluşturmaktadır (Alam ve Osterhelt, 1984). Flajellayı oluşturan flajellin sülfatlı bir glikoproteindir (Wieland ve ark., 1985; Oren, 2006).

Gaz vezikülleri birçok halofilik arke türünde bulunmaktadır. Gaz vezikülü oluşumu tuza bağlı olabilir örneğin *Haloferax mediterranei* sadece tuz konsantrasyonu % 17'i aştığında gaz vezikülü üretir (Röder ve Pflieger, 1996). Gaz vezikülleri çözünür oksijen miktarı düşük olan tuzlu sularda oksijen ve ışık alımını arttırmakta ve yüzmeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu gaz veziküllerinin UV ışınlarına karşı da koruyucu bir görevi olduğu belirtilmiştir (DasSarma ve ark., 2010).

Halofilik arkelerle ilgili taksonomik çalışmalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık özelliği sıkça kullanılmaktadır (Oren ve ark., 1997). Halofilik Arkeler peptidoglikan yapıda hücre duvarına sahip olmadığından penisilin, ampisilin, sikloserin, kanamisin, neomisin, polimiksin, karbenisilin, sefatoksim ve streptomisin gibi bakterileri etkileyen antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Halofilik arkelerin novobiyosin, basitrasin, rifampisin ile ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olan anizomisin ve quinolon türevlerine karşı duyarlılık gösterdikleri belirtilmiştir (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo ve ark., 1984). Holmes ve Dyll-Smith (1991) halofilik arkebakterilerde novobiosin direnciyle sonuçlanan DNA girazdaki mutasyonlar ile ilgili çalışmalarında halofilik arkebakterilerde kullanılmak üzere seçici bir marker olarak novobiosin dirençliliğine sahip klonlama vektörü geliştirmişlerdir. Novobiosin antibiyotiğinin genel olarak öbakteriyal DNA giraz inhibitörü olduğunu ve halobacteria'yı kapsayan arkebakterilerde de güçlü bir inhibitor olduğunu ifade etmişlerdir.

Halofilik arkeler 5.2 M NaCl gibi doymuş tuz konsantrasyonlarında yaşayabilmek için "salt-in" stratejisi ile ozmotik dengeyi sağlamak zorundadırlar. Bu nedenle yüksek osmotik basıncın üstesinden gelebilmek için sitoplazmalarında başta K<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> olmak üzere yüksek oranlarda iyon biriktirirler. Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun büyük bir bölümünü KCl ve daha az olarak NaCl oluşturmaktadır (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989). Halofilik arkeler, iç ortamlarında ozmolit çözünür madde olarak, dış ortamdakinin 100 katı oranında KCl biriktirdikleri için, hücresel bileşenleri de bu tuz konsantrasyonuna adapte olmuştur. Halofilik Arke türlerindeki bu adaptasyon stratejisi

halotolerant bakterilerde ozmoregülasyonu etkileyen düşük molekül ağırlıklı organik çözünenlerin biriktirilmesine karşılık gelmektedir (Danson ve Hough, 1997).

Karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, gliksilat döngüsü ile kombinasyon gerekiyse sitokrom zinciri ve trikarboksilik asit döngüsü temellidir. Karbonhidrat kullanımı sıklıkla asit üretimiyle ilişkilidir. *Halorubrum saccharovororum* türünün glikozda geliştirildiğinde asetat ve pürivat oluşturduğu görülmüştür. Gliserol varlığında gelişen çeşitli *Haloferax* ve *Haloarcula* türlerinin kültürlerinde asetat, pürivat ve D-laktat tespit edilmiştir. Halofilik arkelerde Embden-Meyerhof yol izi genellikle bulunmasına rağmen şekerlerin yıkımını kapsamaz, bu yol izinin çoğu enzimi mevcuttur ve glikoneogenezde fonksiyoneldir. Amino asitler, şekerler ve organik asitler gibi basit substratlara ek olarak polimer yapıdaki substratlar da halofilik Arkeler tarafından kullanılabilir. Halobacteriales türlerinin çoğu proteaz, lipaz, DNAz ve amilaz gibi ekzoenzimler üretir (Oren, 2006).

Oksijen, doygun tuz konsantrasyonunda yavaş çözüldüğü için halofilik Arke gelişiminde sınırlayıcı bir faktör olabilir. Birkaç grup gaz vezikülü üreterek bu oksijen sınırlamasının üstesinden gelebilmektedir. Ek olarak birçok halofilik Arke anaerobik olarak gelişebilmektedir. Halobacteriales takımı içerisinde kaydedilen anaerobik gelişim nitrat, dimetilsülfoksit, trimetilamin N-oksit veya fumarat gibi alternatif elektron tutucularını, arjinin fermantasyonunu ve bakteriyodopsin içeren hücrelerde ışık ile yürütülen anaerobik gelişimi kapsamaktadır. Nitratı indirgeme yeteneği *Halobacteriales* üyeleri arasında oldukça yaygındır (Oren ve Trüper, 1990; Oren, 2006).

Halobacteriales takımında bulunan Halofilik arkeler önemli biyoteknolojik potansiyel ve uygulamalara sahiptirler. Halofilik arkelerin eter bağlı lipidleri esterazlara karşı dirençli oldukları için lipozom yapımında kullanılması ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren ekzoenzimleri, yüksek tuz içeriğine sahip ortamlardaki makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Margesin ve Scihinner, 2001). Bununla birlikte halofilik Arkelerin bölgeye özel endonükleazlarının moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılabileceği ifade edilmiştir (Oren, 2006).

*Halobacterium salinarum* türünden elde edilen ışığa bağımlı proton pompası bakteriyodopsin önemli biyoteknolojik potansiyele sahip olup bilgi depolamada kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Oren, 2002). Ayrıca bakteriyodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması gibi alanlarda da biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Margesin ve Scihinner, 2001). Halofilik Arkelerden izole edilen proteinlerin kanser tanısı için antijen olarak

kullanabileceği belirtilmiştir (Oren, 2006). Bazı halofilik arke türlerinin hücrelerinde biyoplastik yapımında kullanılan poli-3-hidroksialkonat (PHA) biriktirdiği bildirilmiştir (Hezayen ve ark., 2002).

#### **2.6.2.1. Halofilik arkelerin tanımlanması**

Halofilik arkelerin taksonomik olarak tanımlanması geçmiş yıllarda standart biyokimyasal testler ve hücre morfolojisi özelliklerine göre yapılmaktaydı. Günümüzde moleküler yöntemlerin hızla gelişmesi ile yeni taksonların tanımlanmasında biyokimyasal özellikler ve fenotipik özelliklerin yanında, kemotaksonomik yöntemler ve DNA dizi analizlerini kapsayan moleküler taksonomik karakterler kullanılmaya başlanmıştır (Oren, 2006).

Oren ve ark. (1997) Halobacteriales takımına ait yeni bir taksonun tanımlanabilmesi için gerekli minimum standartlar belirtilmiştir. Bu standartlar; koloni şekli, büyüklüğü ve pigmentasyonu, hücre morfolojisi ve hareket, Gram reaksiyonu, minimum ve optimum NaCl ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları, sıcaklık ve pH aralığı, anaerobik üreme yeteneği (nitrat, L-arjinin v.b varlığında), karbonhidratlardan asit üretimi, tek karbon kaynağında üreyebilme, katalaz ve oksidaz aktivitesi, indol üretimi, nişasta, jelatin, kazein, ve tween 80 hidrolizi, antimikrobiyal maddelere duyarlılık, polar lipid içerikleri, DNA'nın G+C içeriği, 16S rRNA sekans analizi gibi verileri içermektedir. Günümüzde halofilik arkelerin sınıflandırılması, fenotipik özellikler, kimyasal (özellikle polar lipid kompozisyonu) ve genetik (16S rRNA sekans analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu) veriler olmak üzere üç tip veri esas alınarak yapılmaktadır (Shimane ve ark., 2011; Yang ve Cui, 2012).

#### **2.6.2.2. Halobacteriales takımının özellikleri**

Halobacteriales takımına ait türlerin hücreleri, çubuk, kok, pleomorfik, düz kare, üçgen, trapezoid şekilli morfolojik özelliklere sahip olabilmektedir (Oren, 2006). Halofilik arkelerde dinlenme yapıları veya spor yapılarına rastlanmamıştır. Hareketsiz olabildikleri gibi bazı türler flagellumları ile aktif hareket edebilmektedirler. Gram reaksiyonu yönünden çoğunlukla Gram negatif olmalarına rağmen bazıları Gram değişken olabilmektedir (Dussault, 1955; Grant ve ark., 2001). Aerobik mikroorganizmalardır, oksidaz ve katalaz aktiviteleri pozitifdir. Bazı suşlar nitrat varlığında ya da bakteriyorodopsin yardımıyla anaerobik olarak üreyebilmektedirler. Ayrıca arjinin varlığında fermentatif üreyebilen suşlar rapor edilmiştir (Hartman ve ark., 1980; Oesterhelt, 1998; Oren ve Litchfield, 1999). Üremeleri için en az 1.5 M NaCl'e ihtiyaç

duyan suşların çoğunluğu 3.5-4.5M NaCl konsantrasyonunda en iyi üreme göstermektedir (Oren, 2006). Birçok suşun koloni renkleri C<sub>50</sub> ve C<sub>40</sub> karotenoidlerinden dolayı kırmızı tonlardadır. Optimum üreme sıcaklığı 35-50°C aralığındadır. Kemoorganotrofik karakterdedirler, karbon kaynağı olarak karbonhidratları veya amino asitleri kullanırlar. Bazı suşlar tek karbon kaynağı içeren inorganik ortamlarda üreyebilirler (Grant ve ark., 2001). Fitanil (C<sub>20</sub>) ya da sesterpanil (C<sub>25</sub>) yan zincirleri olan di-izoprenoid gliserol eter türevli polar lipidleri mevcuttur (Kamekura ve Kates, 1999). DNA'ları genellikle bir majör ve bir minör komponent içerir. Minör komponent toplam DNA'nın %10-30'unu oluşturmaktadır. DNA'nın % mol G+C oranı majör komponentte 59-71, minör komponentte 51-59 arasındadır (Pfeifer ve ark., 1988; Gutierrez ve ark., 1986). Halobacteriales takımı ile içerisindeki tek aile olan *Halobacteriaceae* ailesinin özellikleri takım ile aynıdır. *Halobacteriaceae* ailesinin cins tipi *Halobacterium* cinsidir (Grant ve ark., 2001).

*Halobacteriaceae* ailesi içerisinde Haziran 2012 tarihli güncellemeye göre *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halararchaeum*, *Haloarchaeobius*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobellus*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halogramum*, *Halolamina*, *Halomarina*, *Halomicrobium*, *Halonotius*, *Halopelagius*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorientalis*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovenus*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronoarchaeum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobi*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* ve *Salarchaeum* olmak üzere 39 halofilik arke cinsi bulunmaktadır (Euzéby, 1997).

### 2.7. 16S rRNA dizi analizi

16S rDNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu günümüzde oldukça rutin hale gelmiştir. Küçük alt birim rRNA dizilerinin karşılaştırılmasında, saf bir mikroorganizma kültürü ile çalışıldığında polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak genomik DNA'dan 16S ribozomal RNA'yı kodlayan gen çoğaltılır. Daha sonra PCR ürünü dideoksi DNA dizileme metodu (Sanger dizilemesi) ile dizilenir (Madigan ve Martinko, 2009).

Sanger tarafından geliştirilen bu yöntem gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C)

sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar eklenir. Örnekler bir kapillerden geçirilirken elektroforez uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Bu sayede dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırt edilebilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır (<http://www.iontek.com.tr/>).

Yeni bulunan diziler, ribozomal veri tabanındaki (RDP) veya GenBank (Amerika), DDBS (Japonya DNA veri bankası) ve EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) gibi diğer genetik veri tabanlarındaki mevcut dizilerle karşılaştırılırlar. Ardından filogenetik ağaç oluşturan bir algoritma kullanılarak dizilerin tabiatında olan evrimsel bilgiyi en iyi şekilde ifade eden filogenetik bir ağaç çizilir (Madigan ve Martinko, 2009).

**BÖLÜM 3****MATERYAL VE YÖNTEM****3.1 Materyal****3.1.1. Ham deri**

Araştırmamızda deri materyali olarak Türkiye’de işlenen 4’ü yerli 4’ü yabancı kaynaklı olmak üzere toplam 8 adet tuzla konservelenmiş ham deri kullanılmıştır. Yerli ham deriler Niğde-Bor, Aksaray, Kayseri ve Gaziantep, yabancı ham deriler Irak, Türkmenistan, Kazakistan ve Ermenistan kaynaklı olarak temin edilmiştir.

**3.1.2. Besiyerleri**

Besiyeri ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında seyreltilerek kullanılan tuzlu su çözeltisinin (SW 30) içeriği çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. SW 30 çözeltisi

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>	<b>Molarite</b>
NaCl (Sigma)	234 g	4 M
MgCl <sub>2</sub> (Fluka)	39 g	0.4 M
MgSO <sub>4</sub> (Himedia)	61 g	0.25 M
CaCl <sub>2</sub> (Sigma)	1 g	0.01 M
KCl (Himedia)	6 g	0.08 M
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma)	0.25 g	0.003 M
NaBr (Himedia)	0.7 g	0.007 M

CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub> ayrı ayrı çözüldükten sonra çözeltiyle eklenmiştir. Tüm maddeler çözüldükten sonra çözelti saf su ile 1000 ml’ye tamamlanmış ve filtre kağıdı ile süzülmüştür. Hazırlanan SW 30 çözeltisi besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Afendra ve ark., 2004).

Çalışmamızda kullanılan SW 25, SW 20 ve SW 15 agar besiyeri içerikleri, NaCl molaritesi ve yüzdesi ile birlikte çizelge 2’de sunulmuştur. İçeriği verilen katı besiyerlerinin sıvı olarak hazırlanmasında katılaştırıcı ajan agar kullanılmamıştır.

Çizelge 2. SW besiyerleri

Besiyeri İçeriği	SW-25 Agar	SW-20 Agar	SW-15 Agar
SW 30 çözelti	833.4 ml	666.7 ml	500 ml
Maya Özütü (Himedia)	5 g	5 g	5 g
Agar (Himedia)	20 g	20 g	20 g
Saf Su	166.6 ml	333.3 ml	500 ml
NaCl Molaritesi (M)	3.33 M	2.6 M	2 M
NaCl Yüzdesi (%)	20 %	15.6 %	11.7 %

Çizelge 2'deki SW besiyeri içeriği çözülerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından 121 °C'de 15dk otoklavlanmış ve pH 7.5'e ayarlanmıştır (Afendra ve ark., 2004). Hazırlanan besiyerleri aseptik koşullar altında önceden steril edilmiş petrilere dökülmüştür.

Çizelge 3. Modifiye jelatin agar

Pepton (Bacto)	5 g
Maya Özütü (Himedia)	5 g
Glikoz (Himedia)	1 g
Jelatin (Himedia)	10 g
Agar (Himedia)	20 g
SW-30 Çözeltisi	833.4 ml
Saf su	166.7 ml

Çizelge 3'deki besiyeri içeriği tamamen çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlanmış ve pH 7.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri jelatinaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 4. Modifiye rhodamin B lipaz agar

Substrat çözeltisi		Besiyeri	
Zeytinyağı (Himedia)	30 ml	SW-30	834 ml
Saf su	50 ml	Maya özütü (Himedia)	5 g
Rodamin B (% 0.1) (Himedia)	20 ml	Agar (Himedia)	20 g
		Saf su	66 ml

1000 ml Modifiye Rodamin B Lipaz Agar (Çizelge 4) için rodamin B içermeyen substrat çözeltisi ile besiyeri otoklavda ayrı ayrı steril edilmiştir. Steril saf su ile hazırlanan

% 0.1'lik 20 ml rodamin B şırınga filtre ile steril edilerek 45 °C'de lipaz çözeltisine ilave edilmiştir. Hazırlanan lipaz çözeltisi ve besiyeri homojenize edilerek pH 7.2'ye ayarlanmış ve aseptik koşullar altında 45-50 °C'de steril petrilere dökülerek hazırlanmıştır (Anonim, 2009).

Besiyeri ve çözeltilerin pH ayarlamalarında 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılmıştır.

### 3.1.3. Antibiyotik duyarlılık diskleri

Antibiyotik duyarlılık testleri için 6 mm çapındaki antibiyotik diskler (Himedia) kullanılmıştır. Antibiyotik disklerin kodları, isimleri ve disk başına konsantrasyonları Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Antibiyotik diskler

Kod	Antibiyotik	Konsantrasyon/disk
A 10	Amfisilin	10 µg
B 10	Basitrasin	10 µg
E 15	Eritromisin	15 µg
NV 30	Novobiyosin	30 µg
P 10	Penisilin G	10 U
S 10	Streptomisin	10 µg
T 30	Tetrasiklin	30 µg
VAN 30	Vankomisin	30 µg
C 30	Kloramfenikol	30 µg
CTX 30	Cephotaxime	30 µg

### 3.1.4. Farklı karbon kaynakları

İzolatların karbon kaynağı kullanımını belirlemek için D-Galaktoz, Laktoz, D-Fruktoz, Maltoz, Mannitol, Sukroz, Trehaloz, Glikoz karbon kaynakları besiyerine % 1 oranında ilave edilerek kullanılmıştır.

### 3.1.5. Kimyasal çözeltiler ve tamponlar

Araştırmamızda kullanılan kimyasal çözelti ve tamponların içerik ve hazırlanışları aşağıda bir sıra dahilinde verilmiştir.

#### 3.1.5.1. % 20'lik gliserol çözeltisi

Kültürlerin -20 °C'de stoklaması için % 20'lik gliserol çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 6). Gliserol su ile karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

Çizelge 6. % 20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol (% 80) (Sigma)	25 ml
Saf Su	100 ml

**3.1.5.2. Tromsdorf ayıracı**

Tromsdorf ayıracı nitrattan nitrit oluşumunun tespit edilmesinde kullanılmıştır. Tromsdorf ayıracının hazırlanmasında 100 ml % 20'lik  $ZnCl_2$  çözeltisi kaynar haldeki 4 gr nişasta içeren 150 ml su içerisine yavaşça ilave edilip karıştırılır. Kaynatmaya, nişasta mümkün oldukça çözünene kadar devam edilir. Ardından saf su ile seyreltilir ve 2 gr çinko iyodür yada potasyum iyodür ilave edilir. Bundan sonra hacim 1000 ml'ye tamamlanarak filtre edilir ve karanlıkta sıkı kapaklı şişelerde stoklanır (Tamer ve ark., 1989).

**3.1.5.3. Alfa ( $\alpha$ ) - naftol çözeltisi**

Alfa ( $\alpha$ )- naftol çözeltisi nitrattan nitrit oluşumu testinde nitrit negatif tüplerde nitrat varlığının saptanması için kullanılmıştır (Çizelge 7). Alfa-Naftol etanolde çözülerek hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çizelge 7. Alfa ( $\alpha$ )- naftol çözeltisi

Alfa-Naftol (Himedia)	5 g
Etanol (% 95)	100 ml

**3.1.5.4. Kovaks ayıracı**

Kovaks ayıracı indol testinde kullanılmıştır (Çizelge 8). Hazırlanmasında Para-dimetil aminobenzaldehit alkolde çözülerek su banyosunda ısıtılmış ve ardından % 37'lik HCl dikkatlice ilave edilerek karıştırılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çizelge 8. Kovaks ayıracı

Para-dimetil Aminobenzaldehit	5 g
Amil veya butil alkol	75 ml
HCl (% 37) (Sigma)	25 ml

**3.1.5.5. Tetrametil p-fenilen diamin dihidroklorid çözeltisi**

1 g tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve oksidaz testinin uygulanmasında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

**3.1.5.6. % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisi**

3 ml Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve katalaz testinin uygulanmasında kullanılmıştır.

**3.1.5.7. Kristal viyole boya çözeltisi**

Gram boyamada kullanılmak üzere kristal viyole etanolde, amonyum oksalat saf su içerisinde ayrı ayrı çözüldükten sonra karıştırılmış ve NaCl ilave edilerek boya çözeltisi hazırlanmıştır (Çizelge 9).

Çizelge 9. Kristal viyole boya çözeltisi

Kristal Viyole	0.125 g
Etanol (% 95)	10 ml
Amonyum oksalat	0.4 g
NaCl	5 g
Saf su	40 ml

**3.1.5.8. Gram iyodür çözeltisi**

Gram boyamada kullanılmak üzere Çizelge 10'da verilen içerikler saf su içerisinde çözülerek gram iyodür çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 10. Gram iyodür çözeltisi

İyot	0.17 g
KI	0.33 g
NaCl	5 g
Saf su	50 ml

**3.1.5.9. Safranin boya çözeltisi**

Gram boyamada kullanılmak üzere safranin etanol ile tuz saf su ile ayrı ayrı çözüldükten sonra karıştırılarak safranin boya çözeltisi hazırlanmıştır (Çizelge 11).

Çizelge 11. Safranin boya çözeltisi

Safranin	0.125 g
Etanol (%95)	5 ml
NaCl	5 g
Saf su	50 ml

**3.1.5.10. % 2'lik asetik asit çözeltisi**

Gram boyamada fiksasyon için çizelge 12'de belirtilen % 2'lik asetik asit çözeltisi kullanılmıştır.

Çizelge 12. % 2'lik asetik asit çözeltisi

Asetik Asit	1 g
NaCl	5 g
Saf su	50 ml

**3.1.5.11. Frazier ayırıcı**

Jelatinaz aktivitesinin nitel olarak belirlenmesinde çizelge 13'deki frazier ayırıcı kullanılmıştır (Frazier, 1926).

Çizelge 13. Frazier ayırıcı

HgCl	15 g
HCl	20 ml
Saf su	100 ml

**3.1.5.12. 50mM Tris-HCl pH:7.5 tampon çözeltisi**

Hidrolitik enzimlerin nicel olarak belirlenmesinde 50 mM Tris-HCl pH:7.5 tampon çözeltisi kullanılmıştır. 6.057 g tris baz 800 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra konsantre HCl ile pH 7.5'e ayarlanır ve 1000 ml'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

**3.1.5.13. TCA (Trikloro Asetik Asit) karışımı**

Proteaz aktivitesi ölçümünde kullanılmak üzere çizelge 14'te belirtilen içerikler 100 ml saf su içerisinde hazırlanır.

Çizelge 14. TCA (Trikloro Asetik Asit) karışımı

TCA	1.7 g	0.11 M
Sodyum Asetat	1.8 g	0.22 M
Asetik Asit	2 ml	0.33 M
Saf su	100 ml	

**3.1.5.14. % 40 TCA çözeltisi**

Kollajenaz ve keratinaz aktivite ölçümlerinde % 40'luk TCA (Trikloro Asetik Asit) çözeltisi kullanılmıştır. 40 g TCA 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**3.1.5.15. 2 M NaOH çözeltisi**

2 M NaOH çözeltisi proteaz, kollajenaz ve keratinaz enzimlerinin nicel olarak belirlenmesinde kullanılmıştır. 8 g sodyum hidroksit (NaOH) 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**3.1.5.16. 10 mM pNP Laurat substrat çözeltisi**

Lipaz aktivitesinin ölçümünde pNP Laurat substrat çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 15).

Çizelge 15. 10 mM pNP Laurat substrat çözeltisi

pNP Laurat (Sigma)	16.1 mg
2-propanol (Sigma)	5 ml

**3.1.5.17. 10 mM pNP Bütirat substrat çözeltisi**

Esteraz aktivitesinin ölçümünde pNP Bütirat substrat çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 16).

Çizelge 16. 10 mM pNP Bütirat substrat çözeltisi

pNP Butirat (Sigma)	10.5 µl
2-propanol (Sigma)	5 ml

**3.1.5.18. Lipaz ve esteraz tampon çözeltisi**

Lipaz ve esteraz tampon çözeltisi lipaz ve esteraz enzim aktivitelerinin nicel olarak belirlenmesinde tampon çözelti olarak kullanılmıştır. Çizelge 17'deki içerik saf su içerisinde çözülerek pH 7.5'e ayarlanmış ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözelti hazırlanmıştır.

Çizelge 17. Lipaz ve esteraz tampon çözeltisi (100 ml)

Tris baz	1.2114 g	100 mM
NaCl	11.7 g	2 M
Triton X-100	0.5 ml	
pH	7.5	

**3.1.5.19. 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sodyum Karbonat)**

Lipaz ve esteraz enzim aktivite ölçümünde kullanılmak üzere 5.3 g sodyum karbonat (Sigma) 100 ml saf su içerisinde çözülerek 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hazırlanmıştır.

**3.1.5.20. 10X TAE tamponu**

Elektroforez uygulamalarında kullanılmak üzere 10X TAE tamponu (Tris-Asetik asit- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) stok olarak hazırlanmıştır (Çizelge 18). 800 ml’de tüm maddeler çözülür, pH 8’e ayarlanır ve steril saf su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

Çizelge 18. 10X TAE tamponu

Tris Baz (Sigma)	48.4 gr
Glasiyal Asetik Asit (Sigma)	11.42 gr
0.5 M EDTA (pH:8)	20 ml

**3.1.5.21. 0.5 M EDTA pH:8 (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)**

73.06 gr EDTA (Himedia), 350 ml steril saf su ile çözülür, NaOH pelletleri ilave edilerek pH 8’e ayarlanır ve steril saf su ile 500 ml’ye tamamlanır.

**3.1.5.22. 6x jel yükleme boyası**

Genomik DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde 6x jel yükleme boyası kullanılmıştır (Çizelge 19). Boya çözeltisi homojen hale getirilerek 2 ml’lik mikro tüplere bölünür ve -20 °C’de saklanır.

Çizelge 19. 6x jel yükleme boyası

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

**3.1.5.23. Agaroz jel**

Elektroforez ile genomik DNA örneklerinin kontrolü için % 0.8’lik, PZR ürünlerinin kontrolü için % 1.7’lik agaroz jel kullanılmıştır (Çizelge 20). Hazırlanan çözelti kaynatılarak çözülür ve 50–60 °C’de tarakların yerleştirildiği elektroforez kasetine dökülerek agaroz jelin katılaşması beklenir.

Çizelge 20. Agaroz jel

	% 0.8	% 1.7
Agaroz (Sigma)	0.8 g	1.7 g
1X TAE	100 ml	100 ml

**3.1.5.24. 400x syber green I jel boya çözeltisi**

Genomik DNA ve PZR ürünlerinin U.V. lamba altında görünür hale gelmesi için 400x syber green I jel boya çözeltisi kullanılmıştır. Çizelge 21'deki boya çözeltisi hazırlanarak ışık almayacak şekilde -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 21. 400x syber green I jel boya çözeltisi

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

**3.1.6. Kullanılan başlıca cihaz ve ekipmanlar**

Çalışmada kullanılan başlıca cihaz ve ekipmanlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

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

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu**

Tuzlanmış ham deri örnekleri aseptik koşullarda her biri 5 g olacak şekilde küçük parçalara bölünmüştür. Her bir deri örneğinden alınan 10 g'lık katı örnekler, 90 ml SW-15 sıvı besiyerinin inorganik kısmını içeren 250 ml'lik erlenlere aktarılmıştır (Nieto ve ark., 1989). Örnekler 200 rpm'de 4 saat çalkalanarak mikrobiyal aktivasyon sağlanmıştır. 10 kat seyreltilmiş örnekler, SW-15, SW-20 ve SW-25 sıvı besiyerinin inorganik kısmını içeren seyreltme sıvıları kullanılarak  $10^{-6}$ 'ya kadar seyreltmeler elde edilmiştir. Her seyreltmeden ait olduğu katı besiyerine yayma plaka yöntemi kullanılarak 2 tekrarlı ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 37 °C'de 14 gün inkübe edilerek oluşan halofilik mikroorganizma kolonileri renk farklılıklarına göre binoküler loop kullanılarak seçilmiştir (Hezayen ve ark., 2002). Seçilen kolonilerin birkaç tekrarlı çizgi ekimleri yapılarak saf kültürleri oluşturulmuş ve elde edilen izolatlar numaralandırılarak stoklanmıştır. Kısa süreli stoklar +4 °C'de, daha uzun süreli stoklar ise % 20 Gliserol çözeltisi kullanılarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2. Gram boyama**

İzolatların Gram boyama preparatları 7 günlük sıvı kültürlerden hazırlanmıştır. Havada kurutulan preparatlar % 2 asetik asit ile 5 dakika fiske edilerek % 0.25'lik kristal viyole boyasıyla 3 dakika, iyot çözeltisiyle 1 dakika, % 95'lik etanol ile 6 saniye ve safranin boyasıyla 30 saniye muamele edilerek boyanmışlardır. Boya içerikleri % 10 NaCl içerecek şekilde hazırlanmış ve preparatlar boyama işleminin her basamağından sonra % 10 NaCl çözeltisiyle yıkanmıştır (Dussault, 1955). Preparatlar havada kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda 100'lük immersiyon objektifinde incelenmiştir. Pembe renkli mikroorganizmalar Gram negatif [Gr(-)], mor renkli mikroorganizmalar Gram pozitif [Gr(+)] olarak tanımlanmıştır (Prescott ve ark., 2002).

### **3.2.3. Biyokimyasal testler**

#### **3.2.3.1. Oksidaz testi**

SW-25 agarda 37 °C'de 7 gün inkübe edilen kültürlerden steril öze ile alınarak % 1'lik tetrametil p-fenil diamin dihidroklorid çözeltisi emdirilen filtre kağıdına sürülmüştür. Mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Dhar ve Johnson, 1973; Tamer ve ark., 1989).

**3.2.3.2. Katalaz testi**

Kültürler SW-25 agarda 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiş ve ardından temiz bir lam yüzeyine sürülen kültürlerin üzerine % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlenen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Morello ve ark., 2003).

**3.2.3.3. İndol testi**

İzolatlar aseptik koşullarda % 1 tripton içeren SW-25 sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda her tüpe 0.5 ml Kovaks ayırıcı ilave edilmiş ve tüpün üst kısmında kırmızı halka oluşumu indol üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Morello ve ark., 2003).

**3.2.3.4. Nitrattan gaz oluşumu**

İzolatlar aseptik koşullarda % 1 KNO<sub>3</sub> ve Durham tüpü içeren SW-25 sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası Durham tüpünde gaz oluşumunun gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Karaboz, 1988; Tamer ve ark., 1989).

**3.2.3.5. Nitrattan nitrit oluşumu**

İzolatlar aseptik koşullarda % 1 KNO<sub>3</sub> içeren SW-25 sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. 5 ile 10. günler arası tüplerden alınan 1 ml örneğe 3 damla Trommsdorf ayırıcı ve 1 damla sülfirik asit (1 kısım H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 3 kısım H<sub>2</sub>O ) damlatıldığında koyu mavi-siyah renk oluşumu nitrit varlığı için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Renk oluşturmayan nitrit negatif olan tüplere 1 damla a-naftol ve 2 damla konsantre sülfirik asit damlatıldığında koyu mavi-siyah renk oluşumu nitrat varlığı için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Karaboz, 1988; Tamer ve ark., 1989).

**3.2.4. pH toleransı**

İzolatların pH toleransının belirlenmesi için SW-25 agar kullanılmış ve besiyerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pH değerlerine 1 N NaOH ve 1 N HCl ile ayarlanmıştır. İzolatlar spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişler ve koloni gelişimi dikkate alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Hezayen ve ark., 2002).

**3.2.5. Sıcaklık toleransı**

İzolatların sıcaklık toleransının belirlenmesi için spotlama yapılmış SW-25 agar besiyerleri 20, 27, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmışlardır. 7 ile 14 gün boyunca koloni gelişimleri incelenmiştir (Hezayen ve ark., 2002).

**3.2.6. Tuz toleransı**

Tuz tolerasyonunun belirlenmesi için izolatlar, tuz içermeyen, 0.4 M (SW-3), 0.7 M (SW-5), 1 M (SW-7.5), 1.3 M (SW-10), 1.5 M (SW-11.25), 1.7 M (SW-12.5), 2 M (SW-15), 2.3 M (SW-17.5), 2.5 M (SW-18.75), 2.7 M (SW-20), 3 M (SW-22.5), 3.3 M (SW-25), 4 M (SW-30) tuz ve % 0.5 maya özütü içeren besiyerlerine spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Koloni gelişiminin gözlemlendiği izolatlar pozitif, koloni gelişimi gözlenmeyen izolatlar negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Ventosa ve ark., 1998).

**3.2.7. En düşük maya özütü**

İzolatların en düşük maya özütü ihtiyacının belirlenmesi için maya özütü içermeyen, % 0.01, % 0.1 ve % 0.5 maya özütü içeren SW-25 besiyerlerine spotlamalar yapılmıştır. 37 °C'de 7 gün inkübasyondan sonra koloni gelişiminin gözlemlendiği izolatlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kahraman, 2008).

**3.2.8. Karbon kaynağı kullanımı**

Tek karbon kaynağında büyümenin incelenmesi için % 0.01 maya özütü içeren SW-25 agar kullanılmıştır. Karbon kaynakları besiyeri haricinde 0.22 µm çaplı şırınga filtre ile steril edilmiş ve son hacim %1 olacak şekilde ilave edilmiştir. İzolatların spotlamaları yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübasyonun ardından koloni gelişiminin gözlemlendiği izolatlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Montalvo-Rodriguez ve ark., 1998).

**3.2.9. Minimum Mg ihtiyacı**

En düşük Mg<sup>+2</sup> ihtiyacı için % 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 3.2 MgCl<sub>2</sub> içeren SW-25 agar besiyerlerine izolatlar spotlama yapılmış ve 37 °C'de 7 gün inkübasyondan sonra koloni gelişimleri değerlendirilmiştir. Besiyeri içeriğinde bulunan Magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>) yerine % 3.4 Sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kullanılmıştır (Montalvo-Rodriguez ve ark., 1997).

**3.2.10. Antibiyotik duyarlılık testleri**

Antibiyotik duyarlılık testleri için izolatlar SW-25 sıvı besiyerinde 37 °C'de 7 gün geliştirilmiş ve SW-25 agar içeren petrilere 100 µl ekim yapılarak yayma plaka yöntemi uygulanmıştır. 6 mm çapındaki antibiyotik diskler steril pens yardımıyla besiyeri yüzeyine dizilmiştir. 37 °C'de 7 gün inkübasyondan sonra disklerin inhibisyon zon çapları ölçülmüştür (Montalvo Rodriguez ve ark., 1998; Birbir ve Sesal, 2003; Birbir ve ark.,

2007). 8 mm ve altında zon çapına sahip olan izolatlar direçli olarak değerlendirilmiştir (Asha ve ark., 2005).

### **3.2.11. Hidrolitik enzim kapasitelerinin belirlenmesi**

#### **3.2.11.1. Nitel enzim aktivitelerinin belirlenmesi**

##### **3.2.11.1.1. Dnaz testi**

SW-25 çözeltisiyle hazırlanan DNaz agar besiyerine % 0.005 konsantrasyonunda metil yeşili ilave edilmiş ve izolatlar spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Koloni etrafında sarı zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Smith ve ark., 1969).

##### **3.2.11.1.2. Selülaz testi**

SW-25 agar besiyerine % 1 oranında selüloz eklenmiş ve izolatlar spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Koloni etrafındaki renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Yaşa ve Kılınç, 2002).

##### **3.2.11.1.3. Kazeinaz testi**

SW-25 agar ve süt tozu çözeltisi ayrı ayrı otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri son konsantrasyonu % 2 süt tozu içerecek şekilde ayarlanarak steril petrilere dökülmüştür. İzolatlar besiyerine spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında şeffaf bir proteoliz zonu oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Prescott ve ark., 2002).

##### **3.2.11.1.4. Jelatinaz testi**

% 1 jelatin içeren modifiye jelatin agar besiyeri üzerine izolatlar spotlama yapılmış ve 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri yüzeyini örtecek miktarda frazier ayıracı dökülmüştür. Koloni etrafında şeffaf bölgelerin gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Frazier, 1926; Gülhan ve ark., 2006).

##### **3.2.11.1.5. Amilaz testi**

SW-25 agar besiyerine % 1 çözünür nişasta eklenmiş ve izolatlar spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir (Coronado ve ark., 2000). İnkübasyon sonunda petriye yüzeyi örtecek miktarda iyot çözeltisi dökülmüştür. Koloni etrafında şeffaf bölgelerin gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Prescott ve ark., 2002; Kebbouche-Gana ve ark., 2009).

**3.2.11.1.6. Esteraz testi**

SW-25 agar besiyerine % 1 tween 80 eklenmiş ve izolatlar spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Koloni etrafında gözlenen şeffaf bölgeler pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Elevi ve ark., 2004; Bhatnagar ve ark., 2005; Sanchez-Porro ve ark., 2003).

**3.2.11.1.7. Lipaz testi**

Lipaz aktivitesi için izolatlar modifiye rodamin B lipaz agar içeren petrilere spotlama yapılarak 37 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere 350 nm ultra viyole (U.V) ışık altında incelenmiştir. Parlak turuncu-kırmızı renkte ışımının gözlemlendiği koloniler lipaz aktivitesi için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kouker ve Jaeger, 1987; Bhatnagar ve ark., 2005; Anonim, 2009).

Nitel enzim kapasitelerinin belirlenmesinde aktivitenin negatif, zayıf veya pozitif olarak değerlendirilmesi kolonilerin etrafında oluşan zon boyutu dikkate alınarak kaydedilmiştir.

**3.2.11.2. Nicel enzim kapasitelerinin belirlenmesi**

Nicel enzim kapasitelerinin belirlenmesi için nitel enzim taramaları sonucunda pozitif enzim aktivitesi gösteren izolatlar seçilmiştir. Seçilen izolatlar 50 ml SW-25 sıvı besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlerde 37 °C'de 150 rpm çalkalamalı inkübatörde kültüre edilmiş ve günlük örnekler alınmıştır. Besiyerlerine % 1 oranında indükleyici ajan eklenmiştir. Proteaz, kollajenaz ve keratinaz aktiviteleri için kazein, lipaz aktivitesi için zeytinyağı ve esteraz aktivitesi için tween 80 indükleyici ajan olarak kullanılmıştır. Günlük alınan örnekler 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantları enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

**3.2.11.2.1. Büyüme grafiğinin oluşturulması**

Seçilen izolatların SW-25 sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Gelişen kültürlerden günlük 1'er ml örnek alınıp +4 °C'de 10.000xg'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Her bir pellet steril 1 ml 2 M NaCl çözeltisiyle yıkanmış ve 600 nm'deki absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen veriler enzim aktivitelerinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır (Coronado ve ark., 2000).

**3.2.11.2.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü**

Proteaz aktivite tayininde % 0.6'lık Hammersten Kazein, 2M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH:7.5 substrat çözeltisi kullanılmıştır. Karadzic ve ark. (2004)'nın prosedürü modifiye

edilerek uygulanmıştır (Çizelge 22). Reaksiyon koşullarında 275 nm dalga boyunda 0.01 birimlik absorbans artışı 1 birim (U) proteaz aktivitesi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 22. Proteaz aktivitesi ölçüm yöntemi

	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
Hammersten kazein (% 0.6, 2M NaCl, 50mM Tris HCl pH:7.5)	500 µl	500 µl
Ön İnkübasyon	37 °C'de 10 dk	
Enzim	100 µl	-
İnkübasyon	37 °C'de 10 dk	
TCA Karşım	500 µl	
Enzim	-	100 µl
Son İnkübasyon	Oda sıcaklığında 20 dk	
Santrifüj	10.000 x g'de 10 dk	
Süpernatant	250 µl	
NaOH (2M)	750 µl	
Absorbans ölçümü	275 nm	

### **3.2.11.2.3. Kollajenaz aktivitesinin ölçümü**

Kollajenaz aktivite tayininde % 0.5'lik Azokoll, 2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH:7.5 substrat çözeltisi kullanılmıştır. Cheng ve ark. (2009)'nın prosedürü modifiye edilerek uygulanmıştır (Çizelge 23). Reaksiyon koşullarında 540 nm dalga boyunda 0.01 birimlik absorbans artışı 1 Birim (U) kollajenaz aktivitesi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 23. Kollajenaz aktivitesi ölçüm yöntemi

	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
Azokoll (% 0.5, 2M NaCl, 50mM Tris HCl, pH:7.5)	500 µl	500 µl
Ön İnkübasyon	37 °C'de 5 dk	
Enzim	100 µl	-
İnkübasyon	37 °C'de 30 dk	
TCA (%40)	600 µl	
Enzim	-	100 µl
Son İnkübasyon	Oda sıcaklığında 15 dk	
Santrifüj	10.000 x g'de 10dk	
Süpernatant	500 µl	
NaOH (2M)	500 µl	
Absorbans ölçümü	540 nm	

**3.2.11.2.4. Keratinaz aktivitesinin ölçümü**

Keratinaz aktivite tayininde % 0.4'lük Keratin Azur, 2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH:7.5 substrat çözeltisi kullanılmıştır. Cheng ve ark. (2009)'nın prosedürü modifiye edilerek uygulanmıştır (Çizelge 24). Reaksiyon koşullarında 590 nm dalga boyunda 0.01 birimlik absorbans artışı 1 Birim (U) keratinaz aktivitesi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 24. Keratinaz aktivitesi ölçüm yöntemi

	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
Keratin Azur (% 0.4, 2 M NaCl, 50 mM Tris HCl, pH:7.5)	500 µl	500 µl
Ön İnkübasyon	37 °C'de 10 dk	
Enzim	100 µl	-
İnkübasyon	37 °C'de 1 saat	
TCA (%40)	600 µl	
Enzim	-	100 µl
Son İnkübasyon	Oda sıcaklığında 15 dk	
Santrifüj	10.000 x g'de 10 dk	
Süpernatant	500 µl	
NaOH (2M)	500 µl	
Absorbans ölçümü	595 nm	

**3.2.11.2.5. Lipaz aktivitesinin ölçümü**

Lipaz aktivitesi için p-Nitrofenil Laurat (pNPL) hidrolizi 410 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. PNP laurat substrat çözeltisi için 10 mM pNPL 2-propanol içerisinde çözülmüştür. Tampon çözeltisi için 100 mM TrisHCl pH:7.5, % 0.5 Triton X-100, 2 M NaCl saf su içerisinde hazırlanmıştır. Lipaz aktivitesinin ölçümü için 1 ml pNP laurat substrat çözeltisi ve 9 ml tampon çözeltisi ile pNP laurat substrat karışımı elde edilerek 37 °C'de 5 dk ön ısıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin taze hazırlanmasına dikkat edilmiştir. Lipaz aktivite ölçüm yöntemi çizelge 25'de verilmiştir. Reaksiyon koşullarında dakikada 1 µmol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı 1 birim (U) lipaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Beisson ve ark., 2000; Comacho ve ark., 2009).

Çizelge 25. Lipaz aktivitesi ölçüm yöntemi

	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
pNP laurat substrat Karışımı	800 µl	800 µl
Ön İnkübasyon	37 °C'de 5 dk	
Enzim	200 µl	-
İnkübasyon	37 °C'de 10 dk	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,5 M)	500 µl	500 µl
Steril ekim yapılmamış besiyeri	-	200 µl
Santrifüj	10.000 x g'de 10dk	
Süpernatant Absorbans ölçümü	410 nm	

**3.2.11.2.6. Esteraz aktivitesinin ölçümü**

Esteraz aktivitesi için p-Nitrofenil Bütirat (pNPB) hidrolizi 410 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. PNP bütirat substrat çözeltisi için 10 mM pNPB 2-propanol içerisinde çözülmüştür. Tampon çözeltisi için 100 mM TrisHCl pH:7.5, % 0.5 Triton X-100, 2 M NaCl saf su içerisinde hazırlanmıştır. Esteraz aktivitesinin ölçümü için 1 ml pNP bütirat substrat çözeltisi ve 9 ml tampon çözeltisi ile pNP bütirat substrat karışımı elde edilerek 37 °C'de 5 dk ön ısıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin taze hazırlanmasına dikkat edilmiştir. Esteraz aktivite ölçüm yöntemi çizelge 26'da verilmiştir. Reaksiyon koşullarında dakikada 1 µmol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı 1 birim (U) esteraz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Beisson ve ark., 2000; Comacho ve ark., 2009).

Çizelge 26. Esteraz aktivitesi ölçüm yöntemi

	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
pNP bütirat substrat Karışımı	800 µl	800 µl
Ön İnkübasyon	37 °C'de 5 dk	
Enzim	200 µl	-
İnkübasyon	37 °C'de 10dk	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,5M)	500 µl	500 µl
Steril ekim yapılmamış besiyeri	-	200 µl
Santrifüj	10.000 x g'de 10dk	
Süpernatant Absorbans ölçümü	410 nm	

Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)}: \frac{\Delta A \times \text{Toplam Reaksiyon Hacmi} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Kullanılan Enzim Hacmi} \times \text{Reaksiyon Süresi (dk)}}$$

A (Absorbans): Aktivite ölçümünün yapıldığı dalga boyu her yöntemde ayrıca belirtilmiştir.

$\Delta A$  (Delta absorbans): Örnek absorbans değeri – Kör absorbans değeri

### **3.2.12. Moleküler tanımlama**

#### **3.2.12.1. DNA izolasyonu**

İzolatların genomik DNA izolasyonu için Dyall-Smith (2008)'den modifikasyonlar yapılmıştır. Bununla birlikte Geneon bakteriyel DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu için 250 ml'lik erlenlerde 50 ml SW-25 sıvı besiyerinde 37 °C'de 150 rpm'de 5 gün geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Absorbans değeri 600 nm dalga boyunda yaklaşık 1 olan örneklerden 1.5 ml alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve +4 °C'de 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerin süpernatantları atılıp buz üzerine yerleştirilen tüplere 400 µl steril soğuk ultra safsu eklenmiş ve kısa süreli karıştırılarak hücrelerin patlaması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından örnekler +4 °C'de 10.000xg'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmış ve DNA izolasyon ticari kiti talimatları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Çalışmada halofilik arke tip türü olarak *Haloferax* sp. HSC4 kullanılmıştır.

**3.2.12.2. Genomik DNA'ların kontrolü**

Elde edilen genomik DNA'ların 260 nm ( $A_{260}$ ) ve 280 nm ( $A_{280}$ ) dalga boyundaki absorpsiyon değerleri spektrofotometre ile ölçülmüştür.  $A_{260}/A_{280}$  oranıyla DNA'ların saflık dereceleri belirlenerek 1.5–1.8 değerleri arasında olanlar PZR için kullanılmıştır. Çift zincirli DNA molekülleri için  $A_{260}$  değerinin 1 olması 50 µg/ml'ye eşdeğer kabul edildiğinden “DNA(µg/ml)= $A_{260}$  x 50 x Seyreltme Faktörü” formülü ile DNA miktarı hesaplanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Miktarı ve saflığı belirlenen genomik DNA örneklerinin kontrolü için 1X TAE ile hazırlanmış % 0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Örneklerin jele yüklenmesinde ilk ve son kuyucuklar boş bırakılmış ve diğer her bir kuyucuğa sırasıyla 2.5 µl DNA örneği, 0.5 µl Syber green I ve 0.5 µl 6x jel yükleme boyası mikropipet yardımıyla karıştırılarak toplam 3.5 µl hacminde yükleme yapılmıştır. Son olarak yükleme yapılan jelin boş bırakılan kuyucuklarına 100 bp'lik marker yüklenmiş ve jel 80 V, 100 mA elektrik akımında 1 saat süresince yürütülerek görüntüleme cihazı ile kontrol edilmiştir. Kontrol sonucunda net olarak bantların gözlendiği örnekler için genomik DNA'ların bulunduğu mikrotüpler saklanmak üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

**3.2.12.3. İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için ileri primer olarak Arc7f 5'- TTC YGG TTG ATC CYG CC-3' ve geri primer olarak Arc1384r 5'- CGG TGT GTG CAA GGA GCA-3' kullanılmıştır (Leuders ve ark., 2004).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) kurulumunda Geneon marka Maximo Taq DNA Polymerase kiti kullanılmıştır. PZR protokolü çizelge 27'de verilmiştir.

DNAz ve RNAz içermeyen steril 0.2 ml PZR tüplerinde hazırlanan reaksiyonun son hacmi steril ultra saf su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Ardından tüpler kısa süreli santrifüj yapılarak thermalcycler'a yerleştirilmiştir. Reaksiyonun sıcaklık dereceleri, döngü sayıları ve sürelerini belirten Çizelge 28'deki protokol uygulanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonları Techne marka TC-5000 model thermalcycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Çizelge 27. Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü

<b>Reaksiyon İçeriği</b>	<b>İlk Konsantrasyon</b>		<b>Son Konsantrasyon</b>
PZR Tamponu (15 mM MgCl <sub>2</sub> içeren)	10 X	2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.3 µl	0.3 mM
dNTP Karışımı	40 mM	0.5 µl	0.8 mM
İleri Primer	10 µM	0.5 µl	0.2 µM
Geri Primer	10 µM	0.5 µl	0.2 µM
İzolat DNA'sı	50 ng/µl	2 µl	100 ng/25µl
Maximo Taq DNA Polimeraz	5 U/µl	0.2 µl	1 U/25µl
Steril Ultra Saf su		18.5 µl	
Reaksiyon Hacmi		25 µl	

Çizelge 28. Thermalcykler protokolü

<b>Sıcaklık</b>	94 °C	94 °C	53 °C	72 °C	72 °C	4 °C
<b>Süre</b>	5 dk	45sn	45sn	1 dk	10 dk	sonsuz
<b>Döngü Sayısı</b>	1	30			1	

#### **3.2.12.4. 16S rRNA PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü**

PZR ürünleri 1X TAE ile hazırlanmış % 1.7'lik agaroz jele 2.5 µl DNA örneği, 0.5 µl Syber green I ve 0.5 µl 6x jel yükleme boyası kullanılarak yükleme yapılmıştır. Örnekler ile karşılaştırmak için ilk kuyucuğa 5 µl Geneon marka 100 bp plus blue DNA ladder ve 1 µl Syber green I yüklenmiştir. Örnekler elektroforezde 80 V, 100 mA elektrik akımında 1 saat süresince yürütülmüştür. Elektroforez sonunda yürütülen jel, görüntüleme cihazı ile incelenmiş ve PZR ürünleri saklanmak üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

#### **3.2.12.5. 16S rRNA dizi analizi**

PZR ürünleri elektroforezde kontrol edildikten sonra Geneon Marka PZR temizleme kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PZR örneklerinin 16S rRNA dizi analizi Bioeksen firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

**BÖLÜM 4****ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Araştırma Bulguları****4.1.1. İzolatların elde edilmesi**

Çalışmamızda ülkemizde işlenmekte olan tuzla konserveleşmiş yerli ve yabancı ırk ham derilerden toplam 186 adet aşırı halofilik mikroorganizma izole edilmiştir. Tuzlanmış ham deriler temin edildikleri kaynaklar dikkate alınarak 8 örnek grubuna ayrılmış ve her bir örnek grubundan elde edilen izolatlar ayrı ayrı numaralandırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan izolatların örnek grupları, tuzlanmış ham deri kaynakları, toplam izolat sayıları ve izolat numaralarına ait bilgiler çizelge 29’da verilmiştir.

Çizelge 29. Çalışmada kullanılan izolatlara ait bilgiler

<b>Örnek Grupları</b>	<b>Tuzlanmış Ham Deri Kaynağı</b>	<b>Toplam İzolat Sayısı</b>	<b>İzolat Numaraları</b>
Yerli Irk			
1. Örnek	Niğde	59	101-166
2. Örnek	Aksaray	29	201-229
3. Örnek	Kayseri	17	301-317
4. Örnek	Gaziantep	19	401-419
Yabancı Irk			
5. Örnek	Irak	20	501-520
6. Örnek	Türkmenistan	10	601-610
7. Örnek	Kazakistan	16	701-717
8. Örnek	Ermenistan	16	801-817

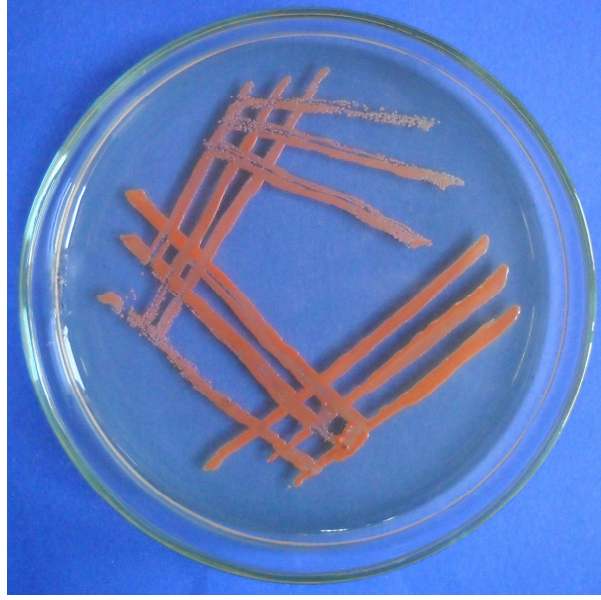
Çalışmamızda en fazla 59 izolat ile Niğde kaynaklı 1. örnekten, en düşük 10 izolat ile Türkmenistan kaynaklı 6. örnekten izolat sayıları elde edilmiştir. 2. örnekten 29, 3. örnekten 17, 4. örnekten 19, 5. örnekten 20, 7. ve 8. örneklerden 16 izolat elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılmayan izolat numaraları bulguların verilmesinde herhangi bir karışıklığa sebep olmaması için atlanmıştır.

Yapılan denemelerde mikroorganizma izolasyonu ve gelişimi için en uygun besiyerinin SW-25 olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle izolatların elde edilmesinde ve izolatlara uygulanan testlerde SW-25 besiyeri kullanılmıştır.

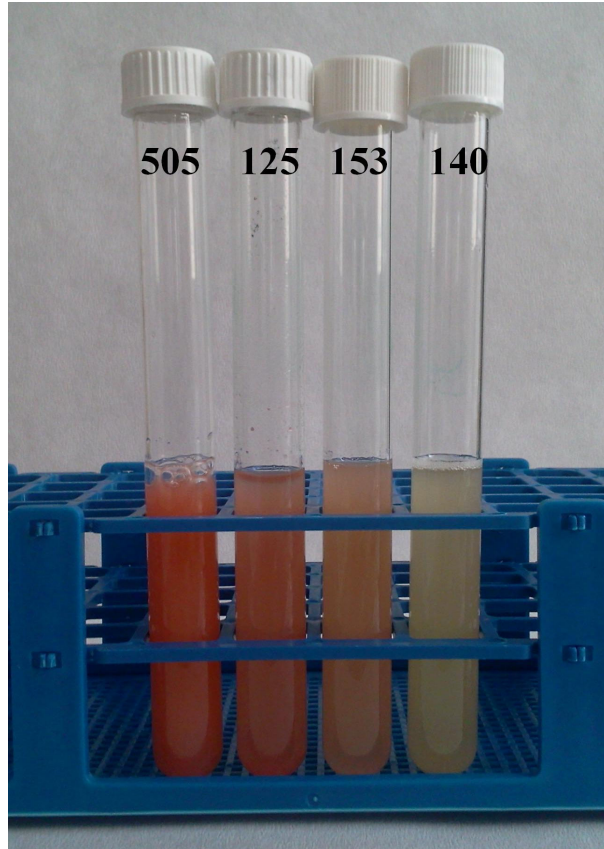
**4.1.2. İzolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri**

Araştırmamızda elde edilen izolatların açık kırmızı, kırmızı, koyu kırmızı, krem veya saydam koloni renklerine sahip oldukları gözlenmiştir. 125 numaralı izolata ait petri

görüntüsü şekil 4'te, bazı izolatlara ait sıvı kültür görüntüleri şekil 5'te verilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucu 186 izolattan 82'sinin kok, 72'sinin basil ve 32'sinin pleomorfik (değişken) morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan Gram boyama sonuçlarına göre izolatların tamamının Gram negatif [Gr(-)] özellikte olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 125 numaralı izolatın petride görüntüsü.



Şekil 5. 505, 125, 153 ve 140 numaralı izolatların sıvı kültürde görüntüsü.

### **4.1.3. İzolatların biyokimyasal özellikleri**

Çalışmamızda elde edilen 186 izolatın % 73'ünün oksidaz negatif, % 68'inin katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir. İzolatlar içerisinde triptofandan indol oluşturan 15 adet, nitrattan gaz oluşturan 10 adet ve nitratı indirgeyerek nitrit oluşturan 115 adet izolat olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların koloni renkleri, hücre morfolojileri, Gram boyamaları, tuz toleransları, pH toleransları, biyokimyasal testleri, hidrolitik enzim testleri ve tek karbon kaynağında gelişme yeteneklerine ait karakteristik bulgular 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. örnekler için sırasıyla çizelge 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 ve 37'de verilmiştir.

### **4.1.4. Büyüme gereksinimleri**

#### **4.1.4.1. En düşük maya özütü**

İzolatların tamamı maya özütü içermeyen ve % 0.01 oranında maya özütü içeren besiyerlerinde gelişim göstermemiştir. İzolatların gelişebilmesi için en düşük maya özütü konsantrasyonunun % 0.1 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgu tek karbon kaynağında büyüme testinde kullanılmıştır.

#### **4.1.4.2. En düşük Mg ihtiyacı**

İzolatların minimum magnezyum ihtiyacının belirlenmesi için 8 farklı konsantrasyonda  $MgCl_2$  içeren besiyerlerine spotlamaları yapılmıştır. İzolatların tamamının en düşük % 0,05 konsantrasyonda  $MgCl_2$  içeren besiyerinde geliştikleri tespit edilmiştir.

### **4.1.5. Sıcaklık toleransı**

Sıcaklık toleransının incelenmesinde izolatların tamamı 27 °C ile 50 °C arasında gelişim göstermekle birlikte optimum gelişimin 37 °C ve 40 °C'de olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 30. 1 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları																			
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
<b>Koloni Rengi</b>	A.K	A.K	Krm	Krm	K	K	Krm	K.K	K	K	A.K	Krm	A.K	Krm	Krm	A.K	A.K	K	A.K	A.K
<b>Morfoloji</b>	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	P	Kok	Kok	P	Basil	Basil	Basil	Basil	P	P	Basil	Kok	Kok	Basil	Basil
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	2-4	1.5-4	0.4-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	0.4-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	6-9	6-9	6-9	6-10	5-10	6-9	6-10	6-9	6-10	6-10	6-9	6-10	6-9	5-10	5-10	6-9	5-10	5-9	6-9	6-8
<b>Biyokimyasal Testler</b>																				
Oksidaz	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Katalaz	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
İndol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																				
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Setilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Amilaz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Esteraz	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Lipaz	-	Z	Z	-	-	Z	+	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																				
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D+Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sukroz	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

## Çizelge 30'un devamı

Karakteristikler	İzolat Numaraları																				
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	136	138	140	141	142	143	
<b>Koloni Rengi</b>	K	A.K	A.K	K	A.K	A.K	K	A.K	A.K	K	K	K	K	K	Krm	A.K	Krm	K	K	sıvı	A.K
<b>Morfoloji</b>	Basil	Kok	Basil	Kok	Basil	P	Basil	P	Basil	Kok	Basil	Basil	Basil	Basil	Kok	A.K	Basil	P	Kok	Kok	Kok
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1,5-4	1,5-4	1,5-4	1,5-4	1,5-4	1,5-4	2-4	1,5-4	1-4	1,5-4	1,5-4	2-4	1,5-4	2-4	1-4	1,5-4	1-4	1,5-4	1,5-4	1,5-4	1,5-4
<b>pH Toleransı</b>	6-9	6-9	6-9	6-9	5-9	6-9	6-9	6-10	6-10	5-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-10	6-10	6-10	6-10	6-10	6-10	6-10
<b>Biyokimyasal Testler</b>																					
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Katalaz	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
İndol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																					
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	z	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Lipaz	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																					
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	z
Laktoz	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	z
D+Fruktoz	-	-	-	-	z	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Sukroz	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

## Çizelge 30'un devamı

Karakteristikler	İzolat Numaraları																		
	144	145	147	149	150	151	152	153	155	156	157	158	159	161	162	163	164	165	166
<b>Koloni Rengi</b>	Krm	K	Krm	A.K	K	Krm	Krm	A.K	K	K	A.K	K	A.K	K	K	K	K	A.K	A.K
<b>Morfoloji</b>	Basil	Kok	Basil	Kok	Basil	Basil	P	Kok	Kok	Basil	P	Kok	Basil	Basil	Kok	Basil	Kok	Kok	Kok
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	2-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1-4	2.5-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	6-10	5-9	6-10	5-10	6-9	6-10	6-9	6-10	5-9	6-9	6-10	6-9	6-9	6-10	5-9	6-9	6-10	6-8	5-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>																			
Oksidaz	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Katalaz	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
İndol	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																			
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Jelatinaz	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Amilaz	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Esteraz	+	-	+	+	+	+	z	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Lipaz	+	-	-	+	z	+	-	-	-	-	-	z	z	-	-	-	-	z	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																			
D+Galaktoz	+	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	z	-	-	z	-	-
Laktoz	+	z	-	z	-	z	z	-	-	-	-	-	-	+	z	z	+	-	-
D+Fruktoz	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltoz	z	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z	-	-
Mannitol	+	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z	-	-
Sukroz	+	-	-	z	z	z	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	z	-	-
Trehaloz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 31. 2 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları														
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215
<b>Koloni Rengi</b>	K.K	A.K	K.K	S	A.K	A.K	A.K	A.K	Krm	K	A.K	A.K	Krm	Krm	A.K
<b>Morfoloji</b>	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Kok	Kok	Basil	Basil	Basil	Kok	Basil
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	6-10	5-10	6-10	6-10	5-10	5-10	5-9	5-10	5-9	5-9	5-10	5-9	5-10	6-9	5-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>															
Oksidaz	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Katalaz	+-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>															
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selülaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	-	-	-	-	-	-	+	-	z	-	+	+	+	z	-
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Esteraz	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Lipaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>															
D+Galaktoz	+	-	+	+	+	z	z	z	-	+	z	z	-	-	z
Laktoz	z	z	z	+	z	z	z	z	z	z	z	z	z	-	z
D+Fruktoz	z	-	z	+	z	-	z	z	z	z	+	z	z	-	-
Maltoz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Sukroz	z	-	z	+	z	-	-	z	-	z	z	-	-	-	z
Trehaloz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 31'in devamı

Karakteristikler	İzolat Numaraları													
	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229
<b>Koloni Rengi</b>	K	Krm	K	A.K	A.K	K	K.K	A.K	K	Krm	K	K.K	K.K	K
<b>Morfoloji</b>	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Kok	Kok	Basil	Basil	Basil	P	P	P
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	5-9	6-10	5-9	5-9	6-10	6-9	5-9	5-9	6-10	6-10	6-10	6-9	6-10	6-10
<b>Biyokimyasal Testler</b>														
Oksidaz	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Katalaz	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitritan Gaz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratın Nitrit	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<b>Hidroolitik Enzimler</b>														
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	Z	+	-	Z	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Lipaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>														
D+Galaktoz	-	-	Z	+	-	-	Z	Z	-	-	-	Z	Z	-
Laktoz	Z	-	Z	Z	-	-	Z	Z	-	-	Z	+	Z	-
D+Fruktoz	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-	-	Z	Z	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-
Sukroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	Z
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 32. 3 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları																	
	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	
<b>Koloni Rengi</b>	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	Krm
<b>Morfoloji</b>	Kok	Basil	Kok	P	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil	Kok	Basil	Kok	P	Kok	Basil	
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	2.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	5-10	6-9	5-9	5-10	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	6-9	5-9	5-10	5-10	5-10	5-9	5-10	5-10
<b>Biyokimyasal Testler</b>																		
Oksidaz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Katalaz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																		
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	+	-	-	+	-	-	-	z	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilaz	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	z	z	-	-	-
Esteraz	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Lipaz	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																		
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	z	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	+	-	+	z	z	+	+	+	z	+	-	z	-	-	-	-	-	z
D+Fruktoz	-	-	z	-	z	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	z	-	z	-	-	z	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 33. 4 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları																		
	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419
<b>Koloni Rengi</b>	A.K	A.K	A.K	Krm	A.K	A.K	K	A.K	A.K	A.K	A.K	A.K	A.K	A.K	A.K	A.K	Krm	Krm	A.K
<b>Morfoloji</b>	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil	Kok	Basil	Kok	Kok	Kok	Basil	P	Kok	Basil	Basil	Kok
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	1.5-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	1.5-4
<b>pH Toleransı</b>	6-9	5-9	5-9	5-9	6-9	5-10	5-9	5-9	5-9	5-10	6-9	5-9	5-9	6-9	6-9	5-9	5-9	6-9	5-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>																			
Oksidaz	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Katalaz	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
İndol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Nitrattan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrattan Nitrit	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																			
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selülaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	+	z	z	+	+	+	-	-	z	+	-	-	+	+	+	+	z	+	z
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Lipaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																			
D+Galaktoz	-	z	-	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Laktoz	z	+	z	z	-	-	-	-	z	z	z	z	z	-	-	z	z	-	z
D+Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	z	z	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 34. 5 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları																			
	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
<b>Koloni Rengi</b>	A.K	K	A.K	K	A.K	K	K	K.K	K	K	Krm	K	A.K	A.K	A.K	K	A.K	Krm	Krm	K.K
<b>Morfoloji</b>	Kok	Kok	Kok	Kok	P	Kok	P	P	Kok	Basil	Basil	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil	Basil	Kok	Kok	P
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	2-4	2-4	1.5-4	1.5-4	2-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2-4	1-4	2-4	2-4	1-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4
<b>pH Toleransı</b>	6-9	5-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	5-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	5-9	6-9	6-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>																				
Oksidaz	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																				
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Setülaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Jelatinaz	-	-	-	-	+	-	-	-	z	-	+	-	z	+	+	+	z	+	+	+
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Lipaz	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	z	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																				
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z	-	-	z
Laktoz	z	+	z	z	-	z	+	z	z	z	-	z	-	-	z	+	+	z	-	z
D+Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	z
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 35 .6 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları									
	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
<b>Koloni Rengi</b>	A.K	S	Krm	K	A.K	A.K	A.K	K	K	K
<b>Morfoloji</b>	P	Basil	kok saf	P	Basil	Basil	Basil	Basil	Kok	Kok
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	2-4	1.5-4	1.5-4	2-4	2-4	1-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2-4
<b>pH Toleransı</b>	6-10	6-10	6-10	6-10	6-9	6-10	6-9	5-10	5-9	5-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>										
Oksidaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
İndol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>										
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	-	-	+	-	-	-	-	-	z	z
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Lipaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>										
D+Galaktoz	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Laktöz	z	+	-	z	z	z	+	-	+	+
D+Fruktöz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	z	-	-	-	-	-	-	z	z
Trehaloz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S:

Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 36.7 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları															
	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	717
<b>Koloni Rengi</b>	Krm	Krm	K	K	K	K	K	Krm	K	Krm	Krm	K	Krm	Krm	K	Krm
<b>Morfoloji</b>	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	P	Kok	Basil	Kok	Basil	P	Kok	Kok	Kok	Kok	P
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1.5-4	1.5-4	2-4	1-4	2-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	1.5-4	2-4	1-4	2-4	1.5-4	1-4	1-4
<b>pH Toleransı</b>	5-10	5-9	5-9	5-9	5-9	6-10	5-9	6-9	5-9	5-9	6-9	5-9	6-9	6-9	5-9	5-10
<b>Biyokimyasal Testler</b>																
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Setilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilaz	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Lipaz	+	Z	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Laktoz	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
D+Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-	Z	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Sukroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

Çizelge 37. 8 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri

Karakteristikler	İzolat Numaraları															
	801	802	803	804	805	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817
<b>Koloni Rengi</b>	K	A.K	K	A.K	K	K	K	Krm	S	K	A.K	K	K	Krm	A.K	Krm
<b>Morfoloji</b>	Kok	Kok	P	P	Kok	P	P	P	Kok	Kok	Kok	Kok	P	P	P	Kok
<b>Gram Boyama</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl Toleransı (M)</b>	1-4	1.5-4	2.5-4	2-4	2-4	1.5-4	1.5-4	2-4	2-4	1.5-4	2-4	1.5-4	2-4	2-4	2-4	1-4
<b>pH Toleransı</b>	5-9	5-9	6-9	6-8	5-9	6-9	6-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	6-9	5-9	6-9	6-9
<b>Biyokimyasal Testler</b>																
Oksidaz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Nitratlan Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratlan Nitrit	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>Hidroolitik Enzimler</b>																
DNaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Setilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazeinaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-
Amilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz	-	-	-	Z	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Lipaz	-	-	-	-	-	-	Z	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>Tek karbon Kaynağı</b>																
D+Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	+	Z	Z	Z	Z	-	-	-	-
Laktoz	+	+	Z	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D+Fruktoz	-	-	-	-	Z	-	-	+	+	Z	Z	Z	-	Z	-	-
Maltoz	-	-	-	-	Z	-	-	+	+	Z	Z	Z	Z	Z	-	-
Mannitol	-	-	-	-	Z	-	-	+	+	-	-	-	-	Z	-	-
Sukroz	-	-	-	-	Z	-	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

M: Molarite, K: Kırmızı, K.K: Koyu Kırmızı, A.K: Açık Kırmızı, Krm: Krem, S: Saydam, P: Pleomorfik, +: pozitif, -: negatif, z: zayıf

**4.1.6. pH toleransı**

pH toleransı incelenmesinde 186 izolatın % 35'inin pH 6 ile pH 9, % 32'sinin pH 5 ile pH 9, % 19'unun pH 6 ile pH 10, % 12'sinin pH 5 ile pH 10 değerleri arasında geliştiği tespit edilmiştir.

**4.1.7. NaCl toleransı**

İzolatların tamamı 4 M NaCl varlığında oldukça iyi gelişim göstermiştir. Koloni gelişimi için en düşük NaCl ihtiyacı 118 izolatın (% 63) 1.5 M, 39 izolatın (% 21) 2 M, 23 izolatın (% 12) 1 M, 4 izolatın 2.5 M ve 2 izolatın 0.4 M olarak tespit edilmiştir.

**4.1.8. Karbon kaynağı kullanımı**

İzolatların tamamının tek karbon kaynağı olarak glikoz varlığında gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte zayıf gelişim gösterenler de dahil olmak üzere izolatların % 25'inin galaktoz, % 63'ünün laktoz, % 15'inin fruktoz, % 8'inin maltoz, % 7'sinin manitol, % 26'sının sukroz ve % 5'inin trehalozu tek karbon kaynağı olarak kullanabildiği tespit edilmiştir.

**4.1.9. Antibiyotik duyarlılık testi**

İzolatların tamamının basitrasin ve novobiyosin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 50 izolat (% 20) tetrasiklin, 16 izolat (% 9) kloramfenikol, 14 izolat (% 8) eritromisin, 7 izolat (% 4) amfisilin, 5 izolat (% 3) penisilin G, 2 izolat vankomisin, 1 izolat streptomisin ve 1 izolat cephotaxime antibiyotiğine karşı duyarlı bulunmuştur. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları çizelge 20'de sunulmuştur. 712 numaralı izolatın antibiyotik test görüntüsü şekil 6'da, 701 numaralı izolatın antibiyotik duyarlılık test görüntüsü şekil 38'de verilmiştir.

Çizelge 38. İzolatlara ait antibiyotik duyarlılık bulguları

İzolat Numaraları	Antibiyotik Zon Çapları (mm)									
	A 10	B 10	E 15	NV 30	P 10	S 10	T 30	VAN 30	C 30	CTX 30
<b>1. Örnek</b>										
101	D	30	D	36	D	D	18	D	D	D
102	D	28	D	50	D	D	15	D	D	D
103	D	34	13	50	22	D	D	D	D	D
104	D	30	D	54	D	D	D	D	D	D
105	D	36	D	50	D	D	19	D	D	D
106	D	30	D	42	D	D	16	D	D	D
107	D	21	D	44	D	D	17	D	D	D
108	D	36	D	34	D	D	D	D	D	D
109	D	22	D	28	D	D	D	D	D	D
110	D	26	D	16	D	D	D	D	D	D
111	D	28	D	24	D	D	16	D	D	D
112	D	36	D	40	D	D	17	D	D	D
113	D	30	D	44	D	D	13	D	D	D
114	D	30	D	52	D	D	11	D	D	D
115	D	26	D	26	D	D	D	D	D	D
116	D	22	D	34	D	D	D	D	D	D
117	D	12	D	46	D	D	D	D	D	D
118	D	50	D	22	D	D	D	D	D	D
119	D	36	D	16	D	D	15	D	D	D
120	D	30	D	35	D	D	14	D	D	D
121	D	28	D	48	D	D	17	D	D	D
122	D	28	D	50	D	D	15	D	14	D
123	D	26	D	16	D	D	D	D	D	D
124	D	44	D	14	26	D	D	D	D	D
125	D	30	D	22	D	D	12	D	D	D
126	D	24	D	44	D	D	D	D	D	D
127	D	21	9	21	D	D	D	D	D	D
128	D	20	D	29	D	D	D	D	D	D
129	D	19	D	16.5	D	D	D	D	D	D
130	D	22	10	24	D	D	D	D	D	D
131	D	42	D	36	D	D	D	D	D	D
132	D	32	D	50	D	D	15	D	D	D
133	D	30	D	33	D	D	14	D	D	D
134	D	30	D	38	D	D	D	D	D	D
136	D	22.5	D	43	D	D	10	D	D	D
138	D	27	D	50	D	D	D	D	D	D
140	D	20	D	17	D	D	D	D	D	D
141	D	20	D	27	D	D	D	D	D	D
142	D	24	D	45	D	D	D	D	D	D
143	D	24	D	19	D	D	17	D	15	D
144	D	16	D	18	22	D	11	D	13	D
145	D	56	D	50	D	D	14	D	D	D
147	D	22	D	32	D	D	10	D	D	D
149	D	21	D	55	D	D	9	D	D	D
150	D	20	D	34	D	D	D	D	D	D
151	D	20	D	51	D	D	17	D	D	D
152	D	38	D	48	D	D	D	D	D	D
153	D	40	D	30	D	D	19	D	D	D
155	D	40	D	30	D	D	D	D	D	D
156	D	30	D	30	D	D	D	D	D	D

Değerler antibiyotik disk çapı ve zon çapı birlikte ölçülerek milimetre (mm) biriminde verilmiştir.

A10: Amfisilin 10µg, B10: Basitrasin 10µg, E15: Eritromisin 15µg, NV30: Novobiosin 30µg, P10: Penisilin G 10U, S10: Streptomisin 10µg, T30: Tetrasiklin 30µg, VAN30: Vankomisin 30µg, C30: Kloramfenikol 30µg, CTX30: Cephataxime 30µg, D: Dirençli, 8mm ve daha küçük zon çaplarını ifade etmektedir.

Çizelge 38'in devamı

İzolat Numaraları	Antibiyotik Zon Çapları (mm)									
	A 10	B 10	E 15	NV 30	P 10	S 10	T 30	VAN 30	C 30	CTX 30
<b>1. Örnek</b>										
157	D	20	D	23	D	D	D	D	D	D
158	D	34	D	33	D	D	9	D	D	D
159	D	25	D	21	D	D	10	D	D	D
161	D	34	11	50	D	D	D	D	D	D
162	D	38	D	40	D	D	D	D	D	D
163	D	34	D	38	D	D	D	D	D	D
164	D	50	D	50	20	D	D	D	D	D
165	D	20	D	30	D	D	D	D	12	D
166	D	48	D	34	D	D	D	D	D	D
<b>2. Örnek</b>										
201	D	24	D	16	D	D	D	D	D	D
202	12	50	14	50	18	D	9	D	D	D
203	D	24	D	26	D	D	18	D	14	D
204	9	40	7	28	D	D	22	D	20	D
205	D	26	D	58	D	D	15	D	20	D
206	D	50	D	20	D	D	D	D	D	D
207	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
208	D	30	D	20	D	D	D	D	13	D
209	D	54	D	24	D	D	D	D	D	D
210	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
211	11	34	D	38	D	D	D	D	D	D
212	D	60	D	40	D	D	D	D	D	D
213	D	34	D	43	D	D	16	D	19	D
214	D	60	D	40	D	D	D	D	D	D
215	D	40	D	34	D	D	D	D	D	D
216	D	56	D	50	D	D	D	D	D	D
217	D	50	9	50	D	D	12	D	D	D
218	D	36	D	24	D	D	D	D	D	D
219	D	60	D	50	D	D	D	D	D	D
220	D	17	D	24	D	D	16	D	D	D
221	D	19	D	34	D	D	14	D	D	D
222	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
223	D	58	D	50	D	D	D	D	D	D
224	D	57	10	50	D	D	28	D	D	D
225	D	48	9	48	D	D	11	D	D	D
226	D	25	D	30	D	D	14	D	D	D
227	D	25	D	25	D	D	D	D	D	D
228	D	28	D	30	D	D	D	D	D	D
229	D	34	D	30	D	D	24	D	D	D
<b>3. Örnek</b>										
301	D	19	D	43	D	D	D	D	D	D
302	D	33	D	36	D	D	D	D	D	D
303	D	48	D	60	D	D	D	D	D	D
304	D	23	D	45	D	D	D	D	D	D
305	D	20	D	39	D	D	D	D	D	D
306	D	52	D	50	D	D	D	D	D	D
307	D	51	D	56	D	D	D	D	D	D
308	D	49	D	50	D	D	D	D	D	D
309	D	50	D	52	D	10	D	D	D	D
310	D	49	D	60	D	D	D	D	D	D

Değerler antibiyotik disk çapı ve zon çapı birlikte ölçülerek milimetre (mm) biriminde verilmiştir.

A10: Amfisisilin 10µg, B10: Basitrasin 10µg, E15: Eritromisin 15µg, NV30: Novobiosin 30µg, P10: Penisilin G 10U, S10: Streptomisin 10µg, T30: Tetrasiklin 30µg, VAN30: Vankomisin 30µg, C30: Kloramfenikol 30µg, CTX30: Cephotaxime 30µg, D: Dirençli, 8mm ve daha küçük zon çaplarını ifade etmektedir.

Çizelge 38'in devamı

İzolat Numaraları	Antibiyotik Zon Çapları (mm)									
	A 10	B 10	E 15	NV 30	P 10	S 10	T 30	VAN 30	C 30	CTX 30
<b>3. Örnek</b>										
311	D	35	D	40	D	D	D	D	D	D
312	D	52	D	58	D	D	D	D	D	D
313	D	20	D	34	D	D	9	D	D	D
314	D	24	D	50	D	D	13	D	D	D
315	D	16	D	48	D	D	D	D	D	D
316	D	50	D	52	D	D	D	D	D	D
317	D	23	D	44	D	D	D	D	D	D
<b>4. Örnek</b>										
401	D	24	D	30	D	D	D	D	D	D
402	D	56	D	55	D	D	D	16	D	D
403	D	52	D	67	D	D	D	D	D	D
404	D	21	D	42	D	D	11	D	D	D
405	D	20	D	19	D	D	D	D	D	D
406	D	35	D	53	D	D	D	D	D	D
407	D	48	D	46	D	D	D	D	D	D
408	D	56	D	56	D	D	D	D	D	D
409	D	64	D	43	D	D	D	D	D	D
410	D	70	D	65	D	D	D	18	D	D
411	D	31	D	50	D	D	D	D	D	D
412	D	56	D	70	D	18	D	D	D	D
413	D	48	D	66	D	D	D	D	D	D
414	D	60	D	60	D	D	D	D	D	D
415	D	50	12	50	D	D	10	D	D	D
416	D	56	D	40	D	D	D	D	D	D
417	D	60	D	54	D	D	D	D	D	D
418	D	23	9	48	D	D	14	D	12	12
419	D	49	D	52	D	D	D	D	D	D
<b>5. Örnek</b>										
501	D	48	D	50	D	D	D	D	D	D
502	D	40	D	50	D	D	D	D	D	D
503	D	22	D	30	D	D	D	D	D	D
504	D	48	D	56	D	D	D	D	D	D
505	D	36	D	50	D	D	D	D	D	D
506	D	48	D	56	D	D	D	D	D	D
507	D	20	D	32	D	D	D	D	D	D
508	D	40	D	50	D	D	D	D	D	D
509	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
510	D	50	D	56	D	D	D	D	D	D
511	D	60	D	60	D	D	D	D	D	D
512	D	23	D	36	D	D	D	D	D	D
513	D	50	D	36	D	D	D	D	D	D
514	D	50	D	30	D	D	D	D	D	D
515	D	54	D	50	D	D	D	D	D	D
516	9	22	9	50	D	D	D	D	9	D
517	D	52	D	50	D	D	D	D	D	D
518	D	60	D	70	D	D	D	D	D	D
519	D	23	9	40	D	D	D	D	D	D
520	D	25	D	50	D	D	D	D	D	D

Değerler antibiyotik disk çapı ve zon çapı birlikte ölçülerek milimetre (mm) biriminde verilmiştir.

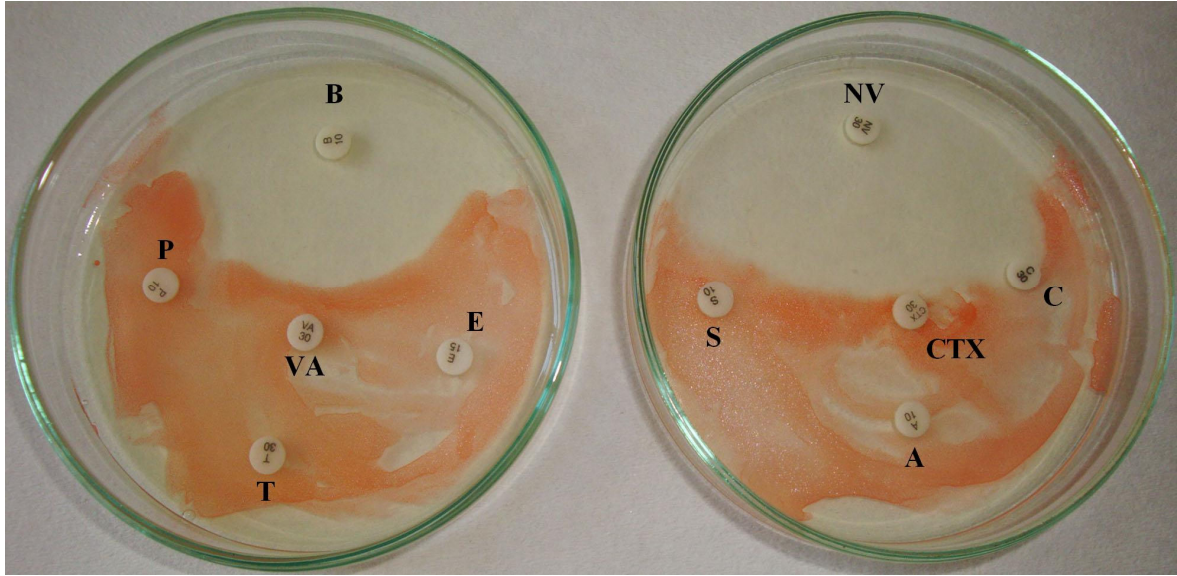
A10: Amfisilin 10µg, B10: Basitrasin 10µg, E15: Eritromisin 15µg, NV30: Novobiosin 30µg, P10: Penisilin G 10U, S10: Streptomisin 10µg, T30: Tetrasiklin 30µg, VAN30: Vankomisin 30µg, C30: Kloramfenikol 30µg, CTX30: Cephotaxime 30µg, D: Dirençli, 8mm ve daha küçük zon çaplarını ifade etmektedir.

Çizelge 38'in devamı

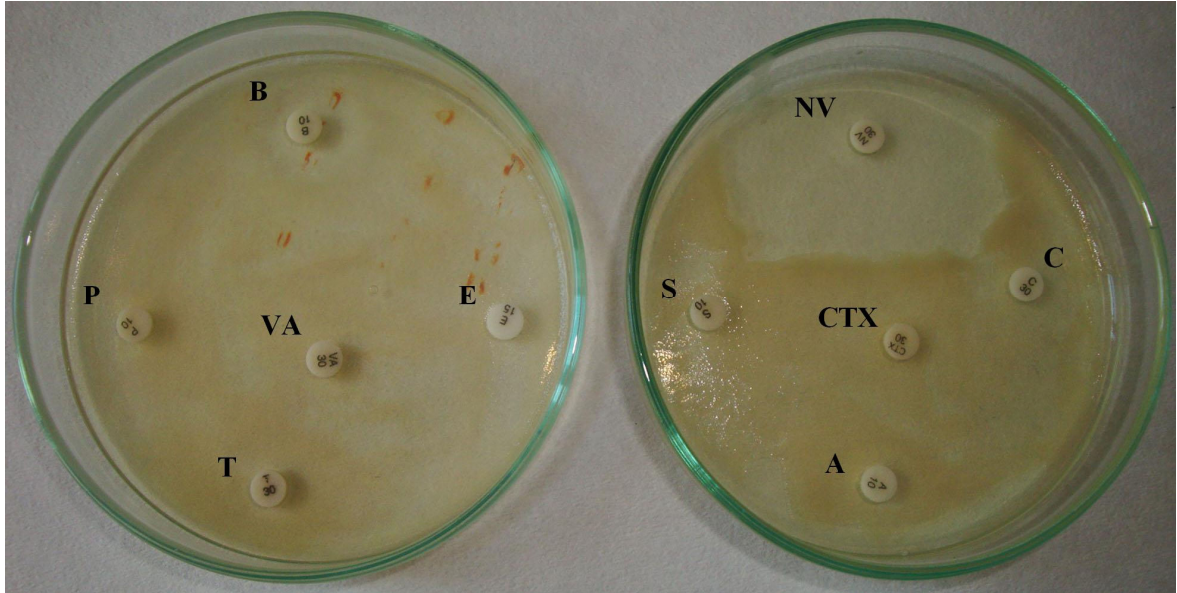
İzolat Numaraları	Antibiyotik Zon Çapları (mm)									
	A 10	B 10	E 15	NV 30	P 10	S 10	T 30	VAN 30	C 30	CTX 30
<b>6. Örnek</b>										
601	D	36	D	50	D	D	D	D	D	D
602	D	35	D	70	D	D	D	D	26	D
603	9	25	D	49	D	D	10	D	D	D
604	D	34	D	50	D	D	D	D	D	D
605	D	32	D	48	D	D	D	D	D	D
606	D	33	D	52	D	D	D	D	D	D
607	D	32	D	60	D	D	D	D	D	D
608	D	42	D	50	D	D	D	D	D	D
609	10	57	D	60	D	D	D	D	D	D
610	D	53	D	60	D	D	D	D	D	D
<b>7. Örnek</b>										
701	D	17	D	40	D	D	D	D	D	D
702	D	22	D	47	D	D	D	D	D	D
703	D	54	D	60	D	D	D	D	D	D
704	D	47	D	60	D	D	D	D	D	D
705	D	28	D	50	D	D	10	D	D	D
706	D	24	D	56	D	D	D	D	D	D
707	D	54	D	54	D	D	9	D	D	D
708	D	46	D	52	D	D	D	D	D	D
709	D	46	D	58	D	D	D	D	D	D
710	D	56	D	50	D	D	D	D	D	D
711	D	23	D	44	D	D	D	D	D	D
712	D	52	D	60	D	D	D	D	D	D
713	D	27	D	60	D	D	D	D	D	D
714	D	50	D	60	D	D	D	D	D	D
715	D	33	D	54	D	D	D	D	D	D
717	D	24	D	40	D	D	D	D	D	D
<b>8. Örnek</b>										
801	D	57	D	55	D	D	D	D	D	D
802	D	50	D	58	D	D	D	D	D	D
803	D	34	D	50	D	D	D	D	16	D
804	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
805	D	50	D	60	D	D	D	D	D	D
807	D	30	D	40	D	D	D	D	D	D
808	10	24	12	40	D	D	14	D	10	D
809	D	24	D	50	D	D	D	D	D	D
810	D	50	D	52	D	D	12	D	20	D
811	D	50	D	50	D	D	D	D	D	D
812	D	50	D	60	D	D	D	D	D	D
813	D	50	D	60	D	D	D	D	D	D
814	D	30	D	42	D	D	D	D	D	D
815	D	30	D	60	D	D	D	D	20	D
816	D	40	D	40	D	D	10	D	12	D
817	D	40	D	46	D	D	D	D	D	D

Değerler antibiyotik disk çapı ve zon çapı birlikte ölçülerek milimetre (mm) biriminde verilmiştir.

A10: Amfisilin 10µg, B10: Basitrasin 10µg, E15: Eritromisin 15µg, NV30: Novobiosin 30µg, P10: Penisilin G 10U, S10: Streptomisin 10µg, T30: Tetrasiklin 30µg, VAN30: Vankomisin 30µg, C30: Kloramfenikol 30µg, CTX30: Cephotaxime 30µg, D: Dirençli, 8mm ve daha küçük zon çaplarını ifade etmektedir.



Şekil 6. 712 numaralı izolatın antibiyotik duyarlılık test görüntüsü.



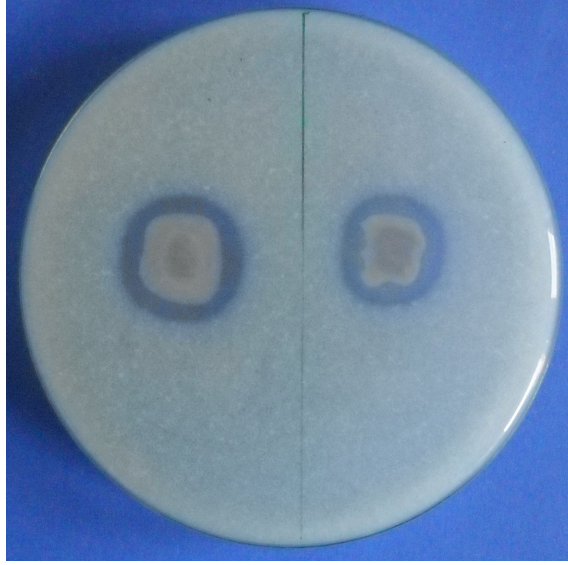
Şekil 7. 701 numaralı izolatın antibiyotik duyarlılık test görüntüsü.

#### 4.1.10. Hidrolitik enzim aktivitelerinin nitel bulguları

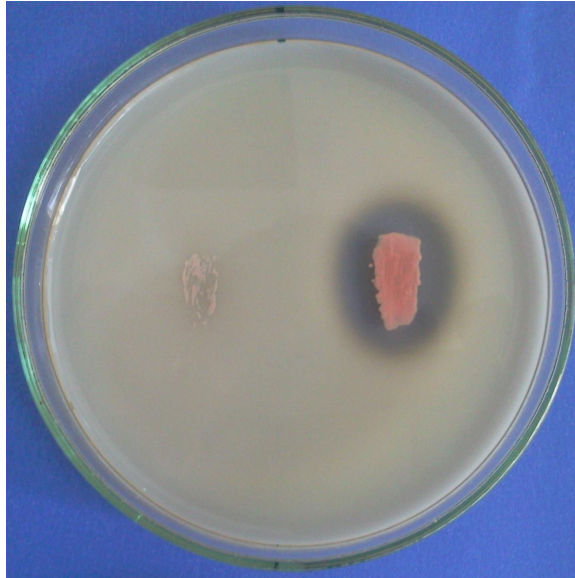
Çalışmamızda gerçekleştirilen nitel enzim taramalarında izolatların tamamının pozitif DNAz aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte hiçbir izolatın selüloz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen 186 izolattan 23 izolatın (% 12) kazeinolitik, 106 izolatın (% 57) jelatinolitik, 21 izolatın (% 11) amilolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. 107 ve 129 numaralı izolatlara ait kazeinaz test görüntüleri şekil 8’de, 153 ve 511 numaralı izolatlara ait jelatinaz test görüntüleri şekil 9’da, 140 ve 142 numaralı izolatlara ait amilaz test görüntüleri şekil 10’da verilmiştir.

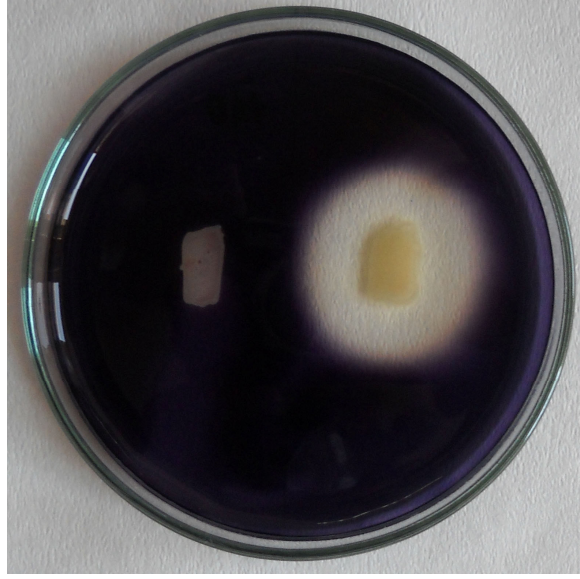
Çalışmamızda kullanılan izolatların esteraz ve lipaz aktivitelerinin nitel olarak incelenmesi sonucunda 65 izolatın (% 35) esteraz pozitif, 33 izolatın (% 18) lipaz pozitif olduğu tespit edilmiştir. 123, 140 ve 701 numaralı izolatlara ait esteraz aktivitesi test görüntüleri şekil 11’de, 107 ve 714 numaralı izolatların rhodamin B lipaz agarda 360 nm U.V. lambası altında çekilmiş fotoğrafları şekil 12’de verilmiştir.



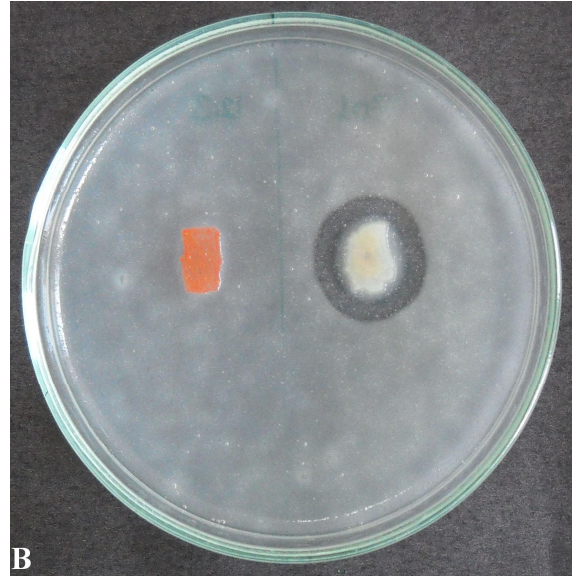
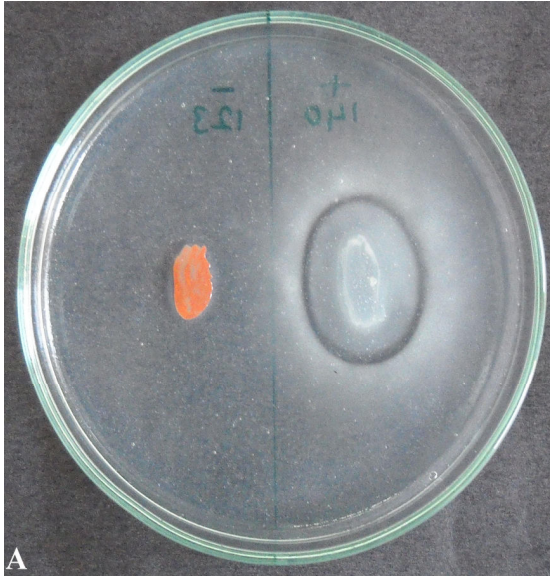
Şekil 8. Solda 107 numaralı ve sağda 129 numaralı izolatların kazeinaz test görüntüsü.



Şekil 9. Solda 153 numaralı ve sağda 511 numaralı izolatların jelatinaz test görüntüsü.

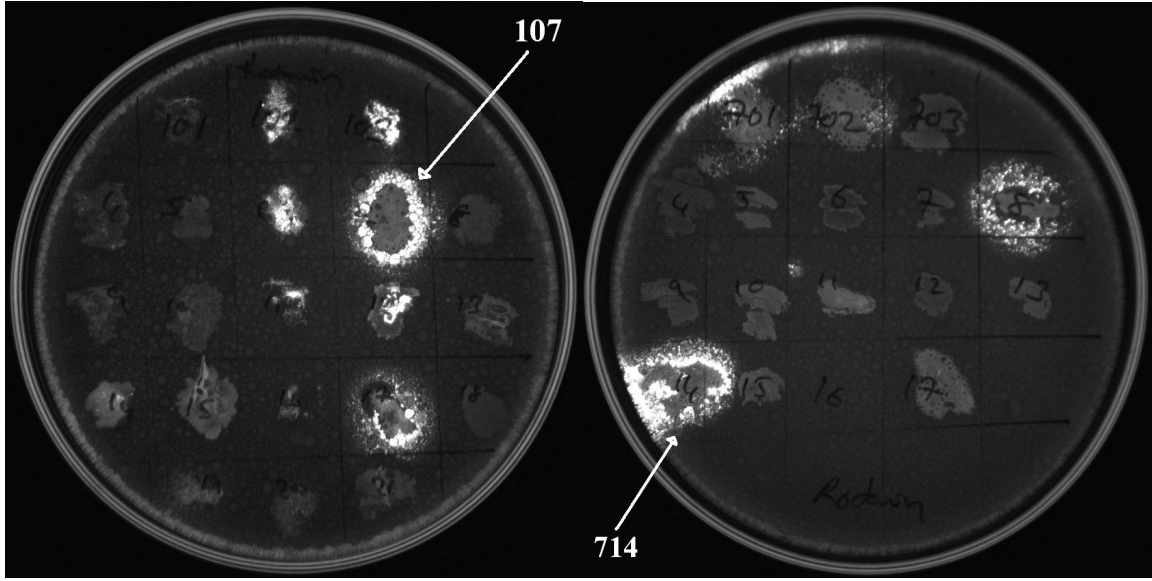


Şekil 10. Solda 140 numaralı ve sağda 142 numaralı izolatların amilaz test görüntüsü.



A: 123 (sol) ve 140 (sağ) numaralı izolatların, B: 123 (sol) ve 701 (sağ) numaralı izolatların esteraz test görüntüleri

Şekil 11. Esteraz aktivitesi test görüntüleri.



Şekil 12. 107 ve 714 numaralı izolatların rhodamin B lipaz agarda 360 nm U.V lambası altındaki görüntüleri.

#### 4.1.11. Hidrolitik enzim aktivitesinin nicel bulguları

Nitel enzim taramalarından yararlanılarak hidrolitik enzim aktivitesine sahip 24 izolat seçilmiştir. Bunlar içerisinde 21 proteolitik izolatın proteaz aktivitesi nicel olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler arasında yüksek proteaz aktivitesi gösteren 10 izolatın keratinaz ve kollajenaz aktivite nicel olarak belirlenmiştir. Ayrıca 24 izolat içerisinde seçilen 10 izolatın esteraz ve lipaz aktivite nicel olarak ölçülmüştür.

Aktivite ölçümleri izolat gelişiminin 1, 3, 5, 7, 9 ve 11. günlerinde gerçekleştirilmiş ve ölçüm yapılan her izolat için büyüme eğrileri çıkarılarak aktivite bulgularıyla karşılaştırılmıştır.

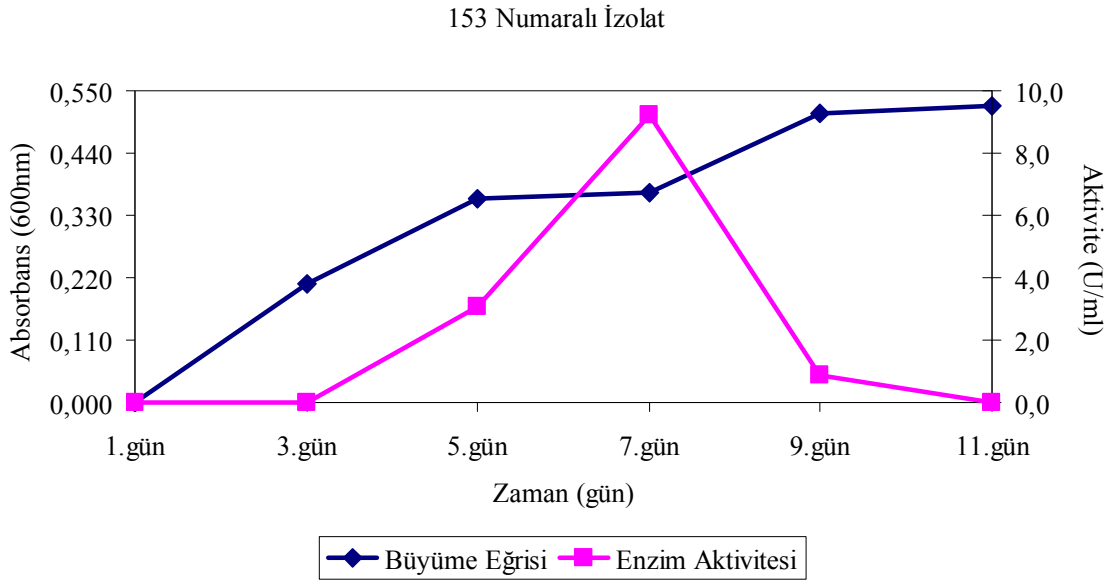
##### 4.1.11.1. Proteaz aktivite ölçümü

Proteaz nicel aktivite ölçümünde substrat olarak kazein (hammersten) kullanılmıştır. Yöntemde belirtilen reaksiyon koşullarında 150 ve 153 numaralı izolatların 9.2 U/ml ile en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların çoğunluğu gelişimlerinin logaritmik fazını kapsayan 3, 5 ve 7. günlerinde enzim aktivitesi göstermiştir.

Günlere göre proteaz aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 39'da, 153 numaralı izolatın büyüme eğrisiyle birlikte proteaz aktivitesinin günlük değişim grafiği şekil 13'de verilmiştir.

Çizelge 39. Proteaz aktivitesi ölçüm bulguları

İzolat Numaraları	Günler ve Kazeinaz Aktiviteleri (U/ml)					
	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
102	0	0.9	1.8	0.9	0	0
103	0	0.4	3.1	0	0	0
107	0	4.8	0.4	0	0	0
111	0	4.8	2.2	1.8	0	0
112	0	0	1.3	7.0	0	0
114	0	0.4	0.9	4.8	0	0
116	0	0.4	4.4	1.8	0	0
123	0	8.8	4.0	4.8	0	0
125	0	0	7.0	8.4	1.8	0
126	0	0.4	4.4	0.4	0	0
129	0	1.3	0.4	0.4	0	0
149	0	4.0	4.0	6.2	0	0
150	0	2.2	9.2	7.9	1.8	0
151	0	7.5	3.1	1.8	0	0
153	0	0	3.1	9.2	0.9	0
165	0	0.4	3.5	1.3	0	0
221	0	1.3	0.9	0.0	0	0
505	0	6.2	8.8	7.9	0	0
511	0	8.4	4.4	0.9	0	0
514	0	2.2	3.1	7.0	0	0
519	0	5.7	2.2	0	0	0



Şekil 13. 153 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesinin günlük değişimi.

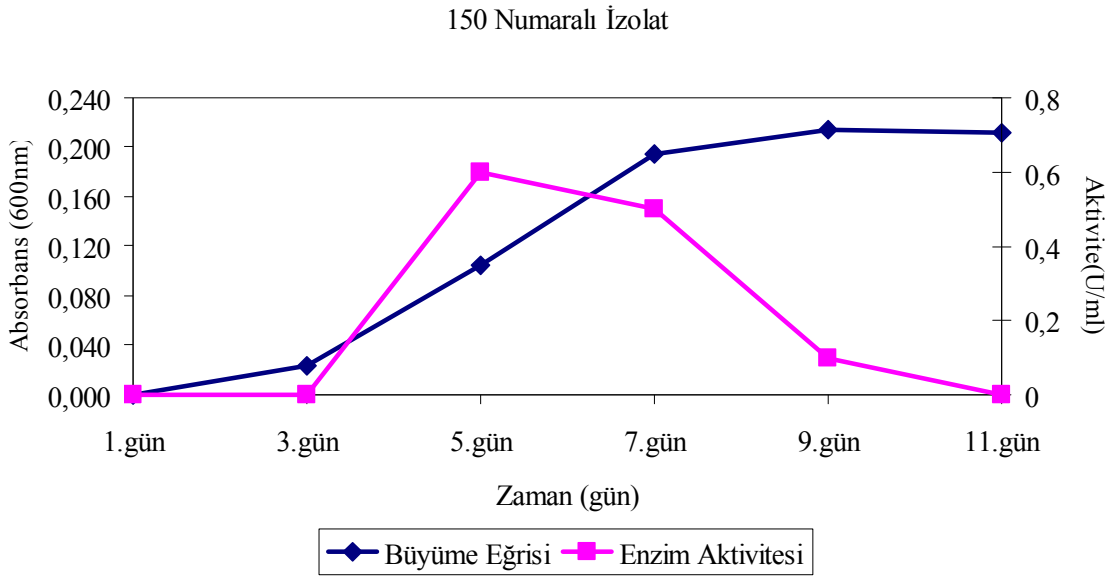
#### 4.1.11.2. Keratinaz aktivite ölçümü

Keratinaz nicel aktivite ölçümünde substrat olarak keratin azur kullanılmıştır. En yüksek keratinaz aktivitesi 150 numaralı izolat tarafından 5. günde 0.6 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Günlere göre keratinaz aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 40'da, 150 numaralı izolatin büyüme eğrisiyle birlikte keratinaz aktivitesinin günlük değişim grafiği şekil 14'de verilmiştir.

Çizelge 40. Keratinaz aktivitesi ölçüm bulguları

Günler	İzolat Numaraları ve Keratinaz Aktiviteleri (U/ml)									
	107	114	116	125	149	150	151	153	505	514
1.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.gün	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0
5.gün	0.1	0	0.2	0	0.1	0.6	0.3	0.5	0.1	0
7.gün	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.4	0.2	0.1
9.gün	0	0	0	0	0	0.1	0	0.6	0	0
11.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 14. 150 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve keratinaz aktivitesinin günlük değişimi.

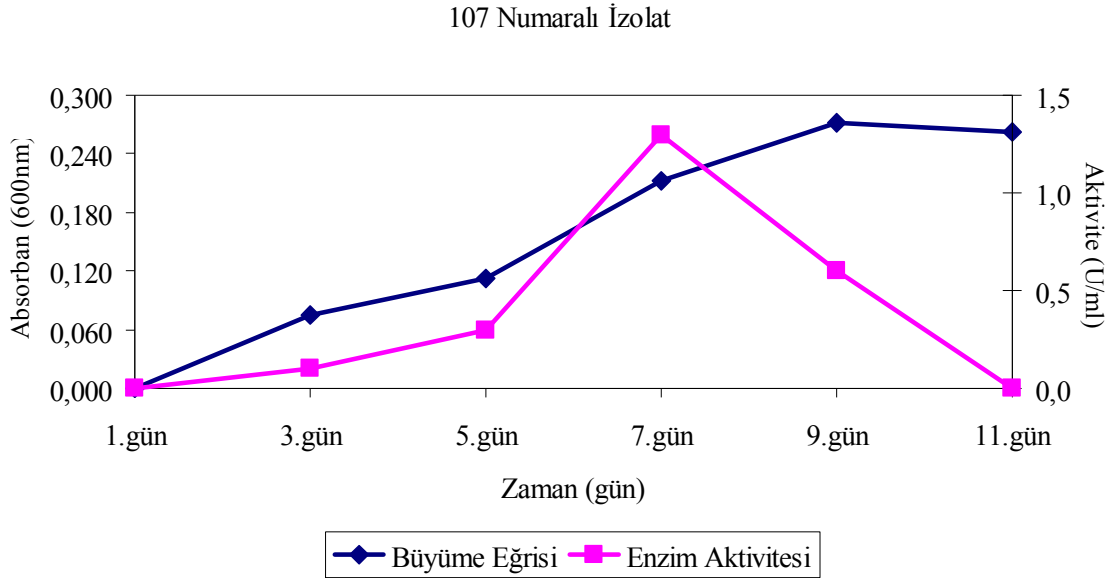
#### 4.1.11.3. Kollajenaz aktivite ölçümü

Substrat olarak azocoll kullanılan kollajenaz aktivitesi ölçümünde en yüksek aktivite izolat gelişimlerinin 7. gününde gözlenmiş olup 150 numaralı izolatin 1.7 U/ml ve 107 numaralı izolatin 1.3 U/ml aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Günlere göre kollajenaz

aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 41’de, 107 numaralı izolatin büyüme eğrisiyle birlikte kollajenaz aktivitesinin günlük değişim grafiği şekil 15’de verilmiştir.

Çizelge 41. Kollajenaz aktivitesi ölçüm bulguları

Günler	İzolat Numaraları ve Kollajenaz Aktiviteleri (U/ml)									
	107	114	116	125	149	150	151	153	505	514
1.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.gün	0.1	0.4	0.1	0.1	0	0.3	0.3	0.2	0.5	0
5.gün	0.3	0.3	0.5	0.2	0.2	0.4	0.2	1.2	0.3	0.4
7.gün	1.3	0	1.2	0.8	0.2	1.7	0.9	0.1	0.9	0.7
9.gün	0.6	0	0	0	0.1	0.3	0	0	0	0.2
11.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



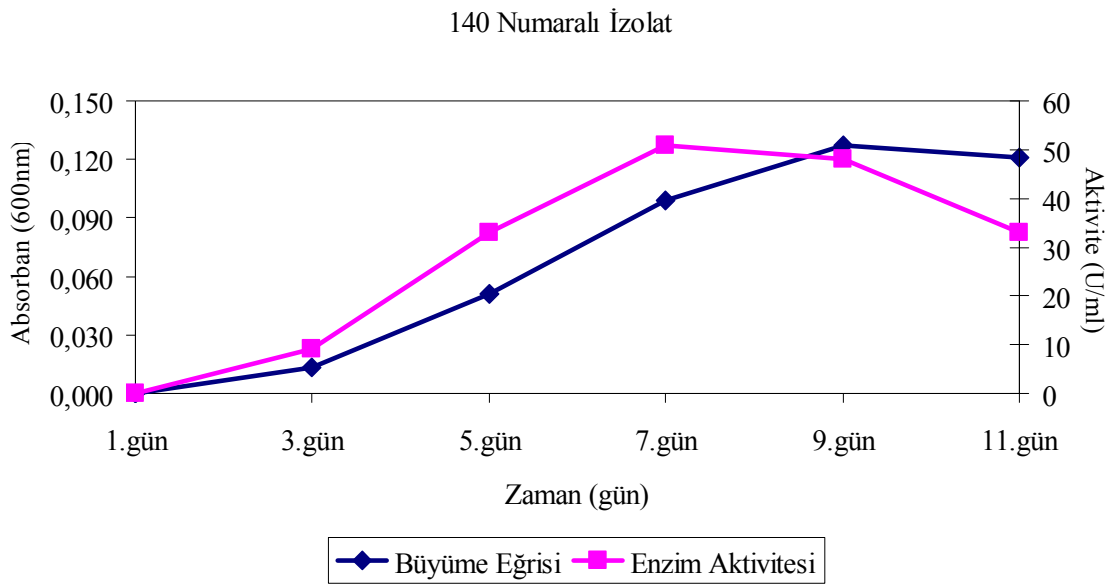
Şekil 15. 107 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve kollajenaz aktivitesinin günlük değişimi.

#### 4.1.11.4. Esteraz aktivite ölçümü

Substrat olarak para nitro fenil butirat (pNPB) kullanılan esteraz aktivitesi ölçümlerinde izolatlar arasında en yüksek esteraz aktivitesini 140 numaralı izolatin gösterdiği tespit edilmiştir. 140 numaralı izolatin 7. gün 51 U/ml ve 9. gün 48 U/ml aktivite gösterdiği bulunmuştur. Günlere göre esteraz aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 42’de, 140 numaralı izolatin büyüme eğrisiyle birlikte esteraz aktivitesinin günlük değişim grafiği şekil 16’da verilmiştir.

Çizelge 42. Esteraz aktivitesi ölçüm bulguları

Günler	İzolat Numaraları ve Esteraz Aktiviteleri (U/ml)									
	107	129	140	144	149	150	151	505	514	516
1.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.gün	1.5	0	9	4.5	1.5	0	0	1.5	4.5	0
5.gün	3	1.5	33	28.5	6	1.5	1.5	10.5	3	1.5
7.gün	1.5	1.5	51	28.5	10.5	3	4.5	6	6	3
9.gün	0	0	48	3	9	3	4.5	4.5	0	0
11.gün	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 16. 140 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve esteraz aktivitesinin günlük değişimi.

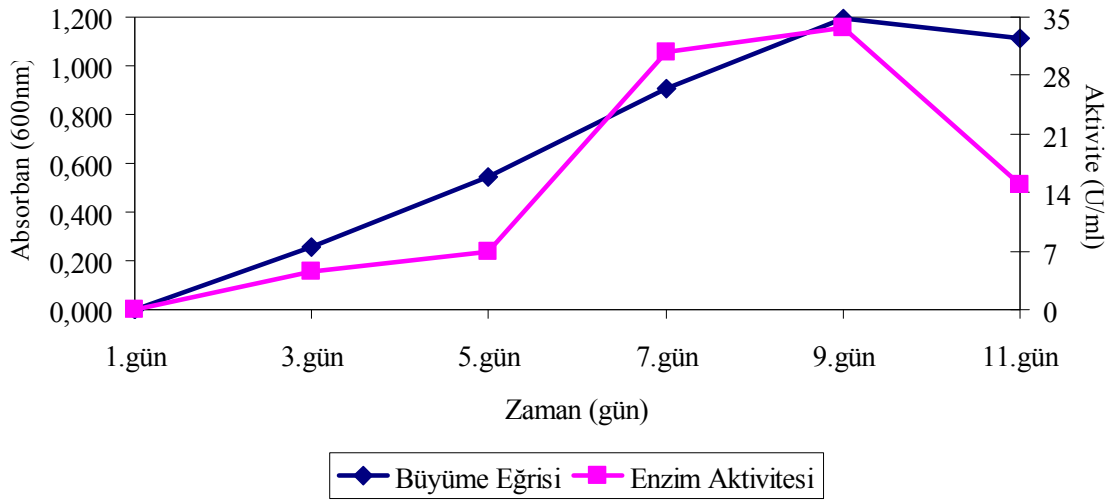
#### 4.1.11.5. Lipaz aktivite ölçümü

Lipaz aktivitesi ölçümünde substrat olarak para nitro fenil laurat (pNPL) kullanılmıştır. Lipaz aktivitesi ölçülen izolatlar arasında en yüksek aktivite 505 numaralı izolatın 9. gününde 33.8 U/ml aktivite olarak tespit edilmiştir. Günlere göre lipaz aktivitesi ölçüm bulguları çizelge 43'de, 505 numaralı izolatın büyüme eğrisiyle birlikte lipaz aktivitesinin günlük değişim grafiği şekil 17'de verilmiştir.

Çizelge 43. Lipaz aktivitesi ölçüm bulguları

Günler	İzolat Numaraları ve Lipaz Aktiviteleri (U/ml)									
	107	129	140	144	149	150	151	505	514	516
1.gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.gün	0.8	0.8	0	0	0	2.8	4.6	4.5	7.9	0.4
5.gün	1.5	2.6	12.1	1.4	11.4	15.4	7.5	7	9.1	3.8
7.gün	6.8	6	15.8	12.5	20.7	6.5	5.5	30.8	5	7.1
9.gün	3.8	5.6	22.7	11.6	29.4	0	0	33.8	0	4.1
11.gün	2.3	3	10	3.2	21.8	0	0	15	0	1.1

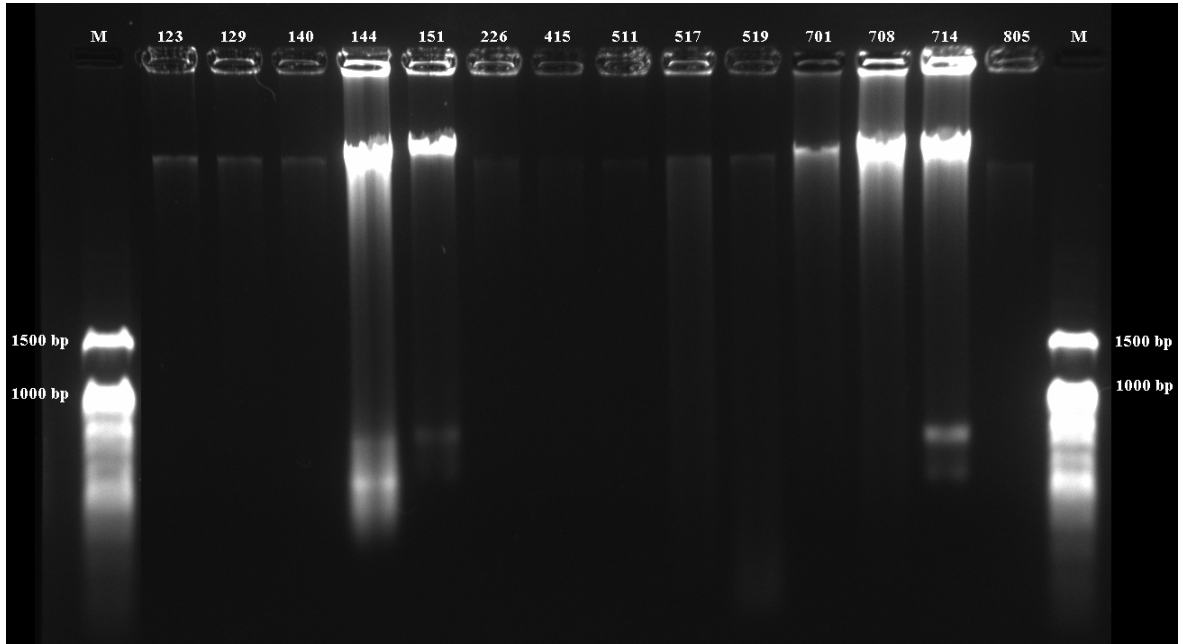
505 Numaralı İzolat



Şekil 17. 505 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve lipaz aktivitesinin günlük değişimi.

#### 4.1.12. Moleküler tanımlama bulguları

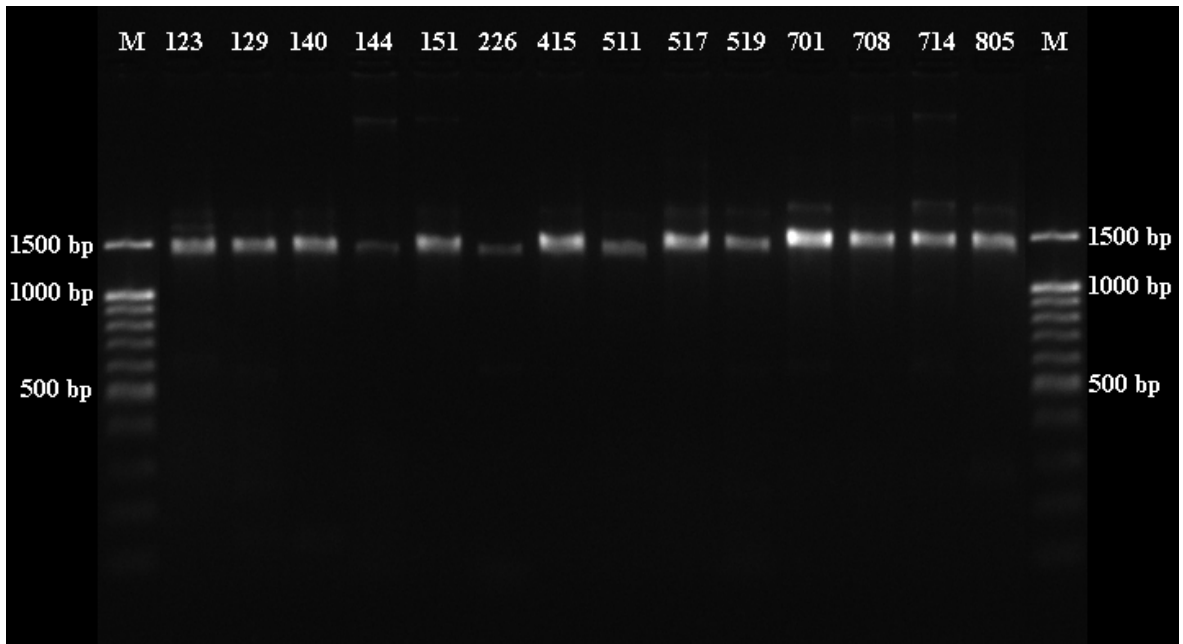
Çalışmamızda nitel ve nicel enzim aktivite ölçümlerinden elde ettiğimiz bulgulara göre seçilen 34 izolat 16S ribozomal RNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi izolatlardan DNA izolasyonu yapılarak % 0.8'lik agaroz jelde saflık kontrolleri yapılmış ve jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilmiştir. 14 farklı izolata ait agaroz jel görüntüleri şekil 18'de verilmiştir.



M: Marker (Geneone 100bp plus)

Şekil 18. Bazı izolatlara ait DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.

DNA izolatları saflık kontrolü yapıldıktan sonra materyal ve yöntemde belirtilen prosedürlere göre PZR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri kontrol için % 1.7'lik agaroz jelde 100 baz çiftlik marker kullanılarak yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilmiştir. 14 farklı izolata ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü şekil 19'da verilmiştir.



M: Marker (Geneone 100bp plus)

Şekil 19. Bazı izolatlara ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

PZR ürünleri geneon marka PZR temizleme kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Dizi analizi Bioeksen firmasından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Dizi analizlerine ait kromatogramlar Chromas isimli programla kontrol edilmiş ve temizlenmiştir. İleri ve geri primerler NCBI (National Center of Biotechnology Information) internet sitesinde align edildikten sonra ortak bölgeler çıkartılarak baz sayısı 1268 ile 1293 arasında değişen 16S rRNA bölgeleri elde edilmiştir. İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgeleri ekler bölümünde yer almaktadır. Bu bölgeler <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> internet adresindeki nükleotit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) seçeneğine göre analiz edilerek Gen Bankasında var olan 16S rRNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda tanımlanan 34 izolattan elde edilen bulgulara göre 16 izolatın filogenetik olarak farklı türlere benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Çalışmamızda 16S rRNA dizi analizine göre tanımlanan 34 izolatın gen bankasında var olan 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırma bulguları çizelge 44'de verilmiştir. Tanımlanan izolatlar ile filogenetik olarak benzer buldukları türler arasındaki akrabalığı ortaya koymak için <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> internet adresindeki çoklu sekans hizalayıcı program kullanılarak izolat ve benzer türlere ait 16S rRNA gen dizileri hizalanmıştır. Elde edilen veriler ile Mega 5 bilgisayar programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışmamızda tanımlanan izolatların karşılaştırmalı filogenetik ağacı şekil 20'de verilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken benzer türlere ek olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 ve *Halobacterium salinarum* DSM 3754T tip türlerine ait 16S rRNA gen bölgeleri de kullanılmıştır (Şekil 20).

Bununla birlikte tanımlanan izolatların izole edildikleri deri örneklerine göre dağılımı çizelge 45'de verilmiştir. İzolatların izole edildikleri deri örneklerine göre dağılımı incelendiğinde 8 deri örneğinden 6'sında *Natrialba aegyptia* 40 türü, 5'inde ise *Halococcus thailandensis* türü tespit edilmiştir ve böylece bu aşırı halofilik arkelerin deri örneklerinde yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 44. Çalışmamızda tanımlanan izolatlarla ait BLAST analiz bulguları

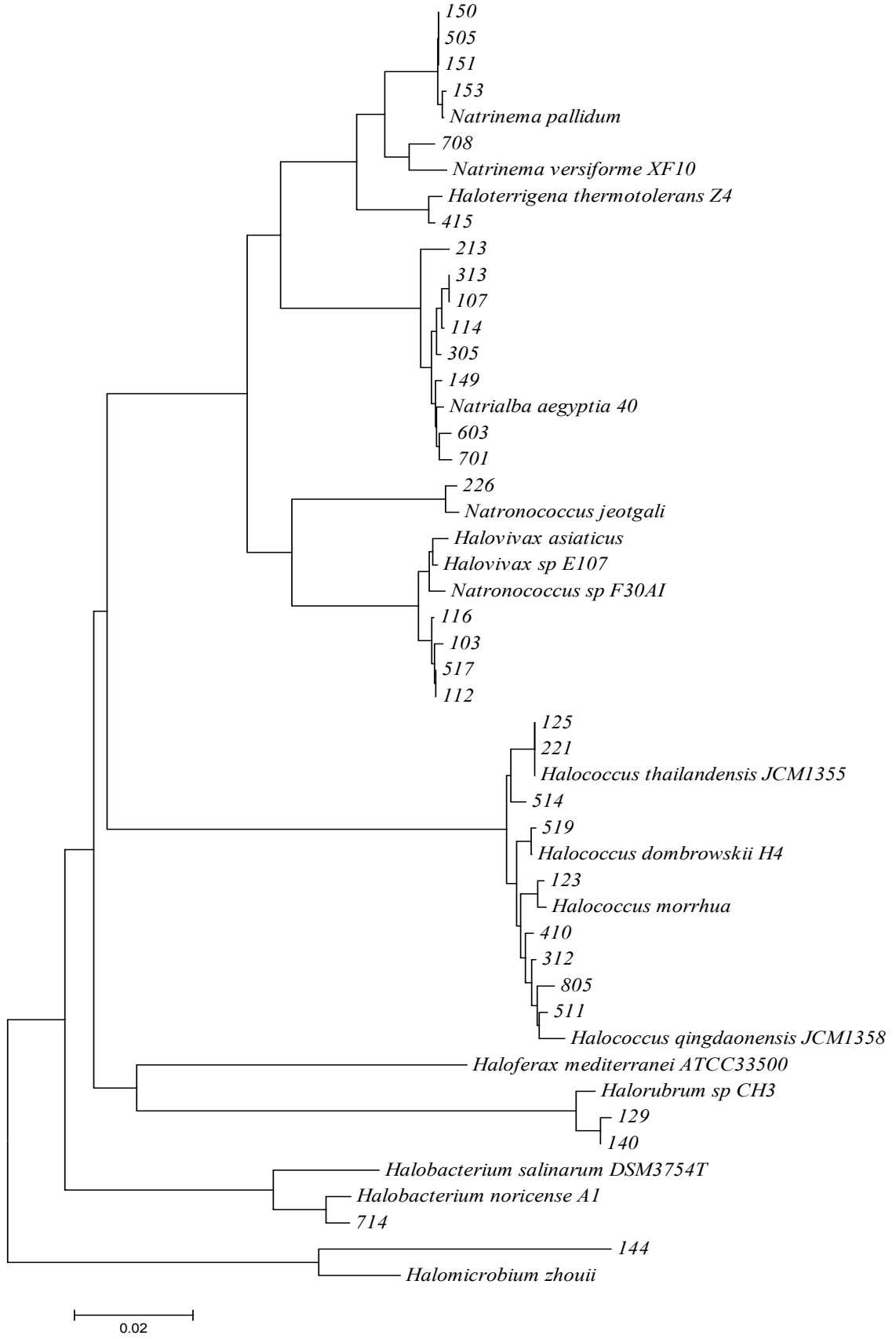
İzolat Numarası	Gen Bankası Erişim Numarası	Filogenetik Olarak Benzer Tür	Benzerlik Oranı (%)
103	DQ309081.1	<i>Natronococcus</i> sp. F30A1	99
107	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
112	AB477227.1	<i>Halovivax asiaticus</i>	99
114	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
116	FJ686124.1	<i>Halovivax</i> sp. E107	99
123	X00662.1	<i>Halococcus morrhua</i>	99
125	AB549236.1	<i>Halococcus thailandensis</i>	100
129*	EF533956.1	Uncultured haloarchaeon clone YA32	99
140	FJ686129.1	<i>Halorubrum</i> sp. CH3	99
142*	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	97
144	HQ215547.1	<i>Halomicrobium zhouii</i>	94
149	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
150	AF367370.2	<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	99
151	AF367370.2	<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	99
153	AF367370.2	<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	100
213	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
221	AB549236.1	<i>Halococcus thailandensis</i>	100
226	AB477232.1	<i>Natronococcus jeotgali</i>	99
305	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
312	AB549236.1	<i>Halococcus thailandensis</i>	99
313	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
410	NR_028186.1	<i>Halococcus dombrowskii</i> H4	99
415	EU557270.1	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> Z4	99
505	AF367370.2	<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	99
511	AB477971.1	<i>Halococcus qingdaonensis</i>	99
514	AB549236.1	<i>Halococcus thailandensis</i>	99
516*	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	92
517	AB477227.1	<i>Halovivax asiaticus</i>	99
519	NR_028186.1	<i>Halococcus dombrowskii</i> H4	99
603	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
701	NR_028176.1	<i>Natrialba aegyptia</i> 40	99
708	NR_028150.1	<i>Natrinema versiforme</i> XF10	99
714	NR_028187.1	<i>Halobacterium noricense</i> A1	99
805	AB549236.1	<i>Halococcus thailandensis</i>	99

\*129 numaralı izolatın sadece ileri primer, 142 ve 516 numaralı izolatların sadece geri primer kullanılan tek yönlü kısmi dizi analiz sonuçları verilmiştir.

Çalışmamızda moleküler olarak tanımlanan 129 numaralı izolat sadece ileri primer analizine göre uncultured haloarchaeon clone YA32 olarak, 142 ve 516 numaralı izolatlar sadece geri primer analizine göre *Natrialba aegyptia* 40 olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte 144 numaralı izolat % 94 benzerlik oranıyla *Halomicrobium zhouii* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 45. Tanımlanan izolatların izole edildikleri ham deri örneklerine göre dağılımı

İzolatların Benzer Buldukları Türler	Yerli Irk Ham Deri Örnekleri				Yabancı Irk Ham Deri Örnekleri				Toplam İzolat Sayısı
	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4. Örnek	5. Örnek	6. Örnek	7. Örnek	8. Örnek	
<i>Natrialba aegyptia</i> 40	4	1	2		1	1	1		10
<i>Halococcus thailandensis</i>	1	1	1		1			1	5
<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	3				1				4
<i>Halococcus dombrowskii</i> H4				1	1				2
<i>Halovivax asiaticus</i>	1				1				2
<i>Halovivax</i> sp. E107	1								1
<i>Halococcus morrhua</i>	1								1
Uncultured haloarchaeon clone YA32	1								1
<i>Natronococcus</i> sp. F30AI	1								1
<i>Halorubrum</i> sp. CH3	1								1
<i>Halomicrobium zhouii</i>	1								1
<i>Natronococcus jeotgali</i>		1							1
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> Z4				1					1
<i>Halococcus qingdaonensis</i>					1				1
<i>Natrinema versiforme</i> XF10							1		1
<i>Halobacterium noricense</i> A1							1		1
<b>Toplam İzolat Sayısı</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>34</b>



Şekil 20. Çalışmamızda tanımlanan izolatlar ile benzer buldukları türlerin karşılaştırmalı filogenetik ağacı.

#### **4.2. Tartışma**

Bu çalışmada yerli ve yabancı olmak üzere 8 farklı kaynaktan temin edilen tuzlanmış ham deri örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden toplam 186 adet aşırı halofilik mikroorganizma izolasyonu yapılmış ve elde edilen izolatlar bazı biyokimyasal, antibiyotik duyarlılık, pH, NaCl, sıcaklık toleranslarının yanı sıra nitel ve nicel hidrolitik enzim testleri uygulanmıştır. Nitel hidrolitik enzim aktivite bulguları da dikkate alınarak seçilen izolatların kazeinaz, keratinaz, kollajenaz, esteraz ve lipaz enzim aktiviteleri ayrıca nicel olarak belirlenmiştir. Mümkün olduğunca farklı strain elde edebilecek şekilde, tüm fenotipik bulgular dikkate alınarak 186 izolat içerisinde hidrolitik enzim aktivitesine sahip 34 izolat seçilmiştir. Bu izolatların strain düzeyinde tanımlamalarını yapmak amacıyla 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan yöntem, elde ettiğimiz fenotipik, hidrolitik enzim aktivite ve moleküler tanımlama bulguları aşağıda bir sıra dahilinde tartışılmıştır.

##### **4.2.1. Yöntem ve fenotipik bulgular üzerine tartışma**

Çalışmamızda tuzlanmış ham derilerden aşırı halofilik mikroorganizmaların izolasyonu için SW 15, SW 20 ve SW 25 besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerlerinde koloni gelişimi 37 °C'de 14 ile 21 gün arasında olmuştur. Kolonilerin iyi geliştiği ve aşırı halofilik mikroorganizmaların seçiminin daha kolay yapılabildiği 3.3 M NaCl içeren SW 25 besiyerinin kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir. Bu aşamadan sonra izolasyon dahil olmak üzere tüm testlerde SW 25 besiyeri kullanılmıştır. Çalışma süresince uygulanacak testlerde kullanılmak üzere izolatlar yatık agarlı tüplere ve bölünmüş yüzeyle petrilere spotlanarak kısa periyotlarda düzenli olarak kültüre edilmiş ve taze kültürler elde edilmiştir. Ayrıca kültürler uzun süreli olarak gliserolde -20 °C'de saklanmıştır.

İzolatların tamamı Gram negatif reaksiyon göstermiş ve bu yönüyle Arke domaininin genel özellikleriyle uyumlu bulunmuştur.

NaCl toleransı sonuçlarına göre izolatların tamamının 3.3 M ile 4 M NaCl konsantrasyonunda iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte izolatların gelişim gösterdikleri en düşük NaCl değerleri 118 izolat için 1.5 M, 39 izolat için 2 M, 23 izolat için 1 M, 4 izolat için 2.5 M olduğu tespit edilmiştir.

Kushner (1985) halofilleri geliştirmek için ihtiyaç duydukları en uygun NaCl miktarına göre sınıflandırarak 4 gruba ayırmıştır. Organizmaların geliştirmek için ihtiyaç duydukları NaCl konsantrasyonları % 1'in altındakiler halofilik olmayanlar, % 1-3

arasındakiler az halofiller, % 3-15 arasındakiler ılımlı halofiller ve % 15'den fazla olanlar aşırı halofiller olarak gruplandırılmıştır (Kushner, 1985).

Araştırma bulgularımıza göre tüm izolatların 3.3 ile 4 M arasında iyi gelişim göstermiş olmaları bu mikroorganizmaların aşırı halofilik olduklarını ortaya koymuştur.

İzolatların tek karbon kaynağı kullanım testlerinde besiyerine ilave edilecek olan maya özütü konsantrasyonu % 0,01 olarak belirlenmiştir. İzolatların tamamının en düşük MgCl<sub>2</sub> değeri de % 0,05 (5 mM) olarak bulunmuştur. Montalvo-rodriguez ve ark. (1997) yaptığı denemelerde bu oran % 0,005 olarak belirlenmiştir.

İzolatların pH toleranslarını belirlemek için 3–10 pH aralığındaki besiyerlerine ekim yapılmış ve izolatların minimum ve maksimum gelişebildikleri pH değerleri, 186 izolatın % 35'i için pH 6 – 9, % 32'si için pH 5 – 9, % 19'u için pH 6 – 10, % 12'si için pH 5 – 10 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm izolatların optimum gelişebildiği pH aralığının 7- 8 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular moleküler yöntemlerle tayin edilen türlerin fizyolojik özellikleriyle uyumlu bulunmuştur.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde izolatların tamamının basitrasin ve novobiyosin antibiyotiğine karşı duyarlı, %97'sinin penisilin G antibiyotiğine karşı direçli bulunması izolatların arke olabileceğine işaret etmiştir.

Çetinkuş (2007) izole ettiği halofilik mikroorganizmaların arke ve bakteri ayrımını polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlemiş ve arkelere ait izolatların basitrasin ve novobiyosin antibiyotiğine duyarlı, penisilin G'e karşı ise direçli olduğunu bulmuştur.

Bizim araştırmamızda da antibiyotik testleri sonucunda yapılan moleküler tanımlarda izolatların tamamının arke domainine ait oldukları tespit edilmiştir.

Holmes ve Dyall-Smith (1991) çoğu halofilik arke türünün DNA giraz inhibitörü novobiyosin ve basitrasine duyarlı olduğunu ifade etmiştir.

Araştırma sonuçlarımızdan elde edilen antibiyotik test bulguları ayrıca Holmes ve Dyall-Smith (1991)'in ifadeleriyle de desteklenmiştir.

Çalışmamızda 50 izolat tetrasiklin (30 µg) antibiyotiğine, 14 izolat eritromisin (15 µg) antibiyotiğine karşı duyarlı bulunmuştur. Oren (2006) *Halobacterium salinarum* türünün kloramfenikol ve eritromisin (100 µg/ml) antibiyotiği ile inhibe edildildiğini ve 8 µg/ml'den yüksek değerlerde tetrasiklin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Farklı sıcaklıklarda gelişmenin değerlendirildiği test sonuçlarında tüm izolatlar 27 ile 50 °C arasında gelişim göstermiştir. Bununla birlikte izolatların optimum gelişme sıcaklığı 37 °C - 40 °C'de aralığında olmuştur. Bu sonuçlar moleküler olarak tanımlanan türlerin genel özellikleri ile de benzer bulunmuştur.

Tek karbon kaynağı kullanımında bazı izolatlar zayıf gelişim göstermiştir. Bunun sebebinin besiyeri içeriğine ilave edilen % 0.01 konsantrasyondaki maya özütünün azot ve büyüme faktörleri açısından yetersiz kaldığını düşündürmüştür. Ancak *Halobacterium salinarum* türüyle ilgili bir çalışmada tek karbon kaynağında büyümenin olmadığı, besiyeri içeriğine % 0.005 konsantrasyonda maya özütü ilave edildiğinde gelişmenin olduğu bildirilmiştir (Oren, 2006). Bu bilgi tek karbon kaynağı kullanımı ile ilgili araştırma sonuçlarımızı destekler nitelikte bulunmuştur.

Biyokimyasal testlerin uygulanmasında moleküler tanımlamaya destek olacak Halobacteriales takımına ait yeni bir üyenin tanımlanabilmesi için gerekli minimum standartlar uygulanmaya çalışılmıştır (Oren ve ark., 1997). Bu bağlamda çalışmamızda izole ettiğimiz 186 izolatın % 73'ü oksidaz negatif, % 68'i katalaz pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte triptofandan indol oluşturan 15 adet, nitrattan gaz oluşturan 10 adet ve nitratı indirgeyerek nitrit oluşturan 115 adet izolat tespit edilmiştir.

#### **4.2.2. Hidrolitik enzim aktivitesi ölçüm bulgularının tartışılması**

Deri Mikrobiyolojisi üzerine yapılan literatür tarama sonuçlarına göre enzim aktivite çalışmalarınının daha çok bakteriler ve halofilik bakteriler üzerine olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan aşırı halofilik arekeler ve bunların enzimleri üzerine yapılan çalışmalarda materyal olarak tuzlu topraklar, tuzlalar, tuz gölleri, tuzlanmış fermente gıdalar kullanılmıştır. Bu konu ile ilgili bazı literatürler aşağıda verilmiştir.

Birbir ve ark. (1996) tuzla konservelenmiş derilerden elde ettikleri halofil bakterilerin % 70'inin proteolitik olduğunu ve deri materyaline zarar verdiğini bildirmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar tuzlanmış ham deriler üzerindeki kızartılardan halofilik arkelerin sorumlu olduğunu ve salamura derilerde bulunan halofilik arkelerin, yüksek sıcaklıklarda uzun depolama koşullarında deri yüzeyini parçalayabilen proteazlar içerdiğini bildirmişlerdir (Bailey ve Birbir, 1993; Birbir ve Ilgaz, 1996; Birbir ve ark., 1996; Bailey ve Birbir, 1996).

Yine bazı araştırmacılar birçok halofilik arkenin proteolitik aktiviteye sahip ve halofilik arkelerden izole edilen ekstraselüler proteazların bazıları doğal çevrede protein ve peptidleri parçalayabilen serin proteazlar olduğunu belirtmişlerdir (Gibbons, 1957; Oren, 2002; De Castro ve ark., 2006).

Araştırmamızda tuzlanmış yerli ve yabancı ham derilerden izole edilen izolatların tamamının hidrolitik enzim taramaları öncelikle nitel olarak yapılmış ve bu sonuçlara göre

seçilen izolatların proteaz, keratinaz, kollajenaz, lipaz ve esteraz enzimleri nicel olarak tayin edilmiştir. Nitel test sonuçlarına göre kazeini parçalayarak zon oluşturan toplam 23 izolatın (% 12) kazeinolitik, 106 izolatın (% 57) jelatinolitik, 21 izolatın (% 11) amilolitik, 65 izolatın (% 35) esteraz pozitif, 33 izolatın (% 18) lipaz pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Nicel enzim aktivitesi denemelerinde proteaz için kazein, keratinaz için azo-keratin, kollajenaz için azocoll, esteraz için p-nitro fenil bütirat (p-NPB) ve lipaz için p-nitro fenil laurate (p-NPL) substratları materyal ve yöntemde belirtilen enzim prosedürüne göre kullanılmıştır.

Enzim aktiviteleri büyüme eğrileri ile karşılaştırıldığında aktivitenin logaritmik dönemin sonlarına doğru maksimum düzeye ulaştığı görülmüştür. Yaşa ve ark. (2008) İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole ettikleri aşırı halofilik arke izolatının proteaz aktivitesinin ölçümünde aktivitenin eksponansiyel fazda başlayarak stasyonere fazda maksimum değere ulaştığını tespit etmişlerdir. Bu bilginin araştırma sonuçlarımızı destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

Adıgüzel ve ark. (2009) yünden izole edilmiş iki *Bacillus cereus* straininin peptid sınırlı kültürlerde kollajenolitik, elastolitik ve keratinolitik proteaz sekresyonunu incelemişlerdir. Kültürlerin eksponansiyel fazda proteolitik aktivite göstermediğini ancak linear büyüme fazında her iki strainin de kollajenolitik ve elastolitik proteaz salgıladığını ve maksimum aktivitenin 12–14 saat sonra oluştuğunu kaydetmişlerdir. Keratinolitik proteazın ise kültürlerin durağan faza geldiklerinde salgılandığını ve en yüksek aktivitenin 16–20 saat sonra elde edildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte kıl giderme aktivitesinde 5 kat yoğunlaştırılmış kültür süpernatantı ile koyun derilerininin 21 saat inkübasyonu sonucunda kılların kolayca uzaklaştırıldığı ve kültür süpernatantında oluşan renk değişiminin protein parçalanmasının işareti olduğunu ifade etmişlerdir.

Araştırmamızda kazeinaz, keratinaz ve kollajenaz enzim aktivite ölçümleri 2 M NaCl, 37 °C, pH 7.5 reaksiyon koşullarında ve sırasıyla 10 dk, 60 dk ve 30 dk reaksiyon sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon koşullarında en yüksek aktiviteyi 150 numaralı izolat göstermiştir. 150 numaralı izolatın kazeinaz, keratinaz ve kollajenaz enzim aktiviteleri sırasıyla 9.2 U/ml, 0.6 U/ml ve 1.7 U/ml aktivite olarak ölçülmüştür.

Halofilik arkelerden elde edilen bazı proteazlar, *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium halobium*) (Norberg ve Von Hofsten, 1969; Izotova ve ark., 1983; Ryu ve ark., 1994; Kim ve Dordick, 1997), *Natrialba asiatica* (Kamekura ve Seno, 1990; Kamekura ve ark., 1992), *Haloferax mediterranei* (Stepanov ve ark., 1992; Kamekura ve ark., 1996), *Natronomonas pharaonis* (Stanlotter ve ark., 1999), *Natrialba magadii*

(Gimenez ve ark., 2000) ve *Natronococcus occultus* (Studdert ve ark. 1997; Studdert ve ark. 2001; Elsztain ve ark., 2001) türlerinden izole edilerek tanımlanmıştır.

Kanlayakrit ve ark. (2004) aşırı halofilik *Halobacterium* sp. PB407'den proteaz enzimini üreterek tanımlamışlardır. Enzim üretiminin 96 saatte oluştuğunu ve maksimum aktivitenin 2.13 M NaCl, pH 8 ve 40 °C reaksiyon koşullarında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda uyguladığımız reaksiyon koşullarıyla yukarıda bahsedilen çalışmanın reaksiyon koşulları benzerlik göstermektedir.

Riffel ve ark. (2003a) keratinin pepsin, tripsin ve papin gibi yaygın proteolitik enzimlere karşı dirençli olduğunu ve sistin köprüleriyle protein zincirinin çapraz bağlanmasının keratinin proteolitik parçalanmasına dirençlilik sağladığını belirtmişlerdir. Ancak keratin yapısının bazı mikroorganizmalarca parçalanabildiği için tüylerin doğada birikim yapmadığını ifade etmişlerdir.

Böckle ve ark. (1995) keratin parçalayan *Streptomyces pactum* türünden elde ettikleri serin proteazın ticari olarak kullanılan çeşitli proteazlardan önemli derecede daha aktif olduğunu ifade etmişlerdir

Yapılan bir çalışmada Riffel ve ark. (2003b) keratinolitik *Flavobacterium* sp kr6 ve *Bacillus* sp kr10 izolatlarından elde ettikleri ham enzimlerin 50 °C'de 15 dk reaksiyon koşullarında 0.01 absorbans artışına göre en yüksek enzim aktivitesini 7 U/dm<sup>3</sup> olarak ölçmüşlerdir.

Bununla birlikte Kim ve ark. (2001) kümes hayvanı atıklarından izole ederek tanımladığı *Bacillus subtilis* türünü % 1 kazein içeren ortamda geliştirmiş ve 0.001 absorbans artışına göre 160 U keratinolitik aktivite gösterdiğini tespit etmiştir.

Araştırmamızda da kazeinaz, keratinaz, kollajenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde izolatlar % 1 oranında kazein içeren besiyerlerinde geliştirilmişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2009) kollajenaz aktivitesini inceledikleri çalışmada bakteri strainini kollajen ilave edilmiş gelişim ortamında geliştirdiklerinde enzim aktivitesinin % 30 artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Böylece yapılan çalışmalar ile araştırmamızda izlediğimiz yöntem arasında paralellik olduğu ifade edilebilir.

Gupta ve Ramnani (2006) çeşitli mikroorganizmaların keratinolitik titrelerinin karşılaştırılmasının farklı substrat ve keratinolitik enzim birimlerinin kullanılmasından dolayı zor olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu nedenle yapılan çalışmaların bulguları ile araştırma bulgularımızın tartışması net olarak yapılamamıştır.

Araştırmamızda nitel olarak enzim aktivitesi gösteren izolatlardan seçim yapılarak bu izolatların gelişim gösterdiği koşullarda salgılamış oldukları enzim aktivitelerinin nicel olarak varlığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarında araştırmaların çoğunun bir izolattan yada tanımlanmış bir türden izole edilen enzimin optimum aktivite koşullarının belirlenmesi üzerine olduğu tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalara ait literatürler aşağıda verilmiştir.

Kamekura ve Seno (1990) tanımlanmamış bir halofilik arkebakteri 172P1 straininin % 15–27 NaCl içeren besiyerinde 3 ekstraselüler proteaz ürettiğini tespit etmiştir. Bu enzimlerden bir tanesinin serin proteaz olduğunu ve enzim stabilesi için % 25 oranında NaCl'ye ihtiyaç duyduğunu bildirmiştir.

Shi ve ark. (2006) *Natrinema* sp. J7 halofilik arkeonundan ekstraselüler halofilik proteaz SptA'yı inceledikleri çalışmalarında bu enzimin 50 °C'de 2.5 M NaCl ve pH 8 değerinde optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Thomson ve ark. (1972) ham derilerden izole edilen aerobik halofillerin kollajenolitik ve jelatinolitik enzim aktivitelerini incelemiş ve bakteriyal strainlerin %10'nun saflaştırılmış kollajeni % 2.34 NaCl'de denatüre ettiğini bildirmişlerdir.

Vidyasagar ve ark. (2006) *Halogeometricum borinquense* türünden termostabil ve haloalkalifil ekstraselüler serin proteazı saflaştırarak karakterize etmiştir. En yüksek enzim aktivitesini % 20 NaCl, pH 10, 60 °C reaksiyon koşullarında gözlemlemiştir.

*Halobacterium salinarum* türünden izole edilen halofilik proteaz, glisin içeren oligopeptid sentezinde kullanılmıştır (Ryu ve ark., 1994). Halofilik proteazlar peptid sentezi için büyük bir potansiyel oluşturmaktadır (Sellek ve Chaudhuri 1999).

Horikoshi (1999) mevcut alkalifilik enzimlerin büyük bir rol oynadığı deterjan ilave maddesi olarak haloarkeal ekstremozimlerin kullanılabileceğini ifade etmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda elde ettiğimiz izolatların sahip oldukları enzimlerin karakterizasyonu yapılarak endüstriyel alanda kullanımlarının incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Proteaz, amilaz, amidaz, esteraz ve lipaz gibi hidrolitik enzimler, endüstriyel enzim pazarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Son zamanlarda lipazlar (triacil gliserol açilhidrolaz E.C.3.1.1.3) gıda teknolojisi, deterjan, kimya sanayi ve biyomedikal bilimler gibi endüstriyel uygulamalarda geniş bir yelpazede kullanılması ve çok yönlü özelliklerinden dolayı biyoteknolojide artarak büyüyen anahtar enzim olarak ortaya çıkmaktadır (Jaeger ve ark., 1999; Gupta ve ark., 2004).

Bahsedilen gelişmeler dikkate alınarak araştırmamızda esteraz ve lipaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. Daha önce açıklandığı üzere enzimlerin üretim ortamlarına esteraz aktivitesi için Tween-80 ve lipaz aktivitesi için zeytinyağı %1 oranında ilave edilerek enzim aktivasyonu sağlanmıştır.

Çalışmamızda esteraz ve lipaz enzim aktivitelerinin ölçümleri 2 M NaCl, 37 °C, pH 7.5 reaksiyon koşullarında ve 10 dk reaksiyon süresi sonunda gerçekleştirilmiştir. Belirtilen reaksiyon koşullarında 140 numaralı izolatın 5, 7, 9 ve 11. günlerde sırasıyla 33 U/ml, 51 U/ml, 48 U/ml ve 33 U/ml esteraz aktivitesi gösterdiği ve maksimum aktivitesinin 7. günde olduğu gözlenmiştir. 505 numaralı izolatın aynı gün ve sırayla 7 U/ml, 30.8 U/ml, 33.8 U/ml ve 15 U/ml lipaz aktivitesi göstererek maksimum aktivitesinin 9. günde olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca çalışılan izolatlar arasında 140 ve 144 numaralı izolatın esteraz, 140, 149 ve 505 numaralı izolatların lipaz aktivitelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Özcan ve ark. (2009) 5 halofilik arkeal strainin esteraz ve lipaz aktivitelerini inceledikleri çalışmada lipaz aktivitesi için para-nitrofenil palmitat (pNPP) ve esteraz aktivitesi için para-nitrofenil bütirat (pNPB) substratlarını kullanmışlardır. Bu araştırmanın bulgularına göre maksimum esteraz aktivitesinin 3–4.5 M NaCl, pH 8-8.5, 60-65 °C'de ve maksimum lipaz aktivitesinin 3.5-4 M NaCl, pH 8, 45-60 °C reaksiyon koşullarında gerçekleştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte esteraz aktivite değerlerinin lipaz aktivite değerlerinden yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Bhatnagar ve ark. (2005) *Halobacteria* strainin lipolitik aktivitesini p-nitro fenil butirat (pNPB) ve p-nitro fenil palmitat (pNPP) substratı kullanarak incelemişlerdir. Hidrolitik aktivitenin optimum koşullarını esteraz için 3.5 M NaCl, pH 8, 40 °C ve lipaz için 4 M NaCl, pH 7.5 40 °C olarak tespit etmiştir. Bununla birlikte esteraz aktivitesinin lipaz aktivitesine göre daha hızlı gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Camacho ve ark. (2009) *Haloarcula marismortui* türünden esteraz ve lipaz üretimi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Esteraz aktivitesi için p-nitrofenil bütirat (pNPB) ve p-nitrofenil valerat (pNPV), lipaz aktivitesi için p-nitrofenil laurat (pNPL) substratlarını kullanarak *H. marismortui* türünün ekstraselüler esteraz ve lipaz aktivitelerinin sırasıyla 0,06 U/l ile 0,26 U/l olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda esteraz aktivitesi için kullandığımız pNPB ve lipaz aktivitesi için kullandığımız pNPL substratları ile araştırmacıların kullandığı substratların benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak araştırmacıların enzim aktivitesi bulgularını litre cinsinden

belirtmesi çalışmamızda ise mililitre cinsinden verilmesi bulgular yönünden farklılık göstermiş ve bulguların karşılaştırılmasında zorluk oluşturmuştur.

#### **4.2.3. Moleküler tanımlama bulgularının tartışılması**

Araştırmamızda 186 izolat içerisinde seçilen 34 izolatın <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> internet adresindeki program kullanılarak karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizi analizi yapılmış ve filogenetik olarak benzer oldukları türler tespit edilmeye çalışılmıştır. Moleküler yöntemlerle tanımlanacak izolatların seçimlerinde başta proteolitik sonrasında lipaz ve esteraz enzim aktivitelerine sahip olan izolatlar dikkate alınmıştır. Bunun ardından basitrasın ve novobiosin antibiyotiklerine karşı duyarlı olmalarına ve çalışmamızda kullanılan farklı ham deri örneklerinden izole edilmiş olmalarına dikkat edilerek çeşitliliğin artması amaçlanmıştır.

186 izolat içerisinde birçok fenotipik özellikler dikkate alınarak özenle seçilen 34 izolatın 16S rRNA dizi analizi sonucunda; 10 izolatın *Natrialba aegyptia* 40, 5 izolatın *Halococcus thailandensis*, 4 izolatın *Natrinema pallidum* R-fish, 2 izolatın *Halococcus dombrowskii* H4, 2 izolatın *Halovivax asiaticus*, ve 1'er izolatın *Halovivax* sp. E107, *Halococcus morrhua*, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1 türlerine filogenetik olarak benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Moleküler olarak tanımlanan izolatlarımızın tamamının aşırı halofilik arke olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda moleküler yöntemle tanımlanan 34 izolattan 16 farklı tür tespit edilmiştir. Literatür taramaları sonucunda izolatların benzer buldukları türlerin tamamı daha önceki çalışmalarda tuzlu topraklar, tuzlalar, tuz gölleri, tuzlanmış fermente gıdalar gibi çeşitli tuzlu ortamlardan izole edilerek tanımlanmıştır. İzolatların benzer bulunduğu türlerin kaynaklarına ait bilgiler çizelge 46'da belirtilmiştir.

*Natronococcus* sp. F30AI, *Halovivax* sp. E107, *Halorubrum* sp. CH3 aşırı halofilik arke türleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verilerine göre Özcan ve arkadaşları (2006, 2009) tarafından Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden izole edilerek tanımlanmış türlerdir. Bu aşırı halofilik arke türlerinin çalışmamızda yerli ırk ham deri örneklerinden ilk kez izole edilmesi ham derilerdeki halofilik mikroorganizma kaynağının konservasyonda kullanılan tuzlar olabileceğini düşündürmüştür.

Araştırmamızda 140 numaralı izolat *Halorubrum* sp. CH3 olarak tanımlanmış ve 51 U/ml esteraz ve 22.7 U/ml lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Bununla birlikte 150, 151, 153 ve 505 numaralı izolatlar *Natrinema pallidum* R-fish straini olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların kazeinaz, keratinaz, kollajenaz ve lipaz gibi önemli hidrolitik enzim aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir.

*Natrinema pallidum* türü ilk olarak McGenetiy ve ark (1998) tarafından ham deriden izole edilerek tanımlanmış ardından ülkemizde yapılan bir çalışmada Yılmaz (2010) tarafından tuzlanmış ham deriden izole edildiği bildirilmiştir. Ancak aynı türün R-Fish straini Lu ve Cui (2001) tarafından tuzlanmış taze balıktan izole edilerek tanımlanmıştır. Çalışmamızda izole ederek tanımladığımız *Natrinema pallidum* R-fish straini ülkemizde tuzlanmış ham deriler üzerinde ilk defa tespit edilmiştir.

*Halococcus morhua* türünün 16S rRNA gen dizisi ilk olarak Leffer ve Garret (1984) tarafından tanımlanmıştır. Euzeby (1997)'e göre *Halococcus morhua* türünün sinonimleri; *Sarcina litoralis* (Poulsen, 1879), *Sarcina morrhuae* (Farlow, 1880), *Micrococcus litoralis* (Poulsen 1879; Kellerman, 1915), *Micrococcus morrhuae* (Farlow, 1880; Klebahn, 1919), *Halococcus litoralis* (Poulsen, 1879; Schoop, 1935) olarak belirtilmiştir.

Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda tanımladığımız *Halococcus morhua* türü Orlita (2004) tarafından yapılmış bir çalışmada derideki kırmızı ve mor renkli lekelerden *Micrococcus morrhuae* olarak izole edilmiştir.

McGenity ve ark. (1998) yeni bir halobacterial cins bulmayı amaçladıkları çalışmalarında *Natrinema pellirubrum* ve *Natrinema pallidium* türlerini tuzlanmış ham deriden izole ettiklerini bildirmiştir.

Diğer yandan Yılmaz (2010) İngiltere ve Avustralya kaynaklı tuzlanmış ham derilerden *Halorubrum lacusprofundi*, *Halorubrum saccharovarum*, *Halorubrum tebenquichense*, *Natrinema gari* ve *Natrinema pallidum* olmak üzere 5 aşırı halofilik arke türünü izole ettiğini bildirmiştir.

Farklı araştırmacılar tarafından *Halococcus morhua* ve *Natrinema pallidum* türlerinin tuzlanmış ham derilerden izole edilerek tanımlanması ile aynı türlerin çalışmamızda da elde edilmesi bu tür yönünden moleküler bulgularımızı destekler nitelikte bulunmuştur.

Çizelge 46. İzolatların benzer bulunduğu türlerin izole edildikleri kaynaklara ait bilgiler

<b>İzolatların Benzer Buldukları Türler</b>	<b>İzole Edildikleri Kaynak</b>	<b>Kaynakça</b>	
<i>Natrialba aegyptia</i> 40	Aşırı tuzlu toprak	Mısır	Hezayen ve ark. (2001)
<i>Halococcus thailandensis</i> JCM 13552	Belirtilmemiş	Japonya	Minegishi ve ark. (2010)
<i>Natrinema pallidum</i> R-fish	Tuzlanmış taze balık	Çin	Lu and Cui (2001)
<i>Halococcus dombrowskii</i> H4	Kaya tuzu	Avusturya	Stan-Lotter ve ark. (2002)
<i>Halovivax asiaticus</i>	Tuzlu Ejinor gölü sedimenti	Çin	Castillo ve ark. (2006)
<i>Halovivax</i> sp. E107	Farklı tuzlu bölgeler	Türkiye	Özcan ve ark. (2009)
<i>Halococcus morrhua</i>	Ham deri	Belirtilmemiş	Orlita (2004)
Uncultured haloarchaeon clone YA32	Jiangsu bölgesi tuzlu toprak	Çin	He ve ark. (2007)
<i>Natronococcus</i> sp. F30AI	Tuz gölü ve Bolluk gölü	Türkiye	Özcan ve ark. (2006)
<i>Halorubrum</i> sp. CH3	Farklı tuzlu bölgeler	Türkiye	Özcan ve ark. (2009)
<i>Halomicrobium zhouii</i>	Jiangsu deniz tuzlası	Çin	Yang ve Cui (2012)
<i>Natronococcus jeotgali</i>	Geleneksel fermente gıda	Kore	Roh ve ark. (2007)
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> Z4	Belirtilmemiş	Çin	Zhang ve ark. (2008)
<i>Halococcus qingdaonensis</i>	Deniz tuzu	Çin	Wang ve ark. (2007)
<i>Natrinema versiforme</i> XF10	Tuz gölü	Çin	Xin ve ark. (2000)
<i>Halobacterium noricense</i> A1	Tuz madeni	Avusturya	Gruber ve ark. (2004)

Daha önceki farklı çalışmalarda deriden izole edildiği bildirilen *Natrinema pallidum* (McGenetiy ve ark., 1998; Yılmaz, 2010) ve *Halococcus morhua* (Orlita, 2004) türleri yapmış olduğumuz çalışmada da tespit edilmiştir. Ancak *Natrialba aegyptia* 40, *Halococcus thailandensis*, *Halococcus dombrowskii* H4, *Halovivax asiaticus*, *Halovivax* sp. E107, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1 olmak üzere 14 farklı aşırı halofilik arke türü ülkemizde tuzlanmış ham derilerden ilk defa izole edilerek tanımlanmıştır.

Moleküler yöntemle tanımlama sonucunda 107, 114, 142, 149, 213, 305, 313, 516, 603, 701 numaralı izolatların *Natrialba aegyptia* 40 türüne, 125, 221, 312, 514, 805 numaralı izolatların *Halococcus thailandensis* türüne benzerlik gösterdiği ancak benzer olan bazı izolatların enzim aktiviteleri açısından değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgu tespit edilen türlerin farklı alttürlerine ait olabileceğini düşündürmüştür.

*Halococcus thailandensis* olarak tanımlanan 514 numaralı izolatın kazeinaz, kollajenaz, esteraz ve lipaz aktivitelerine sahip olduğunun tespit edilmesi nedeniyle deri işlemlerinde bu tür üzerinde önemle durulması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda 129 numaralı izolat sadece ileri primer analizine göre uncultured haloarchaeon clone YA32 olarak, 142 ve 516 numaralı izolatlar ise sadece geri primer analizine göre *Natrialba aegyptia* 40 olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte 144 numaralı izolat %94 benzerlik oranıyla *Halomicrobium zhouii* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların ileride yapılacak çalışmalarda daha detaylı olarak incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

**BÖLÜM 5****SONUÇ VE ÖNERİLER**

Araştırmamızın sonunda yerli ve yabancı olmak üzere toplamda 8 farklı kaynaktan elde edilen tuzlanmış ham derilerden 186 aşırı halofilik mikroorganizma izole edilmiştir. Bu izolatların biyokimyasal özellikleri incelenmiş, antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış, hidrolitik enzim aktiviteleri taranmıştır. Hidrolitik enzim aktivitesine sahip 34 izolat karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanmıştır.

Nitel enzim aktivitesi sonuçlarına göre 23 izolatın (%12) kazeinaz, 106 izolatın (%57) jelatinaz, 21 izolatın (%11) amilaz, 65 izolatın (%35) esteraz, 33 izolatın (%18) lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Nitel enzim aktivitesi gösteren bazı izolatların kazeinaz, keratinaz, kollajenaz, esteraz ve lipaz enzim aktiviteleri nicel olarak ölçülmüştür. Bu izolatlardan 150 numaralı izolatın 9.2 U/ml kazeinaz, 0.6 U/ml keratinaz ve 1.7 U/ml kollajenaz, 140 numaralı izolatın 51 U/ml esteraz, 505 numaralı izolatın 33.8 U/ml lipaz aktivite değerleri ile diğer izolatlardan daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu araştırmada, tuzlanmış ham derilerden izole edilerek seçilen 34 izolatın 16S rRNA dizi analizi sonucu 10 izolat *Natrialba aegyptia* 40, 5 izolat *Halococcus thailandensis*, 4 izolat *Natrinema pallidum* R-fish, 2 izolat *Halococcus dombrowskii* H4, 2 izolat *Halovivax asiaticus*, ve 1'er izolat *Halovivax* sp. E107, *Halococcus morrhua*, Uncultured haloarchaeon clone YA32, *Natronococcus* sp. F30AI, *Halorubrum* sp. CH3, *Halomicrobium zhouii*, *Natronococcus jeotgali*, *Haloterrigena thermotolerans* Z4, *Halococcus qingdaonensis*, *Natrinema versiforme* XF10, *Halobacterium noricense* A1 olarak toplam 16 farklı strain tanımlanmıştır.

Araştırmamızda tanımlanan 34 aşırı halofilik arkeiden *Natrialba* cinsine ait 10 adet, *Halococcus* cinsine ait 9 adet, *Natrinema* cinsine ait 5 adet, *Halovivax* cinsine ait 3 adet, *Natronococcus* cinsine ait 2 adet, *Halomicrobium*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* cinslerine ait 1'er izolat ve 1 adet Uncultured haloarchaeon clone YA32 olmak üzere 8 farklı aşırı halofilik arke cinsinin varlığı saptanmıştır.

*Natrinema pallidum* R-fish straininin kazeinaz, keratinaz, kollajenaz ve lipaz gibi önemli hidrolitik enzim aktivitelerinin hepsine sahip olduğu belirlenmiştir.

*Halorubrum* sp. CH3 straininin 51 U/ml aktiviteyle en yüksek esteraz ve 22.7 U/ml aktiviteyle önemli derecede lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Özcan ve arkadaşları (2006, 2009) tarafından Türkiye'nin farklı tuzlu bölgelerinden izole edilerek tanımlanan *Natronococcus* sp. F30AI, *Halovivax* sp. E107, *Halorubrum* sp. CH3 aşırı halofilik arke türlerinin çalışmamızda yerli ırk ham deri örneklerinden ilk kez izole edilmesi ham derilerdeki halofilik mikroorganizma kaynağının konservasyonda kullanılan tuzlardan olabileceğini destekler nitelikte bulunmuştur.

Ham derilerin tuzla konservasyon işlemi birçok mikroorganizma gelişimini engellemesine rağmen arzu edilen koruma için yeterli olmamaktadır. Proteolitik ve lipolitik özelliklere sahip halofilik mikroorganizmalar tuzla konservelenmiş ham derilere zarar verebilmektedir. Bu mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tanımlanmaları durumunda kontrol altına alınmaları kolaylaşacaktır.

Çalışmamızda tuzlanmış ham derilerden 8 farklı cinse ait toplam 34 halofilik arke tanımlanmıştır. Antibiyotik test sonuçlarına göre bu arkelerin basitrasin ve novobiyosin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında ham derilerin bakteriyal ve fungal çeşitliliğinin yanısıra proteolitik ve lipolitik başta olmak üzere keratinaz, kollajenaz, esteraz gibi hidrolitik enzim aktivitelerine sahip halofilik Arkelerin önemli bir yere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Böylece ham derilerin ilk işlem basamaklarından itibaren korunmasında sadece antibakteriyal ve antifungal maddeler değil halofilik Arkeleri de kontrol edebilecek maddelerin kullanılmasının gerekliliği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Enzim aktivitesi gösteren ve tanımlanan aşırı halofilik arkelerin sahip oldukları enzimlerin karakterizasyonu yapıp endüstriyel kullanıma kazandırılması oldukça önemli sonuçlar doğurabilir.

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

Bu çalışmada tuzla konservelenmiş ham derilerde kültüre dayalı yöntemlerle aşırı halofilik arkelerin izolasyon ve tanımlaması yapılmıştır. Kültüre dayalı olmayan moleküler yöntemlerle bu tür derilerde mikroorganizmaların tanımlanması mikrobiyal çeşitliliğe hatırı sayılır derecede katkı sağlayabilir. Çünkü işlenmeye hazır durumdaki tuzla konservelenmiş deriler önemli derecede mikrobiyal yüke sahiptir. Başta enzim aktiviteleri olmak üzere bu mikroorganizmaların çeşitli alanlarda değerlendirilmesi durumunda insan sağlığı ve yararına önemli katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adıgüzel A.C., Bitlisli B.O., Yasa I., Eriksen N.T., 2009. Sequential Secretion of Collagenolytic, Elastolytic and Keratinolytic Proteases in Peptide-limited Cultures of Two *Bacillus cereus* strains Isolated From Wool. *J. Appl. Microbiol.*, 107:226-234.
- Afendra A.S., Vargas C., Nieto J.J. ve Drainas C., 2004. Gene Transfer and Expression of Recombinant Proteins in Moderately Halophilic Bacteria. *Methods in Molecular Biology*, 267: 209-223.
- Alam M. ve Oesterhelt D., 1984. Morphology, Function and Isolation of Halobacterial Flagella. *J. Mol. Biol.*, 176:459-475.
- Anonim., 2000 May. Biocides Used as Preservatives in the Leather Industry. *Emission Scenario Document*. 14p.
- Anonim., 2009. Rhodamine B Agar Preparation Procedure (b.t.). Erişim Ağustos 7, 2009, from <http://www.alken-murray.com/lipase.html>.
- Arahal D.R., Dewhirst, F.E., Paster B.J., Volcani B.E. ve Ventosa A., 1996. Phylogenetic Analyses of Some Extremely Halophilic Archaea Isolated From Dead Sea Water, Determined On The Basis of Their 16 S rRNA Sequences. *Appl. And Environ. Mic.*, 62(10): 3779-3786).
- Arda M., 2000. Temel Mikrobiyoloji (genişletilmiş 2. baskı). Medisan Yayınevi, Ankara.
- Asha K.R.T., Vinitha D.A., Kiran S.G., Manjusha W., Sukumaran N., Selvin J., 2005. Isolation and Cultivation of Halophilic Archaea from Solar Salterns Located in Peninsular Coast of India. *The Internet Journal of Microbiology*. 1(2):1-6.
- Aslan E., 2009. Tuzlanmış Ham Derilerde Bulanık Mikroorganizma Türlerinin Saptanması. Yüksek Lisans tezi. Marmara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bailey D.G. ve Birbir M., 1993. A Study of The Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine Cured Cattle Hides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 88: 291-300.
- Bailey D.G. ve Birbir M., 1996. The Impact of Halophilic Organisms on The Grain Quality of Brine Cured Hides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 91: 47-51.

- Bailey D.G., 1999. Preservation of Hides and Skins. Technologists Pocket Book. *The Society of Leather Technologists and Chemists*, East Yorkshire, U.K. 5-21.
- Beisson F., Tiss A., Riviere C., Verger R., 2000. Methods For Lipase Detection And Assay: a critical Review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133–153.
- Berber D., 2009. Tuzlarda, Tuzlanmış Ve Islatılmış Ham Derilerdeki Bakteriyel Popülasyonun İncelenmesi. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bhatnagar T., Boutaiba S., Hacene H., Cayol J.L., Fardeau M.L., Ollivier B., Baratti J.C., 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters*, 248:133-140.
- Birbir M. ve Ilgaz A., 1996. Isolation and Identificatin of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 80: 147-153.
- Birbir M. ve Sesal C., 2003. Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şerflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turk. J. Biol.*, 27:7-22.
- Birbir M., 1997. Investigation of Salted-cured France and Russian Hides for Halophilic Bacteria. *Journal of Turkish Microbiology Society*, 27: 68-73.
- Birbir M., 2004. Deri Konservasyonunda Kullanılan Tuzlarda Proteolitik ve Lipolitik Bakterilerin Araştırılması. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 39-49.
- Birbir M., Cali B., Mertoglu B., Bardavid R.E., Oren A., Ogmen M.R., Ogan, A., 2007. Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:309–316.
- Birbir M., Kallenberger W., Ilgaz A. ve Bailey D., 1996. Halophilic Bacteria Isolated From Brine Cured Cattle Hides. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 80: 87-90.
- Birbir M., Kalli N. ve Johansson C., 2002. Examination of Salt Quality of Sereflikochisar Lake Used in Turkish Leather Industry. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 86(3): 112-117.

- Bitlisli B.O., Karavana H.A., Başaran B., Sarı O., Yasa I. ve Birbir M. 2004., The Effect of Conservation Defects on The Suede Quality of Double-Face. *Journal of American Leather Chemists Association*, 99(12): 494-501.
- Bonelo G., Ventosa A., Megias M. ve Ruiz-Berraquero F., 1984. The Sensitivity of Halobacteria to Antibiotics. *FEMS Microbiol. Letters*, 21:341-345.
- Boutaiba S., Bhatnagar T., Hacene H., Mitchell D.A., Baratti J.C., 2006. Preliminary Characterisation of A Lipolytic Activity From An Extremely Halophilic Archaeon, *Natronococcus* sp. *J. Mol. Catal., B., Enzym.*, 41:21–26.
- Böckle B, Galunski B, Mueller R.,1995. Characterization of A Keratinolytic Serine Protease From *Streptomyces pactum* DSM40530. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3705-3710.
- Brock T.D., ve Petersen S., 1976. Some Effects of Light on the Viability of Rhodopsin Containing Halobacteria. *Arch. Microbiol.*, 109:199-200.
- Camacho R.M., Mateos J.C., Gonzalez-Reynoso Orfil., Prado L.A., Cordova J., 2009. Production And Characterization Of Esterase And Lipase From *Haloarcula marismortui*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:901–909.
- Castillo A.M., Gutierrez M.C., Kamekura M., Ma Y., Cowan D.A., Jones B.E., Grant W.D., ve Ventosa A., 2006. *Halovivax asiaticus* gen. Nov., sp. Nov., a Novel Extremely Halophilic Archaeon Isolated From Inner Mongolia, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56: 765-770.
- Cheng G., Zhao P., Tang X.F., Tang B., 2009. Identification and Characterization of a Novel Spore-associated Subtilase from *Thermoactinomyces* sp. CDF. *Microbiology*, 155:3661-3672.
- Coronado M., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J.J., 2000. Production and Biochemical Characterization of Alpha-amylase from the Moderate Halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett.*, 183(1):67-71.
- Çetinkuş K., 2007. Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dahl S., 1956. Prevention of Microbiological Deterioration of Leather. *Journal of American Leather Chemists Association*, 51(3):103-117.

- Danson M. ve Hough D.W. 1997. The Structural Basis of Protein Halophilicity. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Phisyology*, 117(3): 307-312.
- DasSarma S., Arora P., 2001. A General Review on Halophiles. In Encyclopedia of Life Sciences. Nature publishing group (www.els.net). 1-9.
- DasSarma S., Coker J.A., ve DasSarma P., 2010. Archaea - Overview. In Schaechter M. Ed. *Desk Encyclopedia of Microbiology* (2nd ed). Academic Pres. 118-139.
- De Castro R.E., Ruiz D.M., Gimenez M.I., Silveyra M.X., Paggi R.A., Maupin-Furlow J.A., 2008. Gene Cloning And Heterologous Synthesis of A Haloalkaliphilic Extracellular Protease of *Natrialba magadi* (Nep). *Extremophiles* 12(5): 677–687.
- DeCastro R.E., Maupin-Furlow J.A., Gime´nez M.I., Herrera Seitz M.K., Sanchez J.J., 2006. Haloarchaeal Proteases And Proteolytic Systems. *FEMS Microbiol Rev.*, 30:17–35.
- Denz W., 2009. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Life06 TCY/TR/292 HAWAMAN Projesi.
- Dhar S.K. ve Johnson R., 1973. The Oxidase Activity of *Chromobacterium*. *J. Clin. Pathol.*, 26:304-306.
- Dostbil N. ve Ağaoğlu S., 2004. Tuzlanarak Muhafaza Edilen Hayvan Derilerinde Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Kısmi Jelatinaz Aktivitesinin Araştırılması. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 51-56.
- Dussault H.P., 1955. An İmproved Technique For Stainin Red Halophilic Bacteria. *J. Bacteriol.*, 70: 484-485.
- Dyall-Smith M., 2008. The Halohandbook-Protocols for Haloarchaeal Genetics. Version 7. 144p.
- Eker E. ve Artan M.E., 2000. Deri Teknolojisi Açısından Gazyağı ve Sodyum Laurylsülfatın Deri Yağlarına Etkisi Üzerinde Histolojik ve Kimyasal Bir Çalışma. *İstanbul Üni. Veteriner Fak. Derg.*, 26(1): 189-200.
- 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: 719–725.

- Elsztein C., Herrera Seitz M.K., Sanchez J.J., DeCastro R.E., 2001. Autoproteolytic Activation of The Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus occultus* Extracellular Serine Protease. *J Basic Microbiol.*, 41:319–327.
- Enache M.ve Kamekura M., 2010. Hydrolytic Enzymes Of Halophilic Microorganisms And Their Economic Values. *Rom. J. Biochem.*, 47(1): 47 – 59.
- Euzeby J.P., 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: A Folder Available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 590-592.
- Farlow W.G., 1880. On the Nature of the Peculiar Reddening of Salted Codfish During the Summer Season. *U.S. Fish Comm. Rep.* for 1878, 969-973.
- Franzmann P.D., Stackebrandt E., Sanderson K., Volkman, J.K., Cameron, D.E., Stevenson P.L., McMeekin T.A., ve Burton H.R., 1988. *Halobacterium lacusprofundi*, sp. nov., a Halophilic Hacterium Isolated from Deep Lake, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.*, 11:20-27.
- Frazier W.C., 1926. A Method for the Detection of Changes in Gelatin Due to Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 39(4):302-309.
- Gibbons N.E., 1957. The Effect Of Salt Concentrations On The Biochemical Reactions Of Some Halophilic Bacteria. *Can J Microbiol.*, 3:349–255
- Gimenez M.I., Studdert C.A., Sanchez J.J., DeCastro R.E., 2000. Extracellular Protease of *Natrialba magadii*: Purification and Biochemical Characterization. *Extremophiles*, 4:181–188.
- Grant W.D., Kamekura M., McGenitty T.J. ve Ventosa A., 2001. Order I. Halobacteriales In: Garrity G.M. ed. (2nd ed.). *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology Vol I. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.* New York, Springer.
- Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M., Radax C., Weidler G..W., Busse H.J., Stan-Lotter H., 2004. *Halobacterium noricense* sp. nov., an Archaeal Isolate from A Bore Core of An Alpine Permian Salt Deposit, Classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a Strain of *Hbt. salinarum* and Emended Description of *Hbt. salinarum*. *Extremophiles*, 8:431-439.
- Gupta R. ve Ramnani P., 2006. Microbial Keratinase and Their Prospective Application: An Overview. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 70(1):21–33.

- Gupta R., Gupta N., Rathi P., 2004. Bacterial Lipases: an Overview of Production, Purification And Biochemical Properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 64:763–781.
- Gutierrez M.C., Garcia M.T., Ventosa A., Nieto J.J. ve Ruiz-Berraquero F., 1986. Occurrence of Megaplastids in Halobacteria. *J. of Applied Bacteriology*, 61:67-71.
- Gülhan T., Aksakal A., Ekün İ.H., Savaşan S., Boynukara B., 2006. Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Humans and Pets. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30:477-482.
- Hancock A.J. ve Kates M., 1973. Structure Determination of the Phosphatidyl Glycerosulfate (diether analog) from *Halobacterium cutirubrum*. *J. Lipid Res.*, 14:422–429.
- Harmancıoğlu M. ve Dikmelik Y., 1993. *Ham Deri Yapısı, Bileşimi, Özellikleri*. Özen Ofset, İzmir. 1-145.
- Hartmann R., Sickinger H.D. ve Oesterhelt D., 1980. Anaerobic Growth of Halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(6):3821-3825.
- He M., Zou Z., Cai L., Wang G., 2007. Haloarchaea and Halophilic Bacteria in Two Hypersaline Soils of Jiangsu Province, China. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Heidemann E., 1993. *Fundamentals of Leather Manufacture*. Eduard Roether KG, Darmstadt.
- Hezayen F.F., Rehm B.H.A., Tindall B.J., Steinbuechel A., 2001. Transfer of *Natrialba asiatica* BIT to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. And Description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., A Novel Extremely Halophilic, Aerobic, Non-pigmented Member of the Archaea from Egypt that Produces Extracellular Poly (glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:1133-1142.
- Hezayen F.F., Tindall B.J., Steinbüchel A., Rehm B.H.A., 2002. Characterization of a Novel Halophilic Archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and Transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:2271–2280.

- Holmes M.L., ve Dyall-Smith M.L., 1991. Mutations in DNA gyrase Results in Novobiocin Resistance in Halophilic Archaeobacteria. *J. Bacteriol.* 173:642–648.
- Horikoshi K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 63(4):735-750.
- Hough D.W. and Danson M.J., 1989. Archaeobacteria: Ancient Organisms With Commercial Potential. *Letters in Applied Microbiology*, 9; 33-39.
- Izotova L.S., Strongin A.Y., Chekulaeva L.N., Sterkin V.E., Ostoslavskaya V.I., Lyublinskaya E.A., Timokhina E.A., Stepanov V.M., 1983. Purification And Properties Of Serine Protease From *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol.*, 155:826–830.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures And Biotechnological Applications Of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53:315–351.
- Kahraman Ö., 2008. Halofilik Mikroorganizmaların izolasyonu, İdentifikasyonu ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Ekstraselüler Enzimlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitü. Bornova-İZMİR.
- Kamekura M, Onishi H., 1974. Halophilic Nuclease From A Moderately Halophilic *Micrococcus varians*. *J Bacteriol.*, 119(2):339–344.
- Kamekura M. ve Kates M., 1999. Structural Diversty of Membrane Lipids in Members of *Halobacteriaceae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (6): 969-972.
- Kamekura M., Seno Y., Dyall-Smith M.L., 1996. Halolysin R4, A Serine Proteinase From The Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*; *gene cloning, expression and structural studies*. *Biochim Biophys Acta.*, 1294:159–167.
- Kamekura M., Seno Y., Holmes M.L., Dyall-Smith M.L., 1992. Molecular Cloning And Sequencing of The Gene For A Halophilic Alkaline Serine Protease (Halolysin) From An Unidentified Halophilic Archaea Strain (172P1) And Expression Of The Gene in *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol.*, 174:736–742.
- Kamekura M., Seno A., 1990. Halophilic Extracellular Protease From A Halophilic Archaeobacterium Strain 172 P1. *Biochem Cell Biol.*, 68(1):352-9.

- Kanlayakrit W., Bovornreungroj P., Oka T. ve Goto M., 2004. Production and Characterization of Protease from an Extremely Halophilic *Halobacterium* sp. PB407. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 38:15 - 20.
- Karaboz İ., 1988. Toprak Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kılavuzu, Ege Üniversitesi Fen. Fakültesi Teksirler Serisi, No. 80, Bornova-İZMİR.
- Karaboz İ., 1994. Deri Mikrobiyolojisi Ders Teksiri. E.Ü. Fen Fakültesi.
- Karadzic I., Masui A. ve Fujiwara N., 2004. Purification and Characterization of a Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Cutting Oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(3): 145-152.
- Kates M., 1996. Structural Analysis of Phospholipids and Glycolipids in Extremely Halophilic Archaeobacteria. *J. Microbiol. Meth.*, 25:113–128.
- Kayalvizhi N., Anthony T. ve Gunasekaran P., 2008. Characterization of the Predominant Bacteria Associated with Sheep and Goat Skin. *J. Am. Leather. Chem. Association.*, 103:182-187.
- Kebbouche-Gana S., Gana M.L., Khemili S., Fazouane-Naimi F., Bouanane N.A., Penninckx M., Hacene H., 2009. Isolation and Characterization of Halophilic Archaea Able to Produce Biosurfactants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:727–738.
- Kellermann K.F., 1915. *Micrococci* causing red deterioration of salted codfish. *Zbl Bakteriol Abt.*, 2:398-402.
- Kelly M., Norgard S. ve Liaaen-Jensen S., 1970. Bacterial Carotenoids. XXXI. C50-Carotenoids 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarium*, Especially Bacterioruberin. *Acta Chem. Scand.*, 24:2169–2182.
- Kim J. ve Dordick J.S., 1997. Unusual Salt And Solvent Dependence Of A Protease From An Extreme Halophile. *Biotech Bioeng.*, 55:471–479.
- Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J., 2001. Feather-degrading Bacillus species From Poultry Waste *Process Biochemistry*, 37:287-291.
- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:345–351.

- Klebahn H., 1919. Die Schädlinge des Klippfisches. Ein Beitrag zur Kenntnis der salzliebenden Organismen. *Mitt Inst Allg Botanik Hamburg*, 4:11–69.
- Kouker G. ve Jaeger K.E., 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied And Environmental Microbiology*, 53(1): 211-213.
- Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertle T., Bonch-Osmolovskaya E.A., 2009b. Biodiversity Of Thermophilic Prokaryotes With Hydrolytic Activities in Hot Springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl Environ Microbiol*, 75:286–291.
- Kushner D.J., 1985. The Halobacteriaceae. In: Woese C.R. ve Wolfe R.S ed.. *The bacteria. A treatise on structure and function. Archaeobacteria*. Vol 8. Academic Press, London. p. 171-214
- Kushwaha S.C., Juez-Pérez G., Rodriguez-Valera F., Kates M. ve Kushner J., 1982. Survey of Lipids of a New Group of Extremely Halophilic Bacteria from Salt Ponds in Spain. *Can. J. Microbiol.*, 28:1365–1372.
- Leffers H. Ve Garrett R.A., 1984. The Nucleotide Sequence of the 16S Ribosomal RNA Gene of the Archaeobacterium *Halococcus morrhua*. *The EMBO Journal*, 3(7):1613-1619.
- Lindner W., 1998. Wet Blue Preservatives Present and Future. *World Leather*. 61p.
- Lochhead A.G., 1934. Bacteriological Studies on the Red Discoloration of Salted Hides. *Can J Res*, 10: 275-286.
- Lu L. ve Cui H., 2001. 16S rRNA gene of *Natrinema* sp. Isolated from an Salted Fresh Fish. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Lueders T., Manefield M., Friedrich M.W., 2004. Enhanced Sensitivity of DNA- and rRNA-Based Stable Isotope Probing by Fractionation And Quantitative Analysis Of Isopycnic Centrifugation Gradients. *Environ Microbiol*, 6:73–78.
- Madigan M.T. ve Martinko J.M., 2009. Brock Microorganizmaların Biyolojisi. Çökmüş C. Ed. (11. Baskıdan Çeviri). Palme yayıncılık, Ankara.
- Margesin H. ve Schinner, F. 2001. Potential of Halotolerant And Halophilic Microorganisms For Biotechnology. *Extremophiles*, 5:73-83.

- McGenity T.J., Gemmell R.T. ve Grant W.D. 1998. Proposal of a New Halobacterial Genus *Natrinema* gen. nov., with Two Species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 48(4): 1187-1196.
- Meghji K., Ward O.P., Araujo A., 1990. Production, Purification And Properties Of Extracellular Carboxyl Esterases From *Bacillus subtilis* NRRL 365. *App. Environ. Microbiolog.*, 56: 3735-3740.
- Minegishi H., Echigo A., Kamekura M., Usami R., 2010. An Extreme Halophile in Order Halobacteriales. Published in only database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Mitchel J.W., 1987. Prevention of Bacterial Damage on Brine Cured and Fresh Cattlehides. *Journal of American Leather Chemists Association*, 82: 372-383.
- Montalvo-Rodriguez R., Ruiz-Acevedo A., Lopez-Garriga J., 1997. New Isolates of Extremely Halophilic Archaeobacteria (Halobacteria) from Puerto Rico and the Caribbean. *Caribbean Journal of Science*, 33:98–104.
- Montalvo-Rodriguez R., Vreeland R.H., Oren A., Kessel M., Betancourt C., Lopez-Garriga J., 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., A Novel Halophilic Archaeon From Puerto Rico. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 48:1305-1312.
- Morello J.A., Granato P.A., Mizer H.E., 2003. *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care*. (7th ed.). McGraw Hill Publishers. 304 p.
- Mukherjee J., Webster N., Llewellyn L.E., 2009. Purification and Characterization of a Collagenolytic Enzyme from a Pathogen of the Great Barrier Reef Sponge, *Rhopaloeides odorabile*. *PLoS ONE* 4(9): e7177.
- Müller-Santos M., de Souza E.M., Pedrosa F.O., Mitchell D.A., Longhi S., Carriere F., Canan S., Krieger N., 2009. First Evidence For The Salt-Dependent Folding And Activity of An Esterase From The Halophilic Archaea *Haloarcula marismortui*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(8):719–729.
- Nandy S.C. ve Sen S.N., 1968. Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Mineral Salts on The Growth and Chromogenesis of *Sarcina litoralis*, a Halophilic Organism. *Biological Aspects of Leather Manufacture*, 59-65.

- Nieto J.J, Fernandez-Castillo R., Marquez M.C., Ventosa A., Quesada E., Ruiz-Berraquero F., 1989. Survey of Metal Tolerance in Moderately Halophilic Eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 55(9):2385–2390.
- Norberg P. ve Von Hofsten B., 1969. Proteolytic Enzymes From Extremely Halophilic Bacteria. *J Gen Microbiol.*, 55:251–256.
- Oesterhelt D. ve Stoeckenius W., 1971. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 233:149–152.
- Oesterhelt D., 1998. The Structure ve Mechanism of The Family of Retinal Proteins From Halophilic Archaea. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:489-500.
- Oktay A., 2004. Deri Teknolojisinde Mikrodalga Enerjisinin Etkinliđi. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 657-666.
- Oppong D., Bryant S.D., Rangarajan R., Steele S., Radwell D. ve Hyllengren L., 2006. Application of Molecular Techniques to Identify Bacteria Isolated From The Leather Industry. *J. Am. Leather. Chem. Association.*, 101: 140-145.
- Oren A. ve Rodriguez-Valera F., 2001. The Contribution of Halophilic Bacteria to The Coloration of Saltern Crystallizer Ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 123-130.
- Oren A. ve Trüper H.G., 1990. Anaerobic Growth of Halophilic Archaeobacteria By Reduction of Dimethylsulfoxide And Trimethylamine *N*-oxide. *FEMS Microbiol. Letters*, 70: 33-36.
- Oren A., 2002. Halophilic Microorganisms and Their Environments. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht, 575p.
- Oren A., 2006. The Order Halobacteriales. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. ve Stackebrandt E., eds. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*, (vol. 3). New York: Springer. 113–164.
- Oren A., ve Gurevich P., 1993. Characterization of The Dominant Halophilic Archaea in A Bacterial Bloom in the Dead Sea. *FEMS microbiology Ecology*, 12: 249-256.
- Oren A., ve Litchfield D. C., 1999. A Procedure For the Enrichment and Isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 173:353-358.

- Oren A., Ventosa A. ve Grant W.D., 1997. Proposed Minimal Standarts For Description of New Taxa in The Order *Halobacteriales*. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 47(1): 233-238.
- Orlita A., 2004. Microbial Biodeterioration of Leather and Its Control: a Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 157-163.
- Ozcan B., Cokmus C., Coleri A., Caliskan M., 2006. Characterization of Extremely Halophilic *Archaea* Isolated from Saline Environment in Different Parts of Turkey. *Microbiology*, 75(6):739–746.
- Ozcan B., Ozyilmaz G., Cokmus C., Caliskan M., 2009. Characterization Of Extracellular Esterase And Lipase Activities From Five Halophilic Archaeal Strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:105–110.
- Pecher T. ve Böck A., 1981. In vivo Susceptibility Of Halophilic And Methanogenic Organisms To Protein Synthesis Inhibitors. *FEMS Microbiol. Letters*, 10; 295-297.
- Pfeifer F., Blaseio U. ve Ghahraman P., 1988. Dynamic Plasmid Populations in *Halobacterium halobium*. *J. of Bacteriology*, 170(8):3718-3724.
- Poulsen V.A., 1879. Om Nogle Mikroskopiske planteorganismer. Et Morfologisk og Kritisk Studie. *Vidensk Medd Dansk Naturh Foren Kbh* 1879-1880, 231-254.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2002. *Microbiology* (5th ed.). Macgraw Hill Publishers. 18-68.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Desphande V.V., 1998. Molecular And Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62:597-635.
- Reeder F., 1999. Modern Beamhouse Procedures Soaking and Liming Leather Technologists Pocket Book. *The Society of Leather Technologists and Chemists*, East Yorkshire, UK.
- Riffel A., Lucas F., Heeb P., Brandelli A., 2003a. Characterization of a New Keratinolytic Bacterium Capable of Completely Degrades Native Feather Keratin. *Arch. Microbiol.*, 179: 258–265.

- Riffel A., Ortolan S., Brandelli A., 2003b. Dehairing Activity of Extracellular Proteases Produced By Keratinolytic Bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 78:855-859.
- Ring G. ve Eichler J., 2004. Extreme Secretion: Protein Translocation Across The Archaeal Plasma Membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(1):35-45.
- Rodriguez-Valera F., Nieto J.J., ve Ruiz-Berraquero F., 1983. Light as an Energy Source in Continuous Cultures of Bacteriorhodopsin-containing Halobacteria. *Appl. Env. Microbiol.*, 45:868–871.
- Rodriguez-Valera F., Ventosa A., Juez G. ve Imhoff J.F., 1985. Variation of Environmental Features And Micobial Populations With Salt Concentrations in A Multi-Pond Saltern. *Microb. Ecol.*, 11; 107-115.
- Roh S.W., Nam Y.-D., Chang H.-W., Kim K.-H., Lee H.-J., Oh H.-M., Bae J.-W., 2007. *Natronococcus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from shrimp jeotgal, a traditional fermented seafood from Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2129-2131.
- Röder R. ve F Pfeifer., 1996. Influence of Salt on the Transcription of the Gas Vesicle Gene of *Haloferax mediterranei* and Identification of the Endogenous Transcriptional Activator. *Microbiology UK.*, 142:1715–1723.
- Ryu K., Kim J., Dordick J.S., 1994. Catalytic Properties And Potential Of An Extracellular Protease From An Extreme Halophile. *Enzyme Microbiol Technol.*, 16:266–275.
- Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A., 2003. Diversity Of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, 94:295–300.
- Sarı Ö. ve Eke Bayramoğlu E., 2004. Deri İşetmelerinde Karşılaşılan Bazı Fungal Sorunlar ve Ortam Dezenfeksiyonun Önemi. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 121-129.
- Sarı, Ö. 2005. Tabaklama Maddeleri. Yayınlanmamış Ders Notları.
- Saunders N.F.W., Thomas T., Curmi P.M.G., Mattick J.S., Kuczek E., Slade R., Davis J., Franzmann P.D., Boone D., Rusterholtz K., Feldman R., Gates C., Bench S., Sowers K., Kadner K., Aerts A., Dehal P., Detter C., Glavina T., Lucas S., Richardson P., Larimer F., Hauser L., Land M., Cavicchioli R., 2003. Mechanisms of Thermal Adaptation Revealed From the Genomes of the Antarctic

- Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Research*, 13:1580-1588.
- Schoop, G. (1935). *Halococcus litoralis*, Ein Obligat Halphiler Farbstoffbildner. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 43, 817–820 (in German).
- Sellek G.A., Chaudhuri J.B., 1999. Biocatalysis in Organic Media Using Enzymes From Extremophiles. *Enzyme Microbiol Technol.*, 25:471–482.
- Shand R.F., Perez A.M., 1999. Haloarchaeal Growth Physiology. In: Seckbah, J., Ed. *Enigmatic Microorganisms and life in Extreme Environment*. Kluwer Academic Publisher Dordrecht. 414-424.
- Sharphouse J.H., 1983. *Leather Technicians Handbook*. Vernon Lock Ltd, London.
- Shede P.N., Kanekar P.P, Polkade A.V., Dhakephalkar P.K. ve Sarnaik S.S., 2008. Bacterial Succession on Raw Buffalo Hide and Their Degradative Activities During Ambient Storage. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 65-74.
- Shi W., Tang X.F., Huang Y., Gan F., Tang B., Shen P., 2006. An Extracellular Halophilic Protease SptA from A Halophilic Archaeon *Natrinema* sp. J7: Gene Cloning, Expression And Characterization. *Extremophiles*, 10:599-606.
- Shimane Y., Hatada Y., Minegishi H., Echigo A., Nagaoka S., Miyazaki M., Ohta Y., Maruyama T., Usami R., Grant W. D. & Horikoshi K., 2011. *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., An Aerobic, Extremely Halophilic Member of the Archaea Isolated From Commercial Salt Made in Okinawa, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:2266–2270.
- Smith P.B., Hancock G.A. D., Rhoden L., 1969. Improved Medium for Detecting Deoxyribonuclease-Producing Bacteria. *Appl. Microbiol.*, 18(6):991-993.
- Stan-Lotter H, Pfaffenuemer M, Legat A, Busse H-J, Radax C, Gruber C (2002) *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an Archaeal Isolate from a Permo-Triassic Alpine Salt Deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:1807-1814.
- Stan-lotter H., Doppler E., Jarosch M., Radax C., Gruber C., Inatomi K., 1999. Isolation of A Chymotrypsinogen B-Like Enzyme From The Archaeon *Natronomonas pharaonis* And Other Halobacteria. *Extremophiles*, 3:153–161.

- Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Revina L.P., Gryaznova Y.B., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Y., Ivanova I.I., 1992. A Serine Proteinase of An Archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei* a Homologue Of Eubacterial Subtilisins. *Biochem J.*, 285:281–286.
- Studdert C.A., DeCastro R.E., Seitz K.H., Sanchez J.J., 1997. Detection And Preliminary Characterization Of Extracellular Proteolytic Activities Of The Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus occultus*. *Arch Microbiol.*, 168:532–535.
- Studdert C.A., Herrera Seitz M.K., Plasencia Gil M.I., Sanchez J.J., DeCastro R.E., 2001. Purification and Biochemical Characterization Of The Haloalkaliphilic Archaeon *Natronococcus occultus* Extracellular Serine Protease. *J Basic Microbiol.*, 41:375–383.
- Tamer A.Ü., Uçar F., Ünver E., Karaboz İ., Bursalıoğlu M., Oğultekin R., 1989. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teksirler Serisi No:55, İzmir.
- Tancous J.J., 1986. *Skin and Hide Leather Defects*. USA, 363p.
- Temizkan G., Arda N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. BİYOGEM no:2, 102s
- Terry C.A., Knapp R.H., Edwards J.W., Mies W.L., Savell J.W. ve Cross H.R., 1990. Yields of by-Products From Different Cattle Types. *Journal of Animal Sciences*, 68:4200–4205.
- Thomson J.A., Woods D.R. Ve Welton R.L., 1972. Collagenolytic Activity Of Aerobic Halophiles From Hides. *Journal of General Microbiology*, 70:315-319.
- Thorstensen T.C., 1993. *Practical Leather Technology (4th.ed.)*. Kriger Publishing Company Krigerdrive, Malabar, Florida. 340p.
- Tindall B.J., Mills A.A., Grant W.D., 1984. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov. Two Genera of Haloalkaliphilic Archaeobacteria. *System Appl Microbiol.*, 5:41-57.
- Toptaş A., 1993. *Deri Teknolojisi*. İ.Ü. Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu. Sade Ofset, İstanbul. 1-280.

- Ulusoy E., Özbek A. ve Eke Bayramoğlu E., 2004. Deri İşlentisinde Makinanın Yeri Ve Yapılan Yanlışlar. *I. Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 617-624.
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A.,1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2):504.
- Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C. ve Sreeramulu K., 2006. Purification And Characterization of A Thermostable, Haloalkaliphilic Extracellular Serine Protease From The Extreme Halophilic Archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea.*, 2: 51-57.
- Wang Q.-F., Li W., Yang H., Liu Y.-L., Cao H.-H., Dornmayr-Pfaffenhuemer M., Stan-Lotter H., Guo G.-Q., 2007. *Halococcus qingdaonensis* sp. nov., A Halophilic Archaeon Isolated From A Crude Sea-Salt Sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:600-604.
- Wieland F., Paul G. and Sumper M., 1985. Halobacterial Flagellins are Sulfated Glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 260:15180-15185.
- Wu I., Chow K. ve Mark K., 1983. The Rol of Pigments in *Halobacterium Cutirubrum* Against UV Irradiation. *Microbiol. letter*, 24: 85-90.
- Xin H, Itoh T, Zhou P, Suzuki K, Kamekura M, Nakase T., 2000. *Natrinema versiforme* sp. nov., An Extremely Halophilic Archaeon From Aibi Salt Lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50(3):1297-1303.
- Yakalı T. ve Dikmelik Y., 1994. *Deri Teknolojisinde Yaş İşlemler*. Özen Ofset, İzmir.
- Yang X. ve Cui H.L., 2012. *Halomicrobium zhouii* sp. nov., A Halophilic Archaeon From A Marine Solar Saltern. *Int JSyst Evol Microbiol*, 62:1235–1240.
- Yapıcı A.N. ve Tozan M., 2004. Deri İşlentisinde Kullanılan Suyun Minimizasyonu ve Proseslerin Optimizasyonu. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 335-341.
- Yapıcı B., 1994. Tabaklanmış Derilerde Sık Rastlanabilen Küflerin Gelişimi Üzerine Çeşitli Antifungal Bileřiklerin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir.
- Yaşa İ., Kahraman Ö., Tekin E. ve Koçyiđit A., 2008. Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 25(2):117-121.

- Yaşar İ., Kılınç A., 2002. Pamuk Liflerinden İzole Edilen Selüloz Üreticisi Fungusların Selüloz Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(3), 57-62.
- Yatsunami R., Kawakami T. ve Ohtani H., 2000. A Novel Bacteriorhodopsin Like Protein From *Haloarcula japonica* strain TR-1: Gene Cloning, Sequencing, And Transcript Analysis. *Extremophiles*, 4:109-114.
- Yıldırım N., 2004. Deri Boyamaya Etki Eden Analitik Parametrelerin Optimizasyonu. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 215-226.
- Yılmaz P., 2010. Tuzlanmış Derilerden İlimli ve Aşırı Halofil Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitü. İstanbul.
- Zengin G. ve Yılmaz B., 2004. Klinoptilolit Zeolitinin Deri Sanayisinde Kullanılabilir Olanakları İle Koyun Derilerinin Fiziksel Ve Kimyasal Özelliklerine Olan Etkilerinin Araştırılması. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, Türkiye. 173-177.
- Zhang M., Dou W., Zhang X., Xu H. Xu Z., 2008. Screening and Identification of a Halobacteria Strain Producing Halophilic Lipase and Characterization of the Enzyme. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

## Ekler

### Ek1. 103 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1278

Gen Bankası Erişim Numarası: DQ309081.1

TGGATCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCAGATAGCTC  
AGTAACACGTGGCCAACTACCCTGTTCGATCGGGACACCCTCGGGAACTGAG  
GCTAATCCCGGATACGGCTCGCTGCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCGAAACGTTC  
AGGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGC  
CCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAAAGCAAGAGCCCGGAGACGGA  
ATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTAC  
ACTGCACGCGAGTGCATAGGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATACAGTCCTCG  
CTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCC  
AGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTA  
AAGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCACGCCTAACGT  
GCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGGGTAC  
GTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAA  
GCGCTCTGGAAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTACAGAA  
CCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGG  
CACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCT  
GGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTA  
CAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGC  
ATCGACAGTAGCTGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTAGAGCTACTGAGAG  
GAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGC  
AACGAGCGAGACCCGCACGCCTAATTGCCAGCAACACCCACGAGGTGGTTGG  
GTACATTAGGCGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGT  
AGGTCAGTATGCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGA  
CAGTGGGATGCCACCCCGAGAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTCGATCGTAGT  
TCGGATTGCGGACTGAAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
GCCTCATGAAGG

## **Ek2. 107 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1285

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

TTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCAGATA  
GCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATAGATCCGGCCAACCTCGGGAAAC  
TGAGGCTAATCCGGAATAACGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGAGAAAC  
GCTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC  
GGTATCTGAGACAAGATAACGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTC  
CTCGCTTTTCTCAACCGTAGGGAGGTTGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATAACGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTA  
ACGCACAGGCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGG  
GGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGG  
CGAAAGCGCCTCAGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTC  
ACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGG  
TGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGAC  
CGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCAGCATCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCAC  
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAG  
TCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTG  
GTTGGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCA  
ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGT  
CGAGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGAT  
CGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGT  
AATCGCGCCTCAGAAGGGCGC

### **Ek3. 112 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1289

Gen Bankası Erişim Numarası: AB477227.1

TTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCAGATA  
GCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTGTCGATCGGGACACCCTCGGGAAAC  
TGAGGCTAATCCCGGATACGGCTCGCTGCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCGAAAC  
GTTTCAGGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAAAGCAAGAGCCC GGAGAC  
GGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCGAGTGCGATAGGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATACAGTC  
CTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATAACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCACGCCTA  
ACGTGCGGGCGTCCGGTGGAACCTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGG  
GTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGC  
GAAAGCGCTCTGGAAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCA  
CGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGT  
GTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACC  
GCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGC  
ACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCAC  
CAGCATCGACAGTAGCTGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTAGAGCTACTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCACGCCTAATTGCCAGCAACACCCTTGAGGTGGT  
TGGGTACATTAGGCGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTGC  
AGACAGTGGGATGCCACCCCGAGAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTCGATCGT  
AGTTCGGATTGCGGACTGAAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAAT  
CGCGCCTCAGAAGAGCGCGGTG

#### **Ek4. 114 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1292

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

GCTATTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCA  
GATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATAGATCCGGCCAACCTCGGG  
AAACTGAGGCTAATCCGGAATAACGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGAG  
AAACGCTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGG  
TAACGGCCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGA  
GACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAA  
CCTTTACTGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATA  
GTCCTCGCTTTTCTCAACCGTAGGGAGGTTGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGAC  
CGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATT  
GGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGC  
CTAACGCACAGGCGTCCGGTGGAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCAG  
AGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGG  
TGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGG  
GTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCT  
AGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA  
GACCGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGG  
GAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATC  
TCACCAGCATCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGC  
CACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTT  
AAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTTG  
GTGGTTGGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGG  
GCAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAAT  
GGTCGAGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTC  
GATCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGT  
AGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGT

**Ek5. 116 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1278

Gen Bankası Erişim Numarası: FJ686124.1

GTCCGAATTTGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAGCTCA  
GTAACACGTGGCCAACTACCCTGTGATCGGGACACCCTCGGGAACTGAGG  
CTAATCCCGGATACGGCTCGCTGCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCGAAACGTTCA  
GGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCC  
CACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAAAGCAAGAGCCCGGAGACGGAA  
TCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACA  
CTGCACGCGAGTGCGATAGGGGGACTCCAAGTGCGAGGGCATAACAGTCCTCGC  
TTTTTGCACCGTAAGGTGGTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCA  
GCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAA  
AGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCACGCCTAACGTG  
CGGGCGTCCGGTGGAAGCTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGGGTACG  
TCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAG  
CGCTCTGGAAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCACGAAC  
CGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGGC  
ACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCTG  
GGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTAC  
AACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCA  
TCGACAGTAGCTGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTAGAGCTACTGAGAGG  
AGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCA  
ACGAGCGAGACCCGCACGCCTAATTGCCAGCAACACCCTTGAGGTGGTTGGGT  
ACATTAGGCGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAG  
GTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACA  
GTGGGATGCCACCCCGAGAGGGGGCGCTAATCTCCGAACTCGATCGTAGTTC  
GGATTGCGGACTGAAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGC  
CTCAAAGGGC

## **Ek6. 123 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1283

Gen Bankası Erişim Numarası: X00662.1

GGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGCTC  
CGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGGATATCCTCGGGAAACTGAG  
GTCAATCCCAGATACTGCTTTCATGTTGGAATACAGAAAGTCGGAAACGGTCC  
GCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCC  
CACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGTAT  
CTGAGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACA  
CTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTCCTCGC  
TTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCA  
GCCCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCTA  
AAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCGGGAAATCCACCCGCTCAACGG  
GTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGTA  
CGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCGGTAGCGAA  
AGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCGA  
ACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTG  
GCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCGC  
CTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCAC  
TACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCG  
GCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCACTGA  
GAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCA  
GGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGCT  
GGGTACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAACG  
GTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGA  
GACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTGTA  
GTTCCGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATC  
GCATTTTCAGAAGAGTGCG

## Ek7. 125 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi

Baz Sayısı: 1268

Gen Bankası Erişim Numarası: AB549236.1

CGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGCTCCGTA  
ACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTA  
ATTCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAACACAGAAAGTCGGAAACGGTCCGCCG  
CCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACC  
GTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGTATCTGA  
GACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGC  
ACGCCAGTGCATAAGGGGACCCCGAGTGCAGGGGCATACAGTCCTCGCTTTT  
CGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCC  
GCCGCGGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCTAAAGC  
GTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCCGGGAAATCCACCCGCTCAACGGGTGG  
ACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGTACGTC  
CGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGAAAGC  
GTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCGAACC  
GGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTGGCG  
TTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCGCCTG  
GGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTAC  
AACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCGGCA  
CCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCACTGAGAG  
GAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAGTCAGGC  
AACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGCTGGG  
TACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTA  
GGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGA  
CAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTCTAGT  
TCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
ATTTCA

## **Ek8. 129 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1276

Gen Bankası Erişim Numarası: EF533956.1

GGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGGCTCGTGGCGAATAGCTC  
AGTAACACGTGGCCAAACTACCCTTCGGAGCACGATACCCTCGGGAAACTGAG  
GCTAATAGTGCATACCACAATCCAGCTGGAATGAGGATTGTGTCAAACGCTCC  
GGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCC  
CACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGACGGAA  
TCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACA  
CTGCACGCCAGTGCGATAAGGGAATCCCAAGTGCGCAGGCATAGAGCCTGCG  
CTTTTGTACACCGTAGGGAGGTGTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCC  
AGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCCTA  
AAGCGTCCGTAGCTGGCCGCACAAGTCCATCGGAAAATCCACCCGCCCAACGG  
GTGGGCGTCCGGTGGAAACTGTGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTA  
CGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAA  
AGCACGTCGCGAGGACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGA  
ACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCTGGCCGTAAACAATGCCTGCTAGGTGTG  
GCTCCCGCTACGAGCGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGGCCGCC  
TGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACT  
ACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAG  
CATCGACTGTAGTAATGACGACCAGGTTGATGACCTTGTCCGAGCTTCAGAGA  
GGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGG  
CAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCCAGCAGCACTGCGAAGTGGCTGGG  
GACAGTAGGGAGACCGCCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTA  
GGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGAC  
AAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAAACTCGATCGTAGTT  
CGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATCCGGTAGTAATCCCT  
GGCCAAGCGCG

**Ek9. 140 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1285

Gen Bankası Erişim Numarası: FJ686129.1

TTGGGAATCGATTTAAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGGCTCGTGGCGAAT  
AGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCGGAGCACGATACCCTCGGGAAA  
CTGAGGCTAATAGTGCATAACCACAATCCAGCTGGAATGAGGATTGTGTCAAAC  
GCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGAC  
GGAATCTGAGACAAGATTCCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCCAGTGCGATAAGGGAATCCCAAGTGCGCAGGCATAGAGCC  
TGCCTTTTTGTACACCGTAGGGAGGTGTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATGGCCGATCTTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCACAAGTCCATCGGAAAATCCACCCGCCCA  
ACGGGTGGGCGTCCGGTGGAACTGTGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACG  
GGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGG  
CGAAAGCACGTCGCGAGGACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTC  
TCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTGGCCGTAAACAATGCCTGCTAGG  
TGTGGCTCCCGCTACGAGCGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGGC  
CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCAGCATCGACTGTAGTAATGACGACCAGGTTGATGACCTTGTCCGAGCTTCA  
GAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGT  
CAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCCAGCAGCACTGCGAAGTGGC  
TGGGGACAGTAGGGAGACCGCCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCG  
AGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAAACTCGATCGT  
AGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAAT  
CGCGTGTCACAAGCGCGCG

**Ek10. 142 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1232

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

CGTGGCAGATAGCTAGTAACCGTGGCCAAACTTCCCTATAGATCCGGGCAACC  
TCGGGGAAGTGGGCTAATCCGGAATAACGCTTTCAGCTTGAATGGCGGGACC  
GGAAACCGTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTCCGGCCGATTAGGTAGACGGTGG  
GGTAACGGCCCACCGTCCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGACCAAGACCCGG  
AGACGGTATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAA  
ACCTTTACACTGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATAT  
AGTCCTCGCTTTTCTCGACCGTAGGGAGGTTGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGA  
CCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGGCCGCTGTTAT  
TGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCG  
CCTAACGCACAGGCGTCCGGTGGAAACTGTCTGGCTTGGGACCGGAAGACCTG  
AGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGG  
TGGCGAAAGCGCCTCAGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGG  
GTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCT  
AGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA  
GACCGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAACGAATTGGCGGGG  
GAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATC  
TCACCAGCATCGACAGGTTGCAGTGCCAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGC  
CACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTT  
AAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTT  
GTGGTTGGGTACATTAAGAGGACTGCCACTGCCAACCTGAGGAAGGAGCGGG  
CAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATG  
GTCGAGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGGAGCTAATCTCCGAAACTCG  
GTCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTA  
GTAATCGCGCCTCAGAAG

**Ek11. 144 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1275

Gen Bankası Erişim Numarası: HQ215547.1

CGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGGGTTTCAGACCCGTGGCAGATAGCTCAGTA  
ACACGTGGCCCTTTACCCTGTGGATCATGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAA  
TGATCAATACAGCTCACAGATTTGAATATCGTGAGCTGGAAACGCTACGGCGC  
TGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGT  
GCCGATAATCGGTACAGGTGGTGAGAGCCAGAGCCTGGAGACGGAATCTGAG  
ACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCAC  
GACAGTGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCGAGGGCATATAGTCCTCGCTTTTGT  
GTACCGTAAGGTGGTCGACGAATAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGC  
CGCGGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGTCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGT  
CCGTAGCTGGCCGAGCAAGTCTGTCGGGAAATCCACTCGCTCAACTGCTGGAC  
GTCCGGCGGAAACTGTTCCGGCTTGGGACCGGAAGATCTGAGGGGTACGTCCGG  
GGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCT  
TGGAAGCACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGGTAGGGTTTTGAACCGGAT  
TAGATTCCC GGGTAGTTCTAACCGTTAACGATGCCTGGTAGGTTTGGGGCCGG  
GTTTCGAGCCTTCGCTGTTCCGCAGTGAAGACGTAAGCGGGCCGCGCGTGAAGT  
ACGTCTGCACGGATGTGACTTAAAGGAATAGGCGGGGGAGCGCTACACCCGG  
AGGAGCGCGCGGTTTAATAGGACTCTACGCCGACATATCTCCAGCGCCGACA  
CCACTGATGTCGCTCACGTTGACGTCCCTTCCCGCGACGCTGTTGAGAGGAGGT  
GCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCATCCTGTAAAGTCAGGCAACGA  
GCGAGACCCGTATCTGTAATTGCCAGCAATACCCTTGTGGTAGTTGGGTACTTT  
ACGGAGACTGCCACGGCTAACGTGGAGGAAGGAGCGGGCAACGGTAGGTCAG  
CATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGCCGGGACAACGG  
GTCGCAACGCCGAGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAACCCGGTCGTAGTTCGGAT  
TGTGGGCTGAAACTCGCCCAGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTCAG  
TAGCGCG

**Ek12. 149 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1283

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

TGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAG  
CTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATAGATCCGGCCAACTCGGGAACT  
GAGGCTAATCCGGAATATCGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGTGAAACGC  
TCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTA  
CACTGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTCCTC  
GCTTTTCTCGACCGTAGGGAGGTGCGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCGCGGTAATAACCGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTAACG  
CACAGGCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGT  
ACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGA  
AAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACG  
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGT  
GACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGC  
CTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCAC  
TACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCA  
GCATCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCACTGA  
GAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCA  
GGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTGGTT  
GGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACG  
GTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTCGA  
GACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGATCGTA  
GTTCCGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATC  
GCGCCTCAGAAGGGCG

**Ek13. 150 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1285

Gen Bankası Erişim Numarası: AF367370.2

TGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAG  
CTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCAAATAACCTCGGGAACT  
GAGGCTAATGTGGAATAGCGTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACGCGAAACGT  
TACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTA  
CACTGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCCTC  
GCTTTTCACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAACG  
CGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGT  
ACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGA  
AAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACG  
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGT  
GGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCG  
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
AGCATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTCGTGGTGGT  
TGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTTCGT  
AGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAAT  
CGCGCCTCAGAAGGGCGCG

**Ek14. 151 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1282

Gen Bankası Erişim Numarası: AF367370.2

AGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTC  
AGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATGGATCCAAATAACCTCGGGAAACTGAG  
GCTAATGTGGAATAGCGTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACGCGAAACGTTAC  
GGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCC  
ACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATC  
TGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACAC  
TGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATAGTCCTCGCT  
TTTCACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAG  
CCGCCGCGTAATAACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAAA  
GCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAACGCGC  
GGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACG  
TCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAA  
GCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCCACGAA  
CCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGG  
CACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCT  
GGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTA  
CAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGC  
ATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTGAGA  
GGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGG  
CAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTCGTGGTGGTTGG  
GTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGT  
AGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGA  
CAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTCTAGT  
TCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
GCCTCAGAAGGGCGCG

**Ek15. 153 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1289

Gen Bankası Erişim Numarası: AF367370.2

TTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGGCTCGTAGCAGATA  
GCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCAAATAACCTCGGGAAAC  
TGAGGCTAATGTGGAATAGCGTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACGCGAAACG  
TTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACG  
GCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG  
GTATCTGAGACAAGATAACGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTT  
ACACTGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCGAGGGCATATAGTCCT  
CGCTTTTCACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTG  
CCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCC  
TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAAC  
GCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGG  
TACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCG  
AAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCAC  
GAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTG  
TGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCG  
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
AGCATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTCGTGGTGGT  
TGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTTCGT  
AGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAAT  
CGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTG

**Ek16. 213 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1274

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

GTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCAGATAGCTCA  
GTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGGCCAACTCGGGAACTGAGG  
CTAATCCGGAATACCGCTTTCAGCCTGGAATGGCGAGAGCGAGAAACGCTCCG  
GCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCA  
CCGTGCCAATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCT  
GAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACT  
GCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTCCTCGCTT  
TTCTCGACCGTAGGGAGGTTGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGC  
CGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGGCCTAAAG  
CGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTAACGCACA  
GGCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTC  
TGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGC  
GCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACC  
GGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTTTGCTAGGTGTGACA  
CAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCTGG  
GAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACA  
ACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCAT  
CGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCACTGAGAGG  
AGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCA  
ACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTGGTTGGGT  
ACATTAAGAGGACTGCCATTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAG  
GTCAGTATGCCCCGAATGTGCGGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGACA  
GTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGATCGTAGTTC  
GGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGC  
CTCAGAA

**Ek17. 221 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1282

Gen Bankası Erişim Numarası: AB549236.1

GGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGCTC  
CGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGAATACCCTCGGGAAACTGAG  
GCTAATTCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAACACAGAAAGTCGGAAACGGTCC  
GCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCC  
CACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGTAT  
CTGAGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACA  
CTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTCCTCGC  
TTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCA  
GCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCTAA  
AGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCTGGGAAATCCACCCGCTCAACGGG  
TGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGTAC  
GTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGAA  
AGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCGA  
ACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTG  
GCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCGC  
CTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCAC  
TACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCG  
GCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCACTGA  
GAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCA  
GGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGCT  
GGGTACATTAGGGAGACTGCCGTGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAACG  
GTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGA  
GACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTGTA  
GTTCCGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATC  
GCATTTTCAGAAGAGTGCG

**Ek18. 226 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1275

Gen Bankası Erişim Numarası: AB477232.1

CGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTA  
ACACGTGGCCAAATTACCCTGTTCGAGCGGACCAACCTCGGGAAACTGAGGCTA  
ATCCCGCATACTACTCTCAGGCTGGAATTGCAGAGAGTTCGAAACGCTCCGGC  
GCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCAC  
CGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCAGGACGGTATCTG  
AGACAAGATAACGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTCTG  
CACGCCAGTGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCGAGGGCATAGCGCCCTCGCTTT  
TCTGCACCGTAAGGTGGTGCAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCC  
GCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGGCCGCTGTTATTGGGCCTAAAGC  
GTCCGTAGCTGGCCAGGCAAGTCTATCGGGAAATCTCCCCGCTTAACGGGGAG  
GCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGGGTACGTCC  
GGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCG  
CTCTGGAAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCG  
GATTAGATAACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGCGCCAC  
AGGCTACGAGCCTGTGGTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCCGCCTGG  
GAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACA  
ACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCAT  
CGACAGTAGGAGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACCAGACCTACTGAGAGGA  
GGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAGTCAGGCAA  
CGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTGGTTGGGTA  
CATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGG  
TCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGACAG  
TGGGACGCAACCCCGAGAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTCGATCGTAGTTCG  
GATTGCGGACTGAAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCCGT  
TCAGTAGACG

**Ek19. 305 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1287

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

TGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAG  
CTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATAGATCCGGCCAACTCGGGAAACT  
GAGGCTAATCCGAATAACGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGAGAAACG  
CTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACG  
GCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG  
GTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTT  
ACACTGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTCCT  
CGCTTTTCTCGACCGTAGGGAGGTCGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGGTG  
CCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGGCC  
TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTAAC  
GCACAGGCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGG  
TACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCG  
AAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCAC  
GAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTG  
TGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCG  
CCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
AGCATCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCACTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTGGT  
TGGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTGC  
AGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGATCGT  
AGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAAT  
CGCGCCTCAGAAGGGCGCGGT

**Ek20. 312 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1276

Gen Bankası Erişim Numarası: AB549236.1

CGGGGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAGATAG  
CTCCGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGGATACCCTCGGGAAACT  
GAGGCCAATCCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAACACAGAAAGTCGGAAACGG  
TCCGCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACG  
GCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACG  
GTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTT  
ACACTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTCC  
TCGCTTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGT  
GCCAGCCGCCGCGGTAATAACGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGC  
CTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCGGGAAATCCACCCGCTCAA  
CGGGTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAG  
GTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGC  
GAAAGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCT  
CGAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGT  
GTGGCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGC  
CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCGGCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCAC  
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAG  
TCAGGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTG  
GCTGGGTACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCA  
ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGC  
CGAGACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTC  
GTAGTTCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTTCGGTAGTA  
ATCGCATTTTCAG

**Ek21. 313 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1287

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

TTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCAGATA  
GCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATAGATCCGGCCAACCTCGGGAAAC  
TGAGGCTAATCCGGAATAACGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGAGAAAC  
GCTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC  
GGTATCTGAGACAAGATAACGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTC  
CTCGCTTTTCTCAACCGTAGGGAGGTTGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATAACGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTA  
ACGCACAGGCGTCCGGTGGAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGG  
GGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGG  
CGAAAGCGCCTCAGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTC  
ACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGG  
TGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGAC  
CGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCAGCATCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCAC  
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAG  
TCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTG  
GTTGGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCA  
ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGT  
CGAGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGAT  
CGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGT  
AATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGG

**Ek22. 410 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1274

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028186.1

GGGGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGC  
TCCGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGGATACCCTCGGGAAACTG  
AGGTCAATCCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAACACAGAAAGTCGGAAACGGT  
CCGCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTA  
CACTGCACGCCAGTGCATAAGGGGACCCCGAGTGCAGGGGCATACAGTCCTC  
GCTTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCCGGTAATAACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCCGGAAATCCACCCGCTCAACG  
GGTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGT  
ACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCGGTAGCGA  
AAGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCG  
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGT  
GGCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCG  
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
GGCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTTTGATGAGCTTACTTGAGCCACTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGC  
TGGGTACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTCGT  
AGTTCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAAT  
CGCATTCA

**Ek23. 415 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1291

Gen Bankası Erişim Numarası: EU557270.1

TTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATA  
GCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAAC  
TGAGGCTAATTCGGAATACGATTCCTGCTGGAGTGGCGTGAATCCGAAACG  
CTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACG  
GCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG  
GTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTT  
ACACTGCACGAAAGTGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCCT  
CGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTG  
CCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCC  
TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCATGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTTAAC  
GCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGG  
TACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCG  
AAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCAC  
GAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTG  
TGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGCAGGGAAGCCGTGAAGCAGACC  
GCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGC  
ACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCAC  
CAGCATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATT  
GAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGT  
CAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCTAGCGGTGGT  
TGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTCGGTTCGT  
AGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAAT  
CGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAAT

**Ek24. 505 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1284

Gen Bankası Erişim Numarası: AF367370.2

AGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTC  
AGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATGGATCCAAATAACCTCGGGAAACTGAG  
GCTAATGTGGAATAGCGTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACGCGAAACGTTAC  
GGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCC  
ACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATC  
TGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACAC  
TGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATAGTCCTCGCT  
TTTCACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAG  
CCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAAA  
GCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAACGCGC  
GGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACG  
TCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAA  
GCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCCACGAA  
CCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGG  
CACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCT  
GGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTA  
CAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGC  
ATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTGAGA  
GGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGG  
CAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTCGTGGTGGTTGG  
GTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGT  
AGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGA  
CAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTCTAGT  
TCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
GCCTCAGAAGGGCGCGGT

**Ek25. 511 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1284

Gen Bankası Erişim Numarası: AB477971.1

GGGGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGC  
TCCGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGGATATCCTCGGGAACTG  
AGGTCAATCCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAATACAGAAAGTCGGAAACGGT  
CCGCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTA  
CACTGCACGCCAGTGCATAAGGGGACCCCGAGTGCAGGGGCATACAGTCCTC  
GCTTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCCGGTAATAACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCCGGAAATCCACCCGCTCAACG  
GGTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGT  
ACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGA  
AAGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCG  
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGT  
GGCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCG  
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
GGCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCACTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGC  
TGGGTACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCCAATCTCCTAACCTCGGTCGT  
AGTTCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAAT  
CGCATTTCAGAAGAGTGCG

**Ek26. 514 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1279

Gen Bankası Erişim Numarası: AB549236.1

GGGGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGC  
TCCGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGATCGGGATACCCTCGGGAAACTG  
AGGCTAATCCCGGATACTGCTTTCTTGTGGAACACAGAAAGTCGGAAACGGT  
CCGCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTA  
CACTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTCCTC  
GCTTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCCGGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCGGGAAATCCACCCGCTCAACG  
GGTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGT  
ACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGA  
AAGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCG  
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGT  
GGCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCG  
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA  
CTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC  
GGCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTGTGATGGGCTTACTTGAGCCACTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAGTC  
AGGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGC  
TGGGTACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAAC  
GGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCG  
AGACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTCGT  
AGTTCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAAT  
CGCATTTCAGAAGA

**Ek27. 516 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1239

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

AGACTCGTGGCAGTAGCTCAGTACCAGTGGCCAAACTACCCTATAGATCGGCC  
AACCTCGGGAAACTGAGCTATCCGGATAACGCTTTCAGCTTGAGTGGCGAGAG  
CTGAAACGTTTCAGCGCTACAGAATGTGGCTGCGGCCGATTAGTAGACGGTGGG  
GTAACGGCCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTTGAGAGCAAGAGCCCGGA  
GACGGTATTTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGGCAGCAGGCGCGGAAC  
CTTTACCATGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTTCAGGTGCGAGGGGCATATCG  
TTCTTGCTTTTCTCGGCCGTAGGGAGGTTGAGGGACTAGTTCTTGGCAAGGCCG  
GTGCCAACCGGCGCCGTAATTCCGGCAGCACAGATGATGGCCGGTGATAATGG  
GCCTTAAGCGTCCGTAGCTGGCCCGACAAGTTCATTGGGAAATTTGTGAGCCT  
AACGCACAGGCGTTCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAG  
GGGTAAGTTTGGGGTTGGAATGAAATTCCGTAATTCTGGGCGGGCCCCCGGTG  
GCGAAAGCGCCTCTGGAAGGCGGATTCGGCGGTGAAGGAAGAAAGCTCGGGT  
CCCGGACCGGATTAGATTCGCGGGTAGTTCGAGCTGTTAACGATGTTTGGTAG  
GTGTGACACCGGCTTCGAACCTGTGTTGTTCCGTAGGGAAACCGTGAAGCCGG  
CCGCCTGGGAAGTACGTTTCGCAAGGATGGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGA  
ACCATAACCACCGGAAGAACCTGCGGTTTAATTGGACTTAACGCCGGACATTTT  
CCCAGCATTGGCCGTGAGCAGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCA  
CTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAA  
GTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGT  
GGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGC  
AACGGTAGGTACGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGG  
TCGAGACAGTGGGATGCCACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGAT  
CGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGT  
AATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGT

**Ek28. 517 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1293

Gen Bankası Erişim Numarası: AB477227.1

GCTATTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCA  
GATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTGTCGATCGGGACACCCTCGGG  
AAACTGAGGCTAATCCCGGATACGGCTCGCTGCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCG  
AAACGTTTCAGGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGG  
GTAACGGCCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAAAGCAAGAGCCCGG  
AGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAA  
ACCTTTACACTGCACGCGAGTGCGATAGGGGGACTCCAAGTGCGAGGGCATAAC  
AGTCCTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGA  
CCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTAT  
TGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCACG  
CCTAACGTGCGGGCGTCCGGTGGAAGCTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCA  
GAGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGG  
TGCGGAAAGCGCTCTGGAAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGG  
GTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGTCTGCT  
AGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA  
GACCGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGG  
GAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATC  
TCACCAGCATCGACAGTAGCTGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTAGAGCT  
ACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTA  
AGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACGCCTAATTGCCAGCAACACCCTTGAG  
GTGGTTGGGTACATTAGGCGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGG  
GCAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAAT  
GGTCGAGACAGTGGGATGCCACCCCGAGAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTC  
GATCGTAGTTCCGATTGCGGACTGAAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCCGGT  
AGTAATCGCGCTTCAGAAGAGCGCGGTG

**Ek29. 519 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1276

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028186.1

TCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATAGCTCCGT  
AACACGTGGTCAAACCTACCTCTGGACCGGGATACCCTCGGGAAACTGAGGTC  
AATCCCAGATACTGCTTTCATGTTGGAATACAGAAAGTCGGAAACGGTCCGCC  
GCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCAC  
CGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGACGGTATCTG  
AGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTG  
CACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTCCTCGCTTT  
TCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGC  
CGCCGCGGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGGCCTAAAG  
CGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCTGGGAAATCCACCCGCTAACGGGTG  
GACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGAGGTACGT  
CCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAGCGAAAG  
CGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTCTCGAACC  
GGATTAGATAACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTGGCG  
TTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCGCCTG  
GGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTAC  
AACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCGGCA  
CCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTTTGATGAGCTTACTTGAGCCACTGAGAG  
GAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGC  
AACGAGCGAGACCCGCGTCCCTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTGGCTGGG  
TACATTAGGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTA  
GGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGA  
CAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTCTAGT  
TCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
ATTCAGAAGAG

**Ek30. 603 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1283

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

GCTATTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTTAGACTCGTGGCA  
GATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATAGATCCGGCCAACCTCGGG  
AAACTGAGGCTAATCCGGAATAACGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGTGA  
AACGCTCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGT  
AACGGCCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGA  
GACGGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAA  
CCTTTACTGACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATA  
GTCCTCGCTTTTCTCGACCGTAGGGAGGTCGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGAC  
CGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATT  
GGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGC  
CTAACGCACAGGCGTCCGGTGGAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCAG  
AGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGG  
TGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGG  
GTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCT  
AGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA  
GACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGG  
GAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATC  
TCACCAGCATCGACAGTGTGCAGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACCTGAGC  
CACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTT  
AAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTG  
GTGGTTGGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGG  
GCAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAAT  
GGTCGAGACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTC  
GATCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGT  
AGTAATCGCGCCTCAGAA

**Ek31. 701 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1285

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028176.1

TGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAG  
CTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATAGATCCGGCCAACTCGGGAACT  
GAGGCTAATCCGGAATATCGCTTTCAGCCTGGAGTGGCGAGAGCGTGAAACGC  
TCCGGCGCTATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGG  
CCCACCGTGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGT  
ATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTA  
CACTGCACGCGAGTGCGATAAGGGGACTCCAGGTGCGAGGGCATATAGTCCTC  
GCTTTTCTCGACCGTAGGGAGGTGCGAGGAACAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGC  
CAGCCGCCGCGGTAATAACGGCAGCACAAGTGATGACCGCTGTTATTGGGCCT  
AAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGACAAGTTCATCGGGAAATCTGTGCGCCTAACG  
CACAGGCGTCCGGTGGAAACTGCCTGGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGT  
ACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGA  
AAGCGCCTCAGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACG  
AACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGT  
GACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGC  
CTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCAC  
TACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCA  
GCATCGACAGTGTGCAGTGACGGTCAGTGTGATGAGCTTACTTGAGCCACTGA  
GAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCA  
GGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTGGTT  
GGGTACATTAAGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACG  
GTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGTCGA  
GACAGTGGGATGCAACGCCGAAAGGCGACGCTAATCTCCGAAACTCGATCGTA  
GTTCCGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATC  
GCGCCTCAGAAGGGCGCG

**Ek32. 708 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1290

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028150.1

ATTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGAT  
AGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGGATAACCTCGGGAAA  
CTGAGGCTAATCCGGAATAGCGTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACGCGAAAC  
GTTCAGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC  
GGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTC  
CTCGCTTTTCACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGACCGCTATTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTTCGTTCGGGAAATCTGCGCGCTTA  
ACGCGCAGGCGTCCGACGGAACTGTATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGG  
GGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGG  
CGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTC  
ACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGG  
TGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGAC  
CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCAGCATCGACAACGTGCAGTGAAGGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCGT  
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAG  
TCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCTTGTGGTG  
GTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCA  
ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGC  
CGAGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGT  
CGTAGTTCGGATTGAGGACTGAACTCGTCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGT  
AATCGCGCCTCATAAGGGCGCGGTG

**Ek33. 714 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1289

Gen Bankası Erişim Numarası: NR\_028187.1

ATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGTGCGGGTTTAGACCCGCAGCGGAA  
AGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTGTGGATGGGAACAATCTCGGGAAA  
CTGAGGCTAATTCCAATAATGCTCCACCCCTGGAACGGGTTCGAGCTGGAAAC  
GCTACGGCGCCACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC  
GGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGTACGCAAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCC  
TTCACTTTTGTACACCGTAAGGTGGTGTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATGGCCGATATTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGGACAAGTCCGTTGGGAAATCTGCTCGCTTA  
ACGAGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTTCCGGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGG  
GGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCATCGGTGG  
CGAAAGCGCCTCAGGAGGACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTC  
TCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGCCCGCTAGG  
TGTGGCGCAGGCTACGAGCCTGCGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGGG  
CCGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGA  
GCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTC  
ACCAGCTCCGACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGATGACTTTACCCGACGCTA  
CTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAA  
GTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAGTACCCTTTGGGT  
AGCTGGGTACATTAGGTGGACTGCCGCTGCCAAAGCGGAGGAAGGAACGGGC  
AACGGTAGGTCAGTATGCCCGAATGAGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATG  
GTCGAGACAATGGGATGCAACTCCGAGAGGAGGCGCTAATCTCCTAAACTCGA  
TCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAG  
TAATCGCGTGTCAGAAGCGCGCGGT

**Ek34. 805 Numaralı İzolata Ait 16S rRNA Gen Baz Dizisi**

Baz Sayısı: 1287

Gen Bankası Erişim Numarası: AB549236.1

TCGGGGTCCGATTCAGCCATGCTAGTTGTACGGGTTTAGACCCGTAGCAAATA  
GCTCCGTAACACGTGGTCAAACCTACCCTCTGGACCGGGATACCCTCGGGAAAC  
TGAGGTCAATCCCGGATACTGCTTTCATGTTGGAACACAGAAAGTCGGAAACG  
GTCCGCCGCCGGAGGACGTGACTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAC  
GGCCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCGGAGAC  
GGTATCTGAGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCT  
TTACTACTGCACGCCAGTGCGATAAGGGGACCCCGAGTGCGAGGGCATAACAGTC  
CTCGCTTTTCGTGACCGTAAGAAGGTCTCAGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGG  
TGCCAGCCGCCCGGTAATAACCGGCAGCTCGAGTGATAGCCACTATTATTGGG  
CCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCGAACAGGTCCGTCCGGAAATCCACCCGCTCA  
ACGGGTGGACGTCCGGCGGAAACCAGTCGGCTTGGGGCCGGGAGACCAGAGA  
GGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCCGGTAG  
CGAAAGCGTCTCTGGAGAACGGACCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTC  
TCGAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCAAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGG  
TGTGGCGTTGGCTACGAGCCAGCGCTGTGCTGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGC  
CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG  
CACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCGGCACCGACAGTGTGCAGTGACAGTCAGTCTGATGGGCTTACTTGAGCCAC  
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAG  
TCAGGCAACGAGCGAGACCCGCGTCCTTAATTGCCAGCAGCAGCCTTGTGCTG  
GCTGGGTACATTAAGGAGACTGCCGTCGCTAAGACGGAGGAAGGAACGGGCA  
ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCCGGGCGACACGCGGGCTACAATGGC  
CGAGACAGTGGGACGCTACCCCGAGAGGGGACGCTAATCTCCTAACCTCGGTC  
GTAGTTCGGATTGCGGGTTGAAACCCACCCGCATGAAGCTGGATTTCGGTAGTA  
ATCGCATTTTCAGAAGAGTGCGG

## Çizelgeler

Çizelge 1. SW 30 çözeltisi .....	30
Çizelge 2. SW besiyerleri.....	31
Çizelge 3. Modifiye jelatin agar .....	31
Çizelge 4. Modifiye rhodamin B lipaz agar .....	31
Çizelge 5. Antibiyotik diskler .....	32
Çizelge 6. % 20'lik gliserol çözeltisi .....	33
Çizelge 7. Alfa ( $\alpha$ )- naftol çözeltisi.....	33
Çizelge 8. Kovaks ayırıcı .....	33
Çizelge 9. Kristal viyole boya çözeltisi.....	34
Çizelge 10. Gram iyodür çözeltisi.....	34
Çizelge 11. Safranin boya çözeltisi.....	34
Çizelge 12. % 2'lik asetik asit çözeltisi .....	35
Çizelge 13. Frazier ayırıcı .....	35
Çizelge 14. TCA (Trikloro Asetik Asit) karışımı .....	35
Çizelge 15. 10 mM pNP Laurat substrat çözeltisi.....	36
Çizelge 16. 10 mM pNP Bütirat substrat çözeltisi.....	36
Çizelge 17. Lipaz ve esteraz tampon çözeltisi (100 ml) .....	36
Çizelge 18. 10X TAE tamponu.....	37
Çizelge 19. 6x jel yükleme boyası .....	37
Çizelge 20. Agaroz jel.....	37
Çizelge 21. 400x syber green I jel boya çözeltisi.....	38
Çizelge 22. Proteaz aktivitesi ölçüm yöntemi.....	44
Çizelge 23. Kollajenaz aktivitesi ölçüm yöntemi .....	45
Çizelge 24. Keratinaz aktivitesi ölçüm yöntemi .....	45
Çizelge 25. Lipaz aktivitesi ölçüm yöntemi.....	46
Çizelge 26. Esteraz aktivitesi ölçüm yöntemi.....	47
Çizelge 27. Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü .....	49
Çizelge 28. Thermalcycler protokolü.....	49
Çizelge 29. Çalışmada kullanılan izolatlara ait bilgiler .....	50
Çizelge 30. 1 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	53
Çizelge 31. 2 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	56
Çizelge 32. 3 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	58

Çizelge 33. 4 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	59
Çizelge 34. 5 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	60
Çizelge 35. 6 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	61
Çizelge 36. 7 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	62
Çizelge 37. 8 Numaralı örnek izolatlarının karakteristik özellikleri.....	63
Çizelge 38. İzolatlara ait antibiyotik duyarlılık bulguları .....	65
Çizelge 39. Proteaz aktivitesi ölçüm bulguları .....	73
Çizelge 40. Keratinaz aktivitesi ölçüm bulguları.....	74
Çizelge 41. Kollejenaz aktivitesi ölçüm bulguları .....	75
Çizelge 42. Esteraz aktivitesi ölçüm bulguları.....	76
Çizelge 43. Lipaz aktivitesi ölçüm bulguları .....	77
Çizelge 44. Çalışmamızda tanımlanan izolatlara ait BLAST analiz bulguları .....	80
Çizelge 45. Tanımlanan izolatların izole edildikleri ham deri örneklerine göre dağılımı ....	81
Çizelge 46. İzolatların benzer bulunduğu türlerin izole edildikleri kaynaklara ait bilgiler	92

## Şekiller

Şekil 1. Sığır ham derisine ait şematik enine kesit (Bailey, 1999). .....	3
Şekil 2. Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998). .....	16
Şekil 3. Karakteristik Arkeal lipidler (Dassarma ve ark., 2010). .....	23
Şekil 4. 125 numaralı izolatin petride görüntüsü. ....	51
Şekil 5. 505, 125, 153 ve 140 numaralı izolatların sıvı kültürde görüntüsü. ....	51
Şekil 6. 712 numaralı izolatin antibiyotik duyarlılık test görüntüsü. ....	69
Şekil 7. 701 numaralı izolatin antibiyotik duyarlılık test görüntüsü. ....	69
Şekil 8. Solda 107 numaralı ve sağda 129 numaralı izolatların kazeinaz test görüntüsü. ....	70
Şekil 9. Solda 153 numaralı ve sağda 511 numaralı izolatların jelatinaz test görüntüsü. ....	70
Şekil 10. Solda 140 numaralı ve sağda 142 numaralı izolatların amilaz test görüntüsü. ....	71
Şekil 11. Esteraz aktivitesi test görüntüleri. ....	71
Şekil 12. 107 ve 714 numaralı izolatların rhodamin B lipaz agarda 360 nm U.V lambası altındaki görüntüleri. ....	72
Şekil 13. 153 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesinin günlük değişimi. ....	73
Şekil 14. 150 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve keratinaz aktivitesinin günlük değişimi. ....	74
Şekil 15. 107 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve kollajenaz aktivitesinin günlük değişimi. .....	75
Şekil 16. 140 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve esteraz aktivitesinin günlük değişimi. ....	76
Şekil 17. 505 numaralı izolatin büyüme eğrisi ve lipaz aktivitesinin günlük değişimi. ....	77
Şekil 18. Bazı izolatlara ait DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü. ....	78
Şekil 19. Bazı izolatlara ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. ....	78
Şekil 20. Çalışmamızda tanımlanan izolatlar ile benzer buldukları türlerin karşılaştırmalı filogenetik ağacı. ....	82

## Özgeçmiş

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sadi Turgut BİLGİ

Doğum Yeri : Çanakkale

Doğum Tarihi : 13.05.1982

### EĞİTİM DURUMU

Lisans : Trakya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

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

Yabancı Dil : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar -SCI –Diğer

Bilgi S. T., Mericli Yapici B. ve Yapici A. N., 2009. Determination of Bacterial and Fungal Numbers in Floats of Pre-Tanning Operations. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(8): 1602-1607.

#### b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Türkan M.F., Aslan A., Yapıcı B.M., Yapıcı A.N., Bilgi S.T., 2011. “Determination of Antimicrobial Effects of Raw Skin Treated with *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf Acetone” *II International Leather Engineering Congress, Innovative Aspects for Leather Industry*, 12-13 May 2011, Izmir, Turkey. 287-291.

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

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

Bilgi S.T. ve Meriçli Yapıcı B., 2008. Deri Endüstrisinde Mikroorganizmaların Kontrolü. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumları, Biga Değerleri Sempozyumu, Çanakkale-Türkiye. 369-380.

### **c) Katıldığı Projeler**

Yerli Koyun Derilerinin Yumuşatma Sıvılarındaki Bakteriyel Yükün Gaz Sensörleri ve Yapay Sinir Ağları İle Belirlenmesi. Araştırmacı (Ç.O.M.Ü.-BAP).

Deri Proseslerinden İzole Edilen Bazı Mikroorganizmaların pH Toleranslarının Araştırılması. Araştırmacı (Ç.O.M.Ü.-BAP).

Tabaklama Öncesi İşlemlerde Bakteri ve Fungus Sayısının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Araştırmacı (Ç.O.M.Ü.-BAP).

### **İLETİŞİM**

E-posta Adresi : [turgutbilgi@hotmail.com](mailto:turgutbilgi@hotmail.com)