

Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu
ve Poli- β -Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Serap Gedikli

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2016

Isolation of Thermophilic Microorganisms From Hot Springs, Identification and
Determination Their Ability to Poly- β -Hydroxybutyrate Production

Serap Gedikli

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

August 2016

Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu
Ve Poli- β -Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Serap Gedikli

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Genel Biyoloji Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAP 201219A203 ve 2013123 no'lu projeler ile
desteklenmiştir
Ağustos 2016

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Serap Gedikli'nin Doktora tezi olarak hazırladığı "Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Poli-β-Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman :Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

İkinci Danışman : Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM

Üye: Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet Erşahan
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ahmet ÇABUK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Poli-β-Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 31/08/2016

SERAP GEDİKLİ

ÖZET

Termofilik ve hipertermofilik gibi ekstremofilik mikroorganizmalar hem biyoçeşitlilik hem de evrimsel süreç açısından oldukça ilgi çekicidirler. Ülkemiz jeolojik yapısından dolayı pek çok sıcak su kaynağına sahiptir. Ancak bu kaynakların mikrobiyolojik profillerini hem bakteriler hem de arkeler açısından belirleyen kapsamlı bir çalışma açısından eksikliklerin olduğu bilinmektedir. Bu organizmalar yüksek sıcaklıklarda hızlı ve verimli bir şekilde cereyan eden endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde önemli avantajlar sağlar. Yeni mikrobiyal suşların izolasyonu, yeni bileşiklerin ve yol izlerinin identifikasyonu, hücresel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile olası potansiyel de giderek artmaktadır. Kütahya-Simav'da bulunan Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından Mayıs 2011 ve Ekim 2012 aylarında alınan su örneklerinin mikrobiyal çeşitliliği hem kültüre bağımlı hem de flüoresens in situ hibridizasyon, denature edici jel elektroforezi, 16S klon kütüphanesi oluşturma teknikleri kullanılarak kültürden bağımsız olarak çalışılmıştır. Kültüre bağımlı yapılan çalışmalar sonunda Mayıs 2011'de alınan su örneklerinden *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus stearothermophilus* ve *Geobacillus thermoleovarans*, Ekim 2012'de alınan su örneklerinden ise *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoleovarans* ve *Geobacillus thermoparaffinivorans*, *Geobacillus sp* ve *Thermus thermophilus* türleri izole edilmiştir. Kültürden bağımsız olarak yapılan çalışmalar sonunda Naşa termal kaplıcasında arke varlığı belirlenmiştir. Elde edilen bu izolatlardan termal kararlılığa sahip bir PHB üreticisi seçmek için tarama çalışması yapılmıştır. Seçilen Ç4-2 kodlu *Geobacillus kaustophilus* ile Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmış ve % 8,66 verime ulaşılmıştır. Elde edilen PHB'nin FTIR, NMR, TG/DTA ve vizkozite analizleri yapılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. TG/DTA sonucuna göre 600 °C'de %14.3 oranında bozunmadan kalan sıcaklığa dayanıklı PHB üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal çeşitlilik, termofil mikroorganizmalar, PHB

SUMMARY

Extremophilic microorganisms as well as thermophilic and hyperthermophilic are quite interesting in terms of biodiversity and the evolutionary process. Due to the geological structure of our country which has a lot of thermal resource. In fact, it is the first country in Europe and the seventh in the world in the way of the geothermal potential. However, it is well known that a lack of the extensive study about determining of microbiological profiles of these resources including both bacteria and archaea. These organisms have important advantages in biotechnological and industrial processes which occur efficiently at high temperatures. Recently, extremophile studies have focused on either these microorganisms own or potential biotechnological applications. Possible potential increases day by day when identification of new compounds and pathways, molecular and biochemical characterization of cellular components have carried out. Microbial diversity of water samples, taken from Naşa and Çitgöl thermal spring in Kütahya-Simav in May 2011 and in October 2012, has been investigated a combination of classical microbiology (cultivation techniques) and molecular biology approaches (culture dependent techniques) including fluorescent in situ hybridization (FISH), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and clone libraries with amplified 16S rRNA. In the result of studies depend on cultivation techniques, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus stearothermophilus* ve *Geobacillus thermoleovarans* were isolated from water samples which were taken on May 2011 and also *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoleovarans*, *Geobacillus thermoparaffinivorans*, *Geobacillus sp* and *Thermus thermophilus* were isolated from water samples taken in October 2012. The presence of Archaea was determined as a result of studies carried out with culture dependent methods. The scanning studies were performed to choose an isolate which is a producer of PHB with thermal stability. Box-Behnken experimental design was used for optimizing studies by using *Geobacillus kaustophilus* selected isolate coding Ç4-2. The yield was to be 8,66 % as a result of optimization. The characterization of obtained PHB was performed by doing analyses including FTIR, NMR, TG/DTA and viscosity. PHB, which was thermal resistant and remained 14,3 % without decomposition at 600 °C, was produced according to the result of TG/DTA.

Key words: Microbial diversity, thermophile microorganisms, PHB

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın tüm aşamalarında bana her türlü imkanı sağlayan, çalışmalarımı yönlendiren bilgilerini benden esirgemeyen ve her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr Ahmet ÇABUK'a,

Daima desteğini ve yardımlarını hissettiğim eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU hocama,

Tüm çalışmalar sırasında hep yanımda olup bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Yağmur TOPTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Pınar AYTAR, Gökhan GÜNGÖRMEDİ ve diğer Biyoteknoloji laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma,

Analizler aşamasında desteklerini esirgemeyen Polimer Teknoloji Araştırma Laboratuvarı ve ESOGÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve deneysel tasarım aşamasında Araş. Gör. Yeliz BURUK'a,

Bu tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 201219A203 ve 2013123 no'lu projeler ile desteklenmiştir. Proje desteği sağlayan ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Her konuda olduğu gibi çalışmam boyunca da bana olan inanç, destek ve güvenleri için Canım Aileme, Sonsuz Teşekkürler

SERAP GEDİKLİ

Eskişehir,2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Aşırı “Ekstrem” Koşullarda Yaşam	4
2.2. Termal Ortamlar	5
2.3. Termofillerdeki Moleküler Adaptasyonlar	7
2.3.1. Termofillerin genomik evrimleri	8
2.3.1.1. Termofillerde horizontal gen transferi	8
2.3.1.2. Termofillerde gen mutasyonu	9
2.3.1.3 Termofillerde genom azalması ve gen kaybı	9
2.3.1.4 Termofilik genomların baz sapmaları	10
2.3.1.5 Termofillerde yüksek sıcaklıklara global gen ekspresyon cevapları	11
2.3.1.6 Termofillerde operon genlerinin sıcaklık cevapları	11
2.3.1.7 Termofillerde stabil ve etkili protein sentez mekanizması	13
2.3.1.8 Termofillerde sıcaklık-duyarlı genlerin ekspresyonu	13
2.3.1.8 Termofillerde proteinlerin termostabilitesi	16
2.4 Termofili ve Biyoteknoloji	20
2.4.1 Termozimler	21
2.4.1.1 Polisakkarit parçalayan enzimler	24
2.4.1.2 Nişasta hidrolize eden enzimler	24
2.4.1.3 Selülotik enzimler	25
2.4.1.4 Hemiselülotik enzimler	26
2.4.1.5 Pektinolitik enzimler	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1.6 Kitinolitik enzimler.....	27
2.4.1.7 Proteolitik enzimler	28
2.4.1.8 Lipolitik enzimler	29
2.4.2 Biyoenerji-biyoyakıt.....	29
2.4.3 Biyomadencilik.....	32
2.4.4 Biyoyileştirme (Biyoremediasyon)	33
2.4.6 Arkeal lipidler.....	35
2.4.7 Arkezomlar	36
2.4.8 Arkeal S-tabaka	37
2.4.9 Polihidroksibutirat (PHB) Üretimi	37
2.5 Termofilik Popülasyonun Çeşitlilik Analizi.....	47
2.5.1 Kültür Bağımlı Çalışmalar.....	47
2.5.2 Geleneksel Kültür Bağımsız Çalışmalar.....	48
2.5.3 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis - Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi).....	48
2.5.4 Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE).....	49
2.5.5 Floresan in situ hibridizasyon (FISH)	52
2.5.6 16S klon kütüphanesi oluşturma.....	53
2.5.7 Kısmi 16S rRNA Gen Dizileme ve Kültür Bağımsız Çalışmalar	55
2.5.8 Shotgun metagenom ve kültür bağımsız çalışmalar	57
2.5.9 Metagenomikler.....	58
2.6 Deneysel Tasarım Yöntemleri.....	58
2.6.1 Cevap yüzey yöntemi (Respose Surface Methodology, RSM).....	59
2.6.1.1 Box-behnken tasarım yöntemi (BBD).....	60
3. MATERYAL VE YÖNTEM	61
3.1. Materyal.....	61
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	61
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	61
3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri	62
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler	64

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4.1. Gram Boyamada Kullanılan Çözeltiler	65
3.1.4.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	66
3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotit problemler	68
3.2 Yöntem	69
3.2.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri.....	71
3.2.2.1. Kültüre bağlı yöntemler.....	71
3.2.2.2. Kültürden bağımsız yöntemler	75
3.2.3 İzolatların PHB üretim yeteneklerinin araştırılması.....	80
3.2.3.1 Seçilen İzolat ile Box Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları	81
3.2.3.2 Elde edilen PHB'nin karakterizasyonu.....	82
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	83
4.1. Örneklem Yerleri ve Alınan Sıcak Su Örneklerinin Metal Analizleri	83
4.2. Çevresel Su Örneklerinden Termofil Bakteri İzolasyonları.....	84
4.3. Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri	85
4.3.1. İzolatların moleküler identifikasyonu.....	85
4.3.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri.....	93
4.3.2.1. Flouresan in situ hibridizasyon.....	94
4.3.2.2. Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE).....	95
4.3.2.3. 16S Klonlama	101
4.4 İzolatların PHB Üretim Yeteneklerinin Araştırılması.....	110
4.4.1 Seçilen izolat ile Box Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları	111
4.4.2 Elde edilen PHB'nin karakterizasyonu.....	117
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	124
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	133
ÖZGEÇMİŞ.....	160

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 Mikroorganizmalar gelişimleri için ihtiyaç duydukları sıcaklık değerleri	5
2. 2 Sıcak su kaynaklarından örnekler	6
2. 3 Termal cevap süresince <i>T. tengcongensis</i> 'de enerji üretim metabolizmasını gösteren şematik diyagram.....	16
2. 4 Omik yaklaşımları kullanarak termofillerin hayatta kalma mekanizmalarını etkileşimli olarak gösteren şema	19
2. 5 PHA'ların kimyasal yapısı.....	38
2. 7 <i>Rhizobium eutropha</i> 'da PHB ve P(HB-HV) biyosentetik yol izi.....	41
2. 8 Denatüre edici jel elektroforezinin aşamaları	51
2. 9 Termofiller ve hipertermofiller ile ilgili çalışmaların akış diyagramı	56
3. 1 Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarının haritadaki yerleri.....	70
3. 2 (a) Naşa Termal Kaplıcası (b) Çitgöl Termal Kaplıcası sıcak suyun yer yüzüne çıktığı ve örnek alınan yerler	71
3. 3 pGEM-T easy vektör haritası	79
4. 1 Bazı izolatların petri görüntüleri (a) Ç2-3 kodlu izolat (b) Ç3-5 kodlu izolat	84
4. 2 Bazı izolatların gram boyama görüntüleri	85
4. 3 Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından izole edilen bazı izolatların genomik DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jelde görüntüleri	86
4. 4 Bazı izolatların 16S rRNA gen amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü	86
4. 5 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri	88
4. 6 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Mbo I restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri	89
4. 7 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Hinf I restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri	90
4. 8 Çevresel su örneklerinin total DNA ekstraksiyonu sonrası jel görüntüsü.....	94
4. 9 Çevresel Su örneklerinin DAPI ve FISH görüntüleri.....	95
4. 10 Çevresel su örneklerinin DGGE PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	96
4. 12 Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011'de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 13 Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili	103
4. 14 Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili	104
4. 15 Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili	105
4. 16 Plazmit izolasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü.....	106
4. 17 Üretilen PHB’nin görüntüsü	112
4. 18 Karbon kaynağı ve inkübasyon sıcaklığı ikili etkileşim grafiği.....	114
4. 20 Standart PHB’nin NMR analiz grafiği	118
4. 21 Üretilen PHB’nin FTIR analiz grafiği	120
4. 22 Standart PHB’nin FTIR analiz grafiği.....	120

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 Biyokatalitik termozimlere örnekler.....	22
3. 1 Çalışma süresince kullanılan cihazlar.....	61
3. 2 İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid problar.....	68
4. 1 Çalışılan örneklem yerlerinin bazı özellikleri	83
4. 2 Çevresel örneklerin metal analizleri	83
4. 3 Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 ARDRA sorası temsili seçilen izolatların gen bankasındaki karşılıkları	93
4. 4 Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 ARDRA sorası temsili seçilen izolatların gen bankasındaki karşılıkları	93
4. 5 Çevresel su örneklerinden elde edilen DGGE bantlarının gen bankasındaki karşılıkları	100
4. 6 Çevresel su örnekleri 16S klonların gen bankasındaki karşılıkları	107
4. 7 İzolatların % PHB üretim miktarları	111
4. 8 Box -Behnken deney seti optimizasyon sonuçları.....	112
4. 9 Box-Behnken deneysel tasarımı tarafından önerilen doğrulama deneyi ve güven/tahmin aralığı değerleri.....	114
4. 10 ANOVA analiz çizelgesi	115
4. 11 Üretilen PHB'nin vizkozite ve yoğunluk değerleri	121
4. 12 Standart PHB'nin (Sigma) vizkozite ve yoğunluk değerleri	121
5. 1 Türkiye'deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler.....	125

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
L	Litre
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
°C	Santigrat derece

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis
DGGE	Denatüre Edici Jel Elektroforezi
FISH	Flouresans insitu hibridizasyon
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
Nt	Nükleotit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHB	Poli-β-Hidroksibütirat
TGA	Termogravimetrik Analiz

1. GİRİŞ

Ekstremofiller, diğer organizmaların yaşayamayacağı ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalardır. Ekstremofil mikroorganizmalar, yaşamın sınırlarını keşfetmemizde, dolayısıyla ilkin yaşama ait veriler elde etmemizde önemlidir. Bununla birlikte, biyoteknolojik uygulamalardaki kullanım potansiyellerinden dolayı her geçen gün daha fazla ilgi görmektedirler. Ekstrem (Aşırı) çevre koşulları; çok yüksek veya çok düşük sıcaklıklar, çok yüksek alkali ya da asidik koşullar, yüksek basınç, yüksek radyasyon ve yüksek tuzluluktur. Mikrobiyal yaşam, yaşamın bilinen formlarında suyun kaynama sıcaklığına kadar olan ve hatta kaynama sıcaklığını da içine alan yüksek sıcaklıktaki ortamlarda varlığını sürdürür. Yeni çalışmalar ile bu sınırlar her geçen gün aşılmaktadır. Güncel bilgilerimize göre yaklaşık 65 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sadece prokaryotik yaşam formları bulunur. Prokaryotik gruba dahil bakteri ve arkeler içinde de büyük bir çeşitlilik gözlenir. Termofilik ve hipertermofilik gibi ekstremofilik mikroorganizmalar hem biyoçeşitlilik hem de evrimsel süreç açısından oldukça ilgi çekicidirler.

Biyolojik zenginliklerin belirlenerek kayıt altına alınması en az ülkelerin yeraltı zenginliklerinin belirlenmesi kadar önemlidir. Ülkemizde bilinen bitki ve hayvan çeşitliliğinin yanı sıra mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarının gün geçtikçe artması bu açıdan önemli bir katkı sağlamaktadır. Klasik mikrobiyal analizler her zaman mikroorganizmaların kültüre edilmelerine ve karakterizasyonlarına olanak vermemektedir. Moleküler biyoloji tekniklerinden Floresans insitu hibridizasyon, denature edici jel elektroforezi, 16S klon kütüphanesi, RFLP gibi teknikler kullanılarak aşırı çevrelerdeki mikrobiyal komüniteyi taramak mümkün olabilmektedir. Moleküler biyoloji teknikleri ile klasik izolasyon teknikleri kombine edilerek jeomikrobiyolojide önemli adımlar atılmakta ve böylece biyoteknolojik uygulamalar için de alternatif mikroorganizmalar elde edilmektedir. Mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması, ülkemizin mikrobiyal biyoçeşitlilik envanterinin zenginleşmesine olanak sağlamanın yanı sıra elde edilecek mikroorganizmaların sahip oldukları metabolik çeşitlilik nedeni ile birçok alanda kullanım potansiyellerinin olması açısından da önemlidir. Yeni mikrobiyal suşların izolasyonu, yeni

bileşiklerin ve yol izlerinin identifikasyonu, hücrenel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile olası potansiyel de giderek artmaktadır.

Sıcak su kaynakları Dünya'nın her yerinde bulunmaktadır. Özellikle Amerika Birleşik Devletlerinin batısında, Yeni Zelanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika ve Orta Afrika'da çok sayıda sıcak su kaynağı vardır. Dünya'nın en büyük sıcak su kaynağı Wyoming (ABD)'daki Yellowstone Milli Parkı'nda bulunur. Dünyada jeotermal alanların yoğunluğu göz önüne alındığı zaman, zengin ülkelerden birisi de Türkiye'dir. Türkiye jeotermal potansiyeli bakımından Avrupa kıtasının birinci ve Dünya'nın yedinci ülkesi konumundadır. Ancak ülkemizin değişik coğrafi bölgelerinde bulunan termal kaynaklardaki mikrobiyotanın belirlenmesi ve bunlardan endüstride kullanılabilir potansiyeli olan türlerin saptanması üzerine yapılmış olan bilimsel çalışma sayısı her geçen gün artmasına rağmen yeterli değildir. Termal kaynaklı mikroorganizmaların biyosferin üzerinde çok önemli rollerinin bulunduğu tespit edilmiş, doğal ortamlarında bulunan bu canlıların çok azının mevcut mikrobiyolojik tekniklerle izole edilebildiği bildirilmiştir.

Bu tez kapsamında Kütahya-Simav'da bulunan Naşa ve Çitgöl termal kaplıcalarının mikrobiyal çeşitliliği Mayıs 2011 ve Ekim 2012'de alınan su örnekleri ile hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız teknikler kullanılarak belirlenmiştir. Tez kapsamında hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız teknikler kullanıldığı için Türkiye'de yapılan termal alanların mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarından farklılık göstermektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalar kültüre bağımlı olarak devam etmektedir. Termal alanlardan izole edilen termofilik ve hipertetmofilik mikroorganizmaların ve ürettikleri enzim, protein, polimer gibi biyolojik materyallerinde aşırı koşullara dayanıklı olduğu tezinden yola çıkarak elde edilen izolatlardan termal stabilitesi yüksek bir poli- β -hidroksibütirat (PHB) polimeri üretimi hedeflenmiştir. Türkiye'de ve dünyada termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmaların çoğunlukla enzimlerinin çalışıldığı görülmektedir. Termofil mikroorganizmaların PHB üretimi yerine genellikle PHB depolimeraz enzimleri ve biyolojik olarak PHB'nin yıkımında kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Son yıllarda termofil mikroorganizmalardan PHB üretimi ile ilgili çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Sunulan tez çalışmasında elde edilen izolatlardan termal

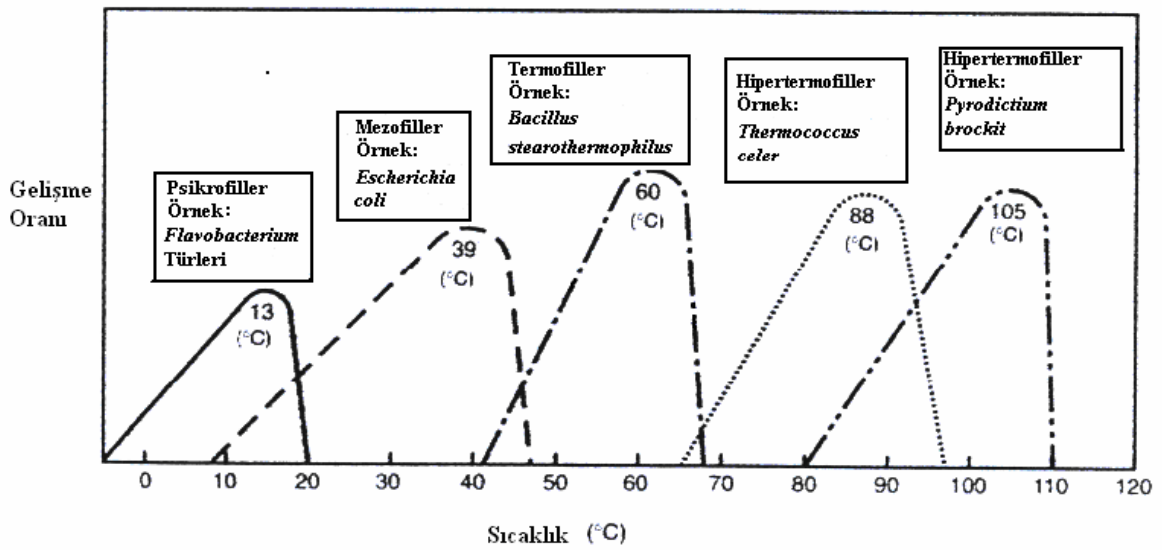
stabiliteye sahip PHB üretimi gerçekleştirilebilmiştir. *Geobacillus* genusu kullanılarak PHB üretimi yapılan ilk bilimsel çalışmalardan olması ve termal stabilitesi ile literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Aşırı “Ekstrem” Koşullarda Yaşam

Mikrobiyal kormunitelerin büyük çoğunluğu aşırı ortamlarda yaşayan bakteri ve Arke domainlerine ait olduğu düşünülmektedir. Aşırı çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar diğer organizmaların büyümediği ya da çok az gelişme gösterdikleri şartlarda gelişebilirler. Aşırı ortamda yaşayan mikroorganizmalar buldukları ortamların niteliğine göre adlandırılırlar. Örneğin yüksek basınç altında yaşayan mikroorganizmalar barofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Büyüme ve üreme için düşük sıcaklıklara ihtiyacı olan mikroorganizmalara psikrofiller, yüksek sıcaklıklara ihtiyacı olanlara termofiller denilmektedir (Stetter, 2001).

Mikroorganizmalar gelişimleri için ihtiyaç duydukları optimum sıcaklık değerleri bakımından Şekil 2.1’de gösterildiği gibi 4 gruba ayrılırlar. Psikrofiller düşük sıcaklık değerlerinde üreyebilmelerine rağmen, onlar için en iyi gelişim sıcaklığı 15-30 °C’dir. Bazı bakteri, mantar, alg ve protozoonlar psikrofil özellik gösterirler. Böyle organizmalar genellikle okyanus diplerinde, belirli arktik zon bölgelerinde bulunurlar ve nadiren de olsa yiyeceklerin saklanmasında problemlerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Mezofil organizmalar için en iyi gelişim sıcaklığı 25-40 °C’dir. Saprofit bakteriler, mantarlar, algler ve protozoonlar mezofilik organizmaların gelişim gösterdikleri minimum sıcaklık değerlerinde en iyi gelişimi gösterirler. Patojenik organizmaların büyük bölümü bu grup içinde yer almaktadır. Termofilik mikroorganizmalar ise yaklaşık 50-70 °C gibi nispeten yüksek sıcaklık değerlerinde yaşayabilen organizmalar olup, bunlar için optimum üreme ısısı, Brock tarafından 55-60 °C olarak önerilmiştir (Brock, 1986). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu değerin üzerinde de yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilen hipertermofilik mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu bakteriler için optimum gelişme sıcaklığının 80-85°C olduğu belirlenmiştir (Burrows vd., 1963; Bilgehan, 1994; Madigan vd., 1997; Son, 1999; Skirmisdottir, 2000; Stetter, 2001; Hjorleifsdottir, 2002).



Şekil 2. 1 Mikroorganizmalar gelişimleri için ihtiyaç duydukları sıcaklık değerleri (Son, 1999)

2.2. Termal Ortamlar

En yaygın termal biyotoplar, nötr kaplıcalar, solfatarik alanlar ve denizaltı tuzlu su delikleri olarak bilinen hidrotermal sistemler gibi jeotermal ve volkanik alanlardır (şekil 2.2). Sıcak solfatarik alanlarda ferrik demir iyonu varlığına bağlı olarak koyu sarı renkli önemli miktarda oksijen içeren bir üst tabaka bulunur. Ferro demir varlığında siyahımsı-mavi bir renk olan bir alt tabaka oluşmaktadır. Denizaltı termal sistemler 400 °C'ye kadar sıcaklığa çıkan kaplıcalar, sedimentler, volkanik duman püskürten deliklerdir (Stetter, 2001). Diğer denizaltı hidrotermal sistemler yüksek sodyum klorür içeren pH 5.0-8.0 arasında alkalın veya hafif asidik alanlardır (Horikoshi, 1998). Ancak termofiller biyolojik aktivite sonucu sıcaklığın arttığı kompost ve kömür yığınları gibi çevrelerde de bulunabilirler. Ek olarak evsel ve endüstriyel sıcak sularda ve yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel süreçlerin olduğu ortamlarda da (kağıt işleme makineleri ve gıda işleme tesisleri vb.) termofiller bulunabilmektedir (Gold, 1992).

Sıcaklık arttıkça yüksek sıcaklığa dayanıklı mikroorganizma gruplarının sayılarında azalma görülmektedir. Ökaryotik yaşam (mantarlar, algler ve protozoonlar) için üst sınır değer 60 °C'dir. Termal ortamların su sıcaklığı, akış hızı ve kimyasal içerikleri farklıdır (Brock, 1994). Çok sayıda araştırmanın gerçekleştirildiği jeotermal alanlar; İzlanda, Yeni Zelanda, Japonya, İtalya, Rusya ve Amerika Birleşik Devletlerinde yer alan Yellowstone

uluslararası parkıdır (Kristjanson ve Stetter 1991; Hjorleifsdottir 2002). Termofil mikroorganizmaların varlığı 1960'larda Yellowstone Uluslararası parkta yapmış olduğu öncü çalışmalar ile ispatlanmıştır. Fototrof (yaklaşık 72-73 °C) ve heterotrofları (91 °C Yellowstone parkında bulunan suyun kaynama sıcaklığı) içeren yüksek sıcaklıktaki yaşama adapte olmuş çeşitli mikroorganizmalar keşfedilmiştir. Tüm prokaryotlar arasında en termofilik olanlar arke türleri arasındadır. Fototrofik olmayan organizmaların gelişme sıcaklıkları fototrofik organizmalardan daha yüksektir (Brock, 1986).



Şekil 2. 2 Sıcak su kaynaklarından örnekler; (A-C) sıcak su gölleri, (D) sıcak su nehri, (E-F) sıcak çamur, (G) sıcak su çukurları, (H-L) sıcak su kaynaklarından çeşitli sediment ve biyokütle birikimleri (Urbietta vd. 2015).

İlk tespit edilen termofilik mikroorganizma, 85 °C derece ve üzeri sıcaklıklarda yaşayabilen ve optimum gelişme sıcaklığı 75 °C olan *Sulfolobus acidocaldarius*'dur (Huber ve Stetter, 1992).

Endonezya sıcak sularının termofilik bakteriyal komünitesinin incelenmesi üzerine yapılan bir çalışmada da sıcaklığı 82 ve 90 °C, pH değeri 2 olan, Domas ve Cibuni alanları incelenmiş, *Proteobacteria*, *Bacillus* ve *Flavobacterium* üyelerini içeren bir mikrobiyal komünitenin var olduğu bildirilmiştir (Gillian vd. 2001).

Thermus cinsi üyelerinin ise karasal sıcak su kaynaklarından yaygın olarak izole edilen aşırı termofilik, aerobik bakteriler olduğu, bütün suşların 55 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda nötr ve alkali pH seviyelerinde, zorunlu heteretrof olarak gelişirken, nadiren miksotrofik olarak gelişen suşların da bulunduğu, bazı *Thermus* türlerinin ise, O₂ yerine NO₃, Fe(III) ve S⁰'ı elektron alıcısı olarak kullanarak anaerobik şartlar altında yaşayabildikleri tespit edilmiştir (Williams ve Da Costa, 1994).

Bugüne kadar ısıya dayanıklı ve yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyan crenarchaeote grubundan olan *Pyrolobus fumarii* derin deniz dibi bacalarından izole edilmiştir. Bu mikroorganizma 90°C'nin altında büyümemekte, 106 °C'de optimum büyürken 113 °C'de ise düşük oranda da olsa büyüebilmektedir (Blöchl vd., 1997) . Strain 121 olarak bilinen, 121 °C de otoklavda gelişebilen ve hala tam olarak karakterize edilemeyen demir redükte eden bir arke bulunmuştur (Kashefi ve Lovley 2003). Hayatın gerçek üst sıcaklık değerinin kaç olduğu hala bilinmemektedir ve muhtemelen DNA, RNA , protein ve diğer biyolojik moleküllerin sınırlı stabilitesi bu değer üzerine belirleyici rol oynamaktadır (Kashefi ve Lovley 2003).

2.3. Termofillerdeki Moleküler Adaptasyonlar

Geleneksel olarak yapılan araştırmalar çoğunlukla termofillerin protein yapıları ve enzim faaliyetleri ve stabilizasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Termofilik mikroorganizmaların enzimlerinin kristal yapılarındaki aminoasit değişimlerinin seçimleri (Aravind vd. 1998), hidrofobik korlar (Bezsundnova vd. 2012; Chen ve Stiles 2004),

gömülü polar taşıyıcılar, iyon çiftleri (Hakulinen vd. 2003) ve alt birimler arasındaki etkileşimler (Nakka vd. 2006; Omelchenco vd. 2005) termostabliteden sorumludur. Bir bakterinin yaşam aktivitesi hücreleri içindeki moleküler ağların koordinasyonuna bağlıdır ve termofillerde ki proteinlerin yapısı tam olarak açıklanamamıştır. Termofillerin aşırı termal koşullarda nasıl hayatta kaldığına dair çalışmaların bir kısmı, genom, proteom ve transkriptom gibi omik çalışmaları ile yapılmaktadır (Wang vd., 2015).

2.3.1. Termofillerin genomik evrimleri

Sıcaklık değişimleri gibi çevresel şartların değişimi genomik evrime sebep olmaktadır. Böyle genomik evrimler yatay gen transferi, gen kaybı ve gen mutasyonları ile elde edilebilir (Atomi vd., 2004).

2.3.1.1. Termofillerde horizontal gen transferi

Farklı türler arasındaki DNA değişimi bakteriyal adaptasyon ve bakteriyal genom evrimine izin verir. Yatay gen transferi iki şekilde gerçekleşmektedir. 1) yeni diziler ile homolog diziler yer değiştirir 2) transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon ile elde edilen gen entegrasyonu ile gerçekleşmektedir. Yüzlerce genom dizisinin karşılaştırması gösterir ki, bakterial genlerin %20 arkeal genlerin %40 'ında yatay gen transferi olmaktadır (Gu ve Hilser 2009; Qian vd., 2013; Pang ve Allemann, 2007; Vettone vd, 2014). *Thermotoga maritima* ve *Aquifex aeolicus* genomlarının %24 ve %16.2 kadarı yatay gen transferi ile termofil arkelerden geldiği gösterilmiştir (Nelson vd., 1999; Aravind vd., 1998). Mikroorganizmalar bir çok yatay gen tranferi ile aşırı koşullar altında hayatta kalmak için gerekli olan termofilik özellikleri kazanmaktadır. Önemli enzimlerden biri olan ters giraz enzimi arkelerden yatay gen transferi ile bakterilere geçtiği düşünülmektedir. Ters giraz çift sarmallı DNA'nın erime sıcaklığını artırmak için pozitif superkoil bir yapı kazandıran bir DNA topoizomeraz enzimidir. *T. kodokarensis*'ten ters giraz enzimi gen bölgesi çıkarılmış ve mutant strain yüksek sıcaklıkta yavaş yavaş gelişme göstermiştir (Atomi vd., 2004; Perugino vd., 2009; Vettone vd., 2014).

2.3.1.2. Termofillerde gen mutasyonu

DNA yüksek sıcaklıklarda stabil olmadığı için termofillerde DNA onarım sistemleri genomik kararlılığı koruyabilmeleri için daha sıkı olmalıdır. *Thermus thermophilus* ve *Sulfolobus acidocaldarius* gibi termofillerin mutasyonlarının genom analizi, baz değişimlerinin mezofillerde termofillerden daha az sıklıkta ortaya çıktığını göstermektedir (Drake, 2009).

2.3.1.3 Termofillerde genom azalması ve gen kaybı

Prokaryotik genomlar kompakt olup ökaryotlarla karşılaştırıldığında az miktarda intron içerirler. Bu genomik özellik, hızlı üremeyi sağlayan kısa bölünme süreleri için üstünlük sağlar aynı zamanda nükleotit sentezi için de enerji tüketimini azaltır. Termofillerin genom büyüklükleri genel olarak termofil olmayan mikroorganizmalardan daha küçüktür. Bu durumu 60 °C'nin üzerinde yaşayan tüm türlerin 4 Mb'dan daha küçük genoma sahip olması ve 6 Mb'dan daha büyük tüm türler 45 °C'den daha düşük sıcaklıklarda yaşadıklarının bilinmesi ile açıklanabilmektedir (Van Noort vd., 2013). Genomlarının küçük olması nedeniyle termofillerdeki protein uzunlukları ve protein ailesi üyelerinin sayısı termofil olmayan homologlarına nazaran azalmıştır. *Thermus thermophilus* ve *Deinococcus radiodurans* genomlarının karşılaştırılması, *T. Thermophilus*'da üreaz kompleksi, ramnoz metabolizma yol izi, açıl CoA:asetat/3-ketoasit CoA transferaz, fruktoz taşıma ve yararlanım ve gliserol metabolizması gibi sistematik gen kaybını ortaya çıkarmıştır (Omelchenko vd., 2005). Bir diğer benzer örnek *Thermoanaerobacter tengcongensis*'de görülmektedir. Bu mikroorganizmanın genomunda TCA döngüsü ile ilgili genlerin bazıları bulunmamaktadır (Bao vd., 2002). Termofillerde genomun işlevsel kompleksliğinin azaltıldığı hipotezi muhtemelen sıcaklık adaptasyonunda maliyeti azaltan bir mekanizmadır (Burra vd., 2010; Das vd., 2006; Dutta vd., 2010; Saunders vd., 2003). Bununla birlikte, evrimsel süreçte termofillerin düşük termo-stabiliteli proteinleri kodlayan genleri elemime edip etmediği belirsizdir (Jaenicke , 2000; Sabath vd., 2013).

2.3.1.4 Termofilik genomların baz sapmaları

Termofillerdeki genom yapısının, mezofillerinkinden daha kararlı olduğu düşünülmektedir. Genomdaki guanin ve sitozin içeriklerinin DNA kararlılığının önemli göstergeleri olmasına rağmen termofil ve mezofiller arasındaki geniş ölçekli genom karşılaştırmaları, nükleik asit kompozisyon farklılığını ortaya koyabilmektedir. Bazı termofillerdeki GC içeriği-*Thermus thermophilus* ATCC 33923'de %69.41 (Jiang vd., 2013); *Geobacillus kaustophilus*'de %52.1 (Takami vd., 2004) *Thermus* sp. suşu *CCB_US3_UFI*'de %68.6 (Teh vd., 2012)- mezofillerdekenden farklıdır. Bu nedenle Muston ve arkadaşları, yüksek GC içeriğinin genom termostabilitesine katkıda bulunduğunu ve optimum büyüme sıcaklığı (OGT) ile korelasyon gösterdiğini hipotez olarak sunmuştur (Musto vd., 2005; Musto vd., 2006). Bununla birlikte, bazı termofilik organizmaların translasyon araçları olan tRNA ve rRNA'ların da yüksek GC içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Bao vd., 2002; Barabote vd., 2009; Saunders vd., 2003; Wang vd., 2006). Fakat, araştırmacılar *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* gibi bazı termofil mikroorganizmaların farklı OGT'lere sahip olduğunu hatta %35 gibi daha düşük GC içeriğini paylaştığını argüman yapmışlardır (Blumer-Schuette vd., 2011). Bu nedenle, GC içeriğinin termofiliden bağımsız olduğunu söylemek, en azından tüm termofiller için evrensel olmadığını belirtmek yanlış olmaz (Barabote vd., 2009; Saunders vd., 2003; Wang vd., 2006; Zeldovich vd., 2007). Diğer yandan, mRNA'lardaki yüksek AG içeriği, termofillerin hayatta kalabilmesi için seçici bir cevaptır. Mezofilik türlerle karşılaştırıldığında termofilik mRNA'lar yüksek pürin/pirimidin oranları ile zengin pürin içeriğine sahiptir. Fakat pürin içeriği ile OGT'nin ilişkisi net olarak ortaya konabilmiş değildir (Mahale vd., 2012). Bu nedenle baz sapması, termofiliye katkıda bulunur, fakat baz sapması ile termofili arasındaki ilişki, büyüme ortamı, bakterinin Gram boyama özelliği gibi daha fazla faktör kullanılarak değerlendirilmelidir.

Protein kodlayan dizilerdeki sinonim kodon kullanım eğilimi, termofilik türlerin genomik yapısını değerlendirmede önemli bir diğer özelliktir. Termofillerde kodon ,özellikle arjinin ve izolösin kodonları sıklıkla AGG, ATA ve AGA kodonları şeklinde, kullanım eğilimi mezofilik türlerdekenden farklıdır (Hickey vd., 2004; Lobry vd., 2006; Lynn vd., 2002; Singer vd., 2003). Nükleotit kombinasyonlarının genomik değerlendirmesi, A ve G'nin en yakın komşular olduğu yüksek sıklıkta termofil

genomlarında yer aldığını ortaya çıkarmaktadır (Zeldovich vd., 2007). Termofillerdeki sinonim kodon kullanımındaki farklılığın, büyüme sıcaklığının seçici baskısı ile bağlantılı önemli faktörler olduğu düşünülmektedir (Wang vd., 2015).

Baz sapmaları doğrudan proteinlerdeki aminoasit kullanım varyasyonunu etkilemektedir. Termofilik organizmalardaki protein analizi sonuçları termofil proteomundaki aminoasit kompozisyonunun mezofillerdekinden ayırtedilebileceğini göstermektedir. Yüklü rezüdilerin (Glu, Arg, ve Lys) frekansındaki artış, polar yüksüz rezüdilerin (Asn, Gln, Ser ve Thr) frekansındaki azalış, termo-etiketli aminoasitlerin (His, Gln ve Thr) frekansındaki azalış, (Glu _ Lys)/(Gln _ His) oranındaki artış gibi tartışma konusu olan bazı gözlemler genellikle kabul edilmektedir (Farias vd., 2003; Kreil vd., 2001; Singer vd., 2003; Tekaiia vd., 2002). Bununla birlikte Zeldovich ve arkadaşları, aminoasit dizilimi IVYWREL'in prokaryotik mikroorganizmalar için termofilik özelliklerin evrensel proteomik imzası olarak hizmet edebileceğini belirtmişlerdir (Zeldovich vd., 2007). Bu nedenle, özgün aminoasit kullanımı, yüksek sıcaklığa adaptasyon için bir strateji olarak düşünülebilir (Wang vd., 2015).

2.3.1.5 Termofillerde yüksek sıcaklıklara global gen ekspresyon cevapları

Termofiller nispeten geniş sıcaklık aralıklarında yaşarlar, bu da termofillerin çevredeki sıcaklık değişimlerine hızlı cevap verebilmelerini sağlayabilmektedir, bunu belirli genlerin optimum ekspresyon statülerini sürdürerek işlevsel ağ oluşturmak suretiyle yaparlar. Santral dogmanın tersine transkriptom ve proteom verileri, termofillerdeki gen ekspresyon seviyelerini temsil etmektedir (Wang vd. 2015).

2.3.1.6 Termofillerde operon genlerinin sıcaklık cevapları

Genlerin operonlardaki birliği mikroorganizmaların değişen çevre şartlarına adapte olmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Bu türlerdeki genlerin neredeyse yarısı operon yapısı içinde lokalize olmuştur. Ökaryotik metanojenler %60'a varan yüksek yoğunluklu operonlara sahipken termofiller ise %43-56 yoğunlukta operona sahiptir, bu da farklı türlerde operon oluşturma derecesinin OGT ile korelasyon göstermediğini önermektedir. Fakat operon yapısının termofillerde daha stabil olduğuna inanılmaktadır

(Yoon vd., 2011). Daha önemlisi, operon genlerinin ekspresyon statüleri termofili ile ilişkilidir. Örneğin, TransOmics stratejisi ile *Thermoanaerobacter tengcongensis*'in analizi, 250 gen ekspresyonunun sıcaklık bağımlı olduğunu ve mRNA düzeyinde diferansiyel genlerin çoğunun protein düzeyinde de ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sıcaklığa bağlı enzimlerin genomik lokasyon analizleri, bu genlerin %30'unun ilgili biyolojik fonksiyonlara sahip komşu birimlerde olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu gen kümelerinin potansiyel operonlar olduğu teorik olarak tahmin edilebilir (Chen vd., 2013). Başka bir termofil olan *Thermotoga maritima* ile yapılan bir çalışma da yaklaşık 15 gen operonunun (bunlar en iyi bilinen ısı şok operonları olarak da bilinen *hrcA-grpEdnaJ* (TM0851-TM0850-TM0849), *groES-groEL* (TM0505-TM0506), ve *dnaK-sHSP* (TM0373-TM0374) ayırtecdici bir şekilde yüksek sıcaklıklarda ekspre edilebilmiştir (Pysz vd., 2004).

Termofillerdeki gen ekspresyonu ile ilgili kanıtlar, operon regülasyonunun termofillerin hayatta kalabilmeleri için genlerin birlikte regülasyonunu sağladıkları nedeni ile daha ekonomik olduklarından oldukça önemli bir yol olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte termofillerdeki birlikte ifade edilmiş operonlar büyük ihtimalle global düzenleyiciler vasıtası ile birlikte regüle edilebilir, bu da mikroorganizmaların çevresel değişimlere hızlı cevap verebilmesi için etkili bir yoldur. Bu noktada, çevresel sıcaklık değişimlerine cevap veren gen kümelerinin ekspresyonunu global olarak kontrol eden bazı düzenleyicilerin bulunup bulunmadığı sorusu akla gelmektedir. *E.coli*'de CRP, IHF, FNR, FIS, ArcA, Lrp,ve H-NS gibi bazı global düzenleyicilerin olduğu bildirilmiştir, bu da *E.coli* genlerinin %50'sinin transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Browning vd., 2004). σ^{32} , ısı şok transkripsiyon faktöründe olduğu gibi bazı global regülasyon sistemleri çakışabilir, yani hem ısı şok cevap proteinlerinin ekspresyonunu hem de şaperon proteinlerini regüle edebilir. Diğer yandan, sıcaklık dışında farklı streslere karşı oluşturulan gen cevapları da mevcut olup global gen regülasyon sistemleri tarafından düzenlenebilmektedir (Wilson vd., 2013).

2.3.1.7 Termofillerde stabil ve etkili protein sentez mekanizması

Etkili sayıda protein, fonksiyonel performans için gerekli olduğundan termofillerdeki protein sentez mekanizmasının yüksek sıcaklıklarda stabil ve etkili olduğu düşünülmektedir. Translasyon mekanizmasının ana elementleri, tRNA, rRNA ve ribozomal proteinlerden ibarettir. Yüksek GC içeriğine sahip termofil tRNA ve rRNA'ları mezofillerdeki tRNA ve rRNA'lardan daha stabildir. Bu da bu mekanizmanın protein bileşenlerinin neler olduğunu akla getirmektedir. *Thermoanaerobacter tengcongensis* proteomik analizi ribozomal protein S1'in optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda yukarı doğru regüle olduğunu önermektedir (Chen vd., 2013). Termofilik bakteri *Bacillus methanolicus* MGA3 ile ilgili yapılan proteomik çalışması, ribozomal protein L17, 50S ribozomal protein L14, ve 30S ribozomal protein S18 gibi bazı ribozomal protein üyelerinin bol miktarda artışını ortaya çıkarmıştır (Muller vd., 2014). *Pyrococcus furiosus*'taki proteom ve transkriptom çalışması, LSU ribozomal proteinler L10E, L12A, ve L7AE gibi proteinlerin 90 °C'de 70 °C'dekinden daha fazla mevcut olabildiğini göstermiştir (Trauger vd., 2008). Bu nedenle yukarı doğru regüle olmuş ribozomal proteinlerin termofillerde ısı stresine karşı etkili protein sentezi için gerekli olduğunu söylemek mantıklı olacaktır. Bununla birlikte termofillerdeki hem arke hem de bakteriyel ribozomal protein kompleksleri, mezofilik üyelerle karşılaştırıldığında yapıları daha kompakt olmalarına rağmen 23S rRNA'ya daha fazla afiniteye sahiptir (Running vd., 2009; Shcherbakov vd., 2006; Yangala vd., 2007).

2.3.1.8 Termofillerde sıcaklık-duyarlı genlerin ekspresyonu

Bazı gen ekspresyon ürünleri, termofillerin termal adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu genlerin daha yüksek sıcaklıklarda spesifik fonksiyonlara sahip olduğu sıcaklık değişimlerine cevaben ya transkriptomik ya da proteomik seviyede yukarı regülasyona uğradığı düşünülmektedir (Wang vd. 2015).

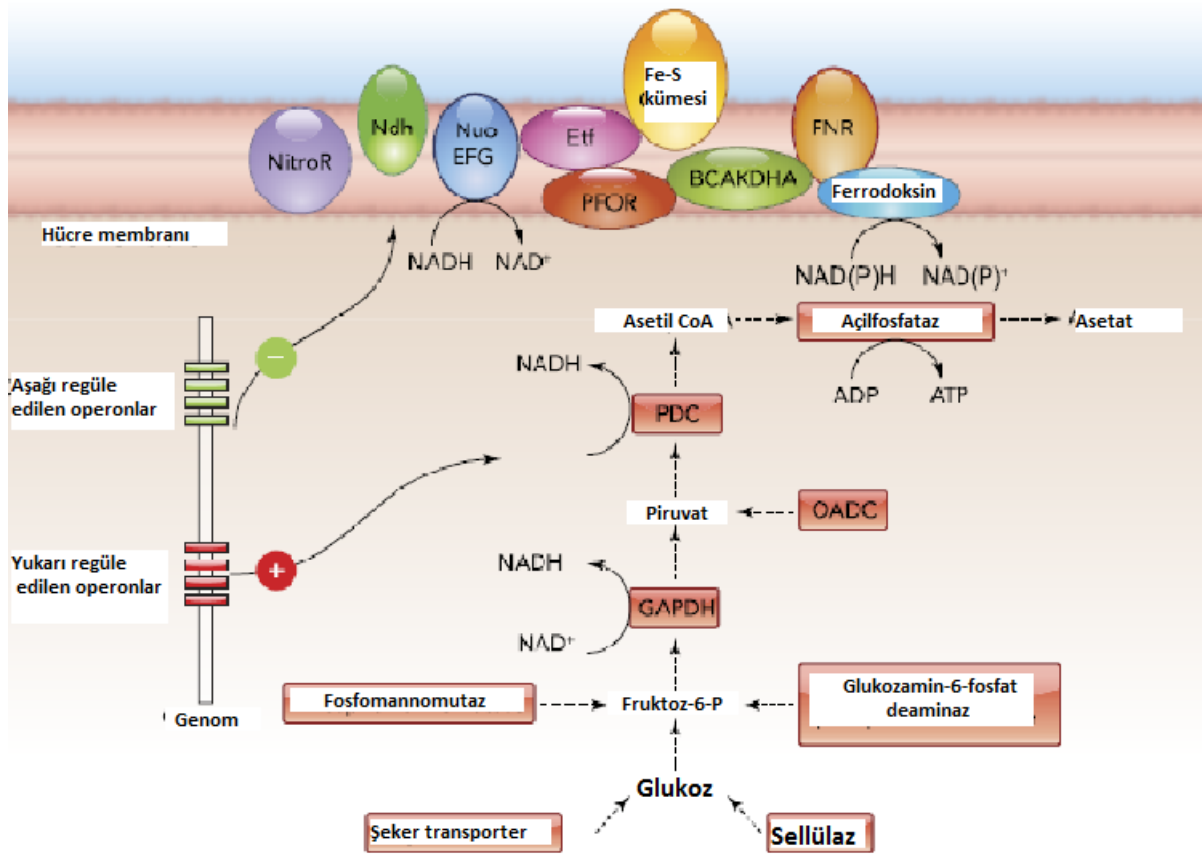
Isı şok proteinleri ısı stresine cevapta en fazla bilinen proteinlerdir ve ısı stresi ile indüklenen hücresel zarara karşı koruma görevini üstlenir (Mizobata vd., 2000). Termofillerde ısı şok proteinlerinin yukarı regülasyonui hem transkripsiyonel hem de proteomik seviyede gözlemlenmektedir. Örneğin, 90 °C'den 105 °C'ye sıcaklık

değişiminde *Pyrococcus furiosus* transkripsiyon seviyesinde *Hsp60* ve *Hsp20*'nin yukarı regülasyonunu tetikler (Shockley vd., 2003); *Thermotoga maritima*'daki *groEL-growES*, *hrcA-grpE-dnaJ*, ve *dnaK-sHSP*'nin ekspresyonu 80 °C'den 90 °C'ye artan sıcaklıkta bir cevap olarak indüklenmiştir (Johnson vd., 2006), oysa ki, *Sulfolobus solfataricus* sHSPs ise 5 dakika süresince 80 °C'den 90 °C'ye değişen sıcaklığa cevap olarak yukarı regülasyona uğramıştır. Proteomik seviyede ise, sıcaklık artışına cevap sonucu GroEL, GroES, DnaK, ve GrpE gibi şaperon proteinlerinin yukarı regülasyonu *Thermoanaerobacter tengcongensis* ve *Thermotoga maritima* gibi bazı termofil türlerde gözlemlenmiştir (Chen vd., 2013; Wang vd., 2007; Wang vd., 2012). *Thermoanaerobacter tengcongensis*'nin proteomik analizi HSP60 (TTE0580), sHSP (TTE2587), ve HSP10 (TT0579) gibi ısı şok proteinlerinin kompleks oluşturmak için diğer proteinlerle etkileşime girdiğini ortaya koymuştur (Meng vd., 2009). Bu da ısı şok proteinlerinin diğer proteinlere karşı koruma rolünü göstermektedir.

Glikoliz yol izi ile ilgili proteinlerin, termofillerin ısı stresi ile baş edebilmeleri için hızlı enerji sağlayarak termofili ile ilişkili ana elementler olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, termofillerdeki bu proteinlerin ekspresyon statüleri fizyolojik cevabı yansıtmaktadır. Hızlı sıcaklık artışında *Geobacillus* sp. *NTU 03*'nin proteomik analizi, elektron vericisi olarak NADH'ı kullanan yedi dehidrogenazın aşağı regülasyona uğradığını göstermiştir (Shih vd., 2011), *Thermoanaerobacter tengcongensis*'nin kantitatif proteomik çalışması; NADH dehidrogenaz ve elektron transfer flor protein genleri gibi oksijenli solunum veya kükürt solunumunda rol oynayan genlerin de aşağı regülasyona uğradığını açığa çıkarmıştır. *Thermus thermophilus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermotoga maritima* ve *Geobacillus thermoglucosidasius* gibi bazı termofiller ile yapılan çalışmalar sonucu, NADH-bağımlı enzimlerin ve solunumla ilgili genlerin attenuasyonuna karşın, glikoliz yol izi ile ilgili genlerin mRNA ve protein seviyesinde artan sıcaklıkla yukarı regülasyona uğradığı gösterilmiştir (Chen vd., 2013; Gao vd., 2014; Li vd., 2010; Loftie-Eaton vd., 2013; Wang vd., 2012). Bununla birlikte, *Geobacillus thermoglucosidasius* ile yapılan başka bir çalışmada ise yüksek redoks seviyesinden düşük redoks seviyesine değişen çevresel şartlarda cevaben glikoliz yukarı regülasyona TCA döngüsü ise aşağı regülasyona uğratılmıştır (Loftie-Eaton vd., 2013); bu da redoks seviyesinin ısı cevabında yavaşlatılabileceği anlamına gelebildiğini göstermektedir. *Thermoanaerobacter tengcongensis*'de enerji üretim süreci ile ilgili önerilen model (Chen

vd., 2012) Şekil 2.3 'te verilmiştir. Çevresel sıcaklığın artışı süresince kükürt solunumu ve glikolizisin gen ailelerinin transkripsiyonel düzenleyicileri aktive edilmiş ve gen ekspresyonunda ters koordinasyon ağı oluşturulmuştur, bu da karbonhidrat metabolizması aracılığıyla enerji üretiminde artışa ve membran proteinlerinin solunum kapasitesinin yavaşlamasına neden olmuştur (Chen vd., 2012).

Antioksidan proteinler ve VapBC proteinleri gibi diğer protein gruplarının ekspresyonu da sıcaklık değişimi ile ilgilidir. Çevresel sıcaklığın artışı ile birlikte, thioredoxin peroksidaz, rubredoksin, ve süperoksit dismutaz gibi termofillerdeki bazı antioksidan proteinler yukarı regülasyona uğramıştır, bu da sıcaklık artışının oksidatif strese eşlik ettiğini göstermektedir. Fakat, tip II antitoksin sistemin en geniş ailesi olan VapBC proteinleri ve prokaryotlardaki virülansla ilgili proteinlerin sıcaklık değişimleri ile tetiklendiği *Sulfolobus solfataricus*'un global transkriptomik analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Bu mikroorganizmadaki vapBC lokusunun nakavtı, transkriptomik profili değiştirmiş ve bu da arkeyi ısı şok cevabı açısından değişken hale getirmiştir (Cooper vd., 2009).



Şekil 2. 3 Termal cevap süresince *T. tengcongensis*'de enerji üretim metabolizmasını gösteren şematik diyagram. Kare kutudaki proteinler, glikolizde ve ilgili yolizlerinde rol oynamakta olup sitoplazmada lokalize olmuştur ve büyüme sıcaklığının artışına cevaben yukarı regülasyona uğramaktadır. Eliptik kutulardaki proteinler ise kükürt solunumu ile ilgili sistemde rol oynayıp genelde membran üzerinde veya membranla ilişkili lokalize olmaktadır ve sıcaklık artışına cevaben aşağı regülasyona uğramaktadır. NitroR, nitroredüktaz; Ndh, NADH dehidrogenaz FAD-içeren alt birim; Nuo EFG, NADH dehidrogenaz/NADH:ubiquinon oksidoredüktaz alt birimi E/F/G; Etf, elektron transfer flavoproteini; PFOR, piruvat:ferredoxin oksidoredüktazı ve ilgili 2-oksooasit:ferredoksin oksidoredüktaz; Fe-S kümesi, Fe-S-kümesi-içeren hidrojenaz; BCKDHC, dallanmış-zincir alfa-keto asit dehidrogenaz kompleksi; FNR, ferredoksin-NADP(H) redüktaz; GAPDH, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz; OADC, oksaloasetat dekarboksilaz; PDC, piruvat dehidrogenaz kompleksi (Wang vd. 2015).

2.3.1.8 Termofillerde proteinlerin termostabilitesi

pH ve tuzdan farklı olarak sıcaklık, iç ve dış hücresel sınır arasındaki farklılığa sahip olmayan hücreleri etkilemektedir. Yüksek sıcaklıklarda gelişen termofiller için karşı karşıya kalınan bir sorun, doğal konfigürasyonunda hücresel proteinlerin

stabilizasyonudur. Termofil türlerde, böylesine yüksek sıcaklıklarda protein stabilitesini nasıl sürdürdüğü son zamanlarda ilgi gören konulardan olmuştur. Son zamanlarda yapılan proteomik çalışmaları, termofillerde protein stabilitesini destekleyen bazı kanıtlara ulaşmıştır.

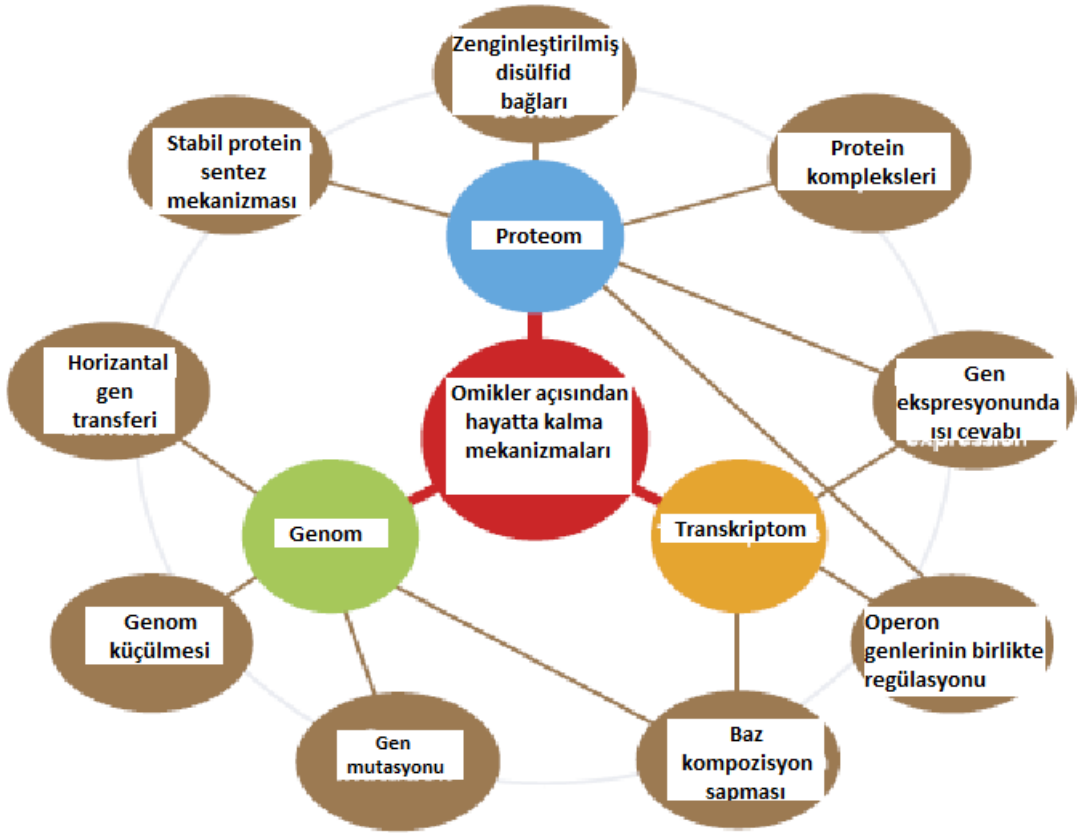
Termofillerdeki tüm proteinlerin tamamının termal olarak stabil olmadığı düşünülmektedir. Sıcaklıktaki artıştan dolayı gelişen adaptasyon, regülatör proteinlerde olduğu gibi katalitik aktiviteye sahip proteinlerde de dikkat çekmektedir (Gu vd., 2009). Yun ve arkadaşları, *in vitro* ısı uygulamasından sonra sitozolik proteomda hipertermo-stabil proteinlerin ikincil dizilerini tanımlamışlardır. Bu tanımlama listesi bu proteinlerin hücre içi proteaz, tioredoksin redüktaz, triosefosfat izomeraz, hidroperoksit redüktaz, proteazom-ilişgili proteinler, ve translasyon başlangıç faktörlerini içermekte olup işlev gerektiren ve ısı dirençli proteinlerdir (Yun vd., 2011). Bununla birlikte termofillerin proteomik analizi, yüksek sıcaklıkta belirlenebilir protein sayısının optimum büyüme sıcaklığındakinden daha az olduğunu göstermiştir (Li vd., 2010; Wang vd., 2007; Wang vd., 2012).

Malik ve arkadaşları, genomik hesaplamalar kullanarak bazı termofillerin mezofillere göre daha fazla sayıda disülfid köprülerine sahip olduğunu bulmuşlardır (Mallick vd., 2002). Bazı termofiller, disülfid bağlarını protein stabilizasyonunda ana mekanizma olarak kullanmaktadır (Beeby vd., 2005; Mallick vd., 2002; Jorda ve Yeales , 2011). Termofillerde gerçekleştirilen proteomik analizleri bu savı doğrulamaktadır (Boutz vd., 2007; Heinemann vd., 2013). Örneğin, *Pyrobaculum aerophilum*'da floresan etiketleme ile disülfid bağlarının niceliksel olarak ortaya çıkarılması sonucu hücre lizatında %47 sistein rezidüsü bulunmuştur, bu rezidüler disülfid bağlarının oluşumunda rol oynamaktadır. Oysa ki, *E.coli*'de bu rezidüler sadece %8 oranındadır. Bununla birlikte iki boyutlu jel elektroforezi ile *Pyrobaculum aerophilum*'da disülfid bağlanma ile oluşturulan protein komplekslerinin frekansı *E.coli*'dekinden çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Çeşitli hipertermofil arkelerde de proteinlerle ilgili yapılar, disülfid bağlarını desteklemektedir (Caciapuoti vd., 2004; Littlechild vd., 2004). Termofil proteinler ve onların kompleksleri kompakt yapılar olup disülfid bağları da bu yapının oluşmasını kolaylaştırmaktadır (Boutz vd., 2007).

Hücre içi ortam genellikle indirgeyici statüde olduğu için disülfid bağlarının oluşumu bu durumu önleyebilmektedir. Karşılaştırmalı genom çalışmaları, disülfid oksidoredüktaz proteininin termofillerde bulunduğunu ve bu organizmaların hücre içi disülfid bağlanma ile zenginleştirildiğini açığa çıkarmıştır (Beeby vd., 2005; Pedone vd., 2004).

Proteinlerin hücre içinde bağımsız birimler olmadığı kabul edilir ama etkili iletişimler sağlayacak karmaşık ağları oluşturmak için birbirleri ile etkileşim halindedir. Termofillerde proteinlerin yaklaşık %20'si homomerik kompleksler, heteromerik kompleksler ve süperkompleksleri içeren komplekslerin oluşumu ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir. *Thermoanaerobacter thengcongensis* 'in analizi bazı kompleks bileşenleri belirlemek için yapılan Blue Native Elektroferez ile ayrılan protein komplekslerin sayısını ortaya çıkarmıştır (Meng vd, 2009). Buna ek olarak bu kompleks bileşenler kültür sıcaklarındaki değişikliklerden dolayı değişkendir. Bu durum termofillerdeki protein etkileşimlerinin sıcaklığa bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğin, HSP yüksek sıcaklıklarda protein etkileşimlerini koruduğu için kompleksteki HSP'lerin sayısı sıcaklık arttıkça artmaktadır. Bu hipotez *Thermoanaerobacter thengcongensis*'teki glukokinazın (GLK) termal stabilitesi çalışmasıyla doğrulanmıştır. Bakteride ADP bağımlı (ADP-GLK) ve ATP bağımlı (ATP-GLK) olmak üzere iki tip GLK vardır. ADP-GLK stabil ve 80 °C'de aktiftir ve güçlü olarak HSP60 ile ilişkilirken; ATP-GLK HSP60 ile ilişkili olmadığı için 80 °C'de inaktiftir ve stabil değildir (Qian vd, 2013).

Termofillerdeki yaygın mekanizmalar olan ısı şok cevapları ve ısı ortama alışma, organizmaları ısı stresinden koruyan moleküler olayı açıklayan modeldir. Şekil 2.4'deki özetlendiği gibi, omik bakış açısından, yüksek sıcaklıklara termofillerin adaptasyonu genetik seçilim ve fonksiyonel ortama alışmaları içeren farklı stratejilerin kombinasyonudur.



Şekil 2. 4 Omik yaklaşımları kullanarak termofillerin hayatta kalma mekanizmalarını etkileşimli olarak gösteren şema (Wang vd. 2015).

Termofillerin genomik çalışmaları, genomik boyut boşluğu, horizontal DNA transferi ve gen mutasyonları gibi kalıtsal varyasyonların seviyelerine bağlı olarak termal toleransın evrimini işpat etmektedir. Ancak termofillerde transkriptom ve proteomda gen ekspresyonunun analizleri anahtar fonksiyonel genleri içeren operonların global transkripsiyonel düzenlemesi ısı artışına etkili cevaptır. Bu mekanizma termostabil ve etkili protein sentez mekanizmaları ile desteklenmektedir. İşlevsel bir ağ oluşumu, özellikle yüksek sıcaklıklarda işleyen bu proteinleri, termofilik ortama uyum sağlamada da önemlidir. Proteomik kanıtlar pek çok termofilin HSP ailesindeki proteinler, glikoliz yolağı, antioksidanlar ve antitoksinleri içeren canlı hücreler için önemli fonksiyonlar ve yüksek termostabiliteli proteinleri kodlayan gen kümelerini içeren pek çok termofilik göstermektedir. Termal toleransı kontrol eden protein etkileşimleri vardır. Termofillerin omik verileri ısı şoku yanıtları katılan makromoleküllerin açık ve genel bir görünümünü sunmaktadır. Termofillerdeki sıcaklık bağımlı makromoleküllerin keşfi ile ilgili omik veriler termal adaptasyon mekanizmalarını anlaşılmasını sağlamaktadır. Omik

yaklaşımların sıkı entegrasyonun ele alınması için bir çok soru gerekmektedir. Birincisi gen kazanımı, genomik büyüklük değişimi gibi genomik değişiklikler ve termo adaptasyonun ilişkisi, transkriptom ve translayon süresince gen ifadesinin kanıtlarını yokluğundan dolayı fonksiyonel seviyede değişmemektedir. İkincisi, micro-RNA'lar ve DNA metilasyonunun son analizleri bakteriyel genomların araştırılmasında kullanılmaktadır. Ama bu elementlerin genomik termostabiliteye nasıl katkı sağladığı bilinmemektedir. Üçüncüsü, histon gibi koromozoma bağlı proteinler, genomik DNA stabilitesini etkilemektedir oysaki termofillerdeki genomik DNA ve kromozom proteinleri arasındaki ilişki hakkında kısıtlı bilgi yer almaktadır. Dördüncüsü, termo adaptif modellerin düzeni için gerekli gen ifadelerinin zaman ve sıcaklık bağımlı dinamik prosesleri yüksek sıcaklıklara ısı şok cevaplarıdır. Yapılan transkriptom ve proteomik araştırmaları gen ifadelerindeki değişikliklerin miktarını açıklamamaktadır. Beşincisi termofillerin adaptasyon ve metabolomiklere ilişkin çalışmalar hala yeterli değildir. Bilindiği gibi, bazı termofiller endüstriyel değerlidir, çünkü bioenzim ve biyoyakıt çeşitlerini salgılamaktadır (Wang vd. 2015).

Enzim üretimi ve karbohidrat parçalama prosesleri çevreye uyum porosleri olarak mümkün olduğunca kabul edilmelidir. Tüm bu zorluklar omik stratejileir kullanılacak olan termofil çalışmaları için ilgi çekmektedir (Wang vd. 2015).

2.4 Termofili ve Biyoteknoloji

Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar sadece biyolojik nedenlerle değil başka yönleri ile de oldukça ilgi çekicidirler. Bu organizmalar yüksek sıcaklıklarda hızlı ve verimli bir şekilde cereyan eden endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde önemli avantajlar sağlar (Urbieta vd., 2015).

Son yıllarda ekstremofillerle yapılan çalışmalar daha çok bu mikroorganizmaların kendileri ya da ürünlerinin potansiyel biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni mikrobiyal suşların izolasyonu, yeni bileşiklerin ve yol izlerinin identifikasyonu, hücresel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile olası potansiyel de giderek artmaktadır (Satyanarayana vd., 2005).

Heterotrofik termofil prokaryotik mikroorganizmalar çeşitli polimerik substratları karbon kaynağı olarak kullanabilme potnsiyeline sahiptir. nişasta, ligninoseüloz, kitin, gibi kompleks doğal polimerlerin hemde protein ve yağların degradasyonunu ekstrem şartlarda sahip oldukları enzimler ile gerçekleştirebilmektedirler. Biyokatalistlerin üstünlüğü sadece onların termal adaptasyonlarından dolayı değil aynı zamanda substrat seçiciliği, stabilitesi ve çözücü toleranslarından dolayıdır (Urbieta vd., 2015).

Termofillerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanımının avantajları şu şekilde sıralayabiliriz.

- ✓ Yüksek metabolik aktivite ürün oluşum oranlarında artışa neden olur.
- ✓ Patojenik mezofilik mikroorganizmaların ve/veya kontaminantların eliminasyonu ya da inaktivasyonu
- ✓ Termostabil makromolekül ve metabolitlerin üretilmesi
- ✓ Metabolik reaksiyonlar benzer yüksek sıcaklıklar gerektirir.
- ✓ Isıtma basamağından sonra soğutma basamağına gerek duyulmamaktadır.
- ✓ Difüzyon oranları, ionizasyon ve kimyasalların çözünbilirliği artmaktadır.
- ✓ Solüsyonların düşük yoğunluk, yüzey gerilimi ve viskozitesi reaksiyon oranlarını artırmaktadır.
- ✓ Uçucu ürünlerin doğrudan geri kazanımı
- ✓ Düşük bakteriyel biyokütle üretimi yüksek istenilen ürün üretimi ve düşük atık üretimi
- ✓ Termostabil enzimlerin üretilmesi (Urbieta vd., 2015).

2.4.1 Termozimler

Termofil ve hipertermofillerden elde edilen enzimler yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi gereken biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilir ve mezofillerden elde edilen enzimlerden daha dayanıklıdır. Dolayısıyla bu tip enzim preparasyonlarının raf ömrü daha uzundur (Madigan vd., 2000). Bununla birlikte termostabil proteinlerin yüksek sıcaklıkta difüzyon oranı ve çözünürlükleri artmaktadır. Bu proteinler yüksek sıcaklığa olduğu kadar kimyasal denatürantlara (organik solvent gibi) da dirençlidir. Mezofilik proteinlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlara nazaran termozimlerin reaksiyon hızı ve katalitik aktiviteleri yüksektir. Ayrıca bu sıcaklık aralığında reaksiyon ortamının

viskozitesi de düşük olacağından kütle transferi de daha iyi olacaktır (Brock, 1986). Yüksek sıcaklıklarda reaksiyon bileşenlerinin çözünürlüğü artmış düzeydedir. Çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin rol aldığı çeşitli süreçlerde, sıcaklığın yükseltilerek çözünürlüğün artırılması ile reaksiyon hızının artması sağlanmaktadır. Bununla birlikte istenmeyen komplikasyonlara neden olan kontaminasyon riski yüksek sıcaklıklarda azalmaktadır (Van den Burg, 2003). Stabil enzimler organik solventler ve deterjanların kullanımına olanak sağlar, proteolitik aktiviteye de daha dirençlidir. Fakat bazı durumlarda enzim kofaktörleri stabil olmayabilir ve şeker-enzim karışımında Maillard reaksiyonu gibi istenmeyen reaksiyonlar gelişebilir (Bruins vd., 2001). Sürecin sıcaklığının arttırılması ve soğutulması maliyeti arttırabilir. Bu nedenle, yüksek sıcaklık gerektiren enzimatik reaksiyonlarda ekstreozimlerin kullanılması üstünlük sağlamaktadır.

Termoaktif enzimler yaygın olarak araştırılmakta ve yapı-fonksiyon ilişkisini anlamakta model sistemler olarak kullanılmaktadır. Termostabil enzimlerin üç boyutlu yapıları aydınlatılmıştır ve mezofilik emsalleri ile yarışacak düzeyde olduğu gösterilmiştir (Egorova ve Antranikian, 2005). Bazı termostabil enzimlerin mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termostabilitelerinin bozulmadığı görülmüştür (Niehaus vd. 1999). Bundan dolayı termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.1) (Jaenicke ve Bohm 1998).

Çizelge 2. 1 Biyokatalitik termozimlere örnekler

Enzim	Organizma	Konakçı/ indüksiyon	Stabilite/Aktivite	Kaynak
Hipertermofilik esteraz	<i>Pyrococcus furius</i>	<i>E.coli</i> /heterolog (kendi promoteri)	Topt =100 °C t _{1/2} = 50 dk (126 °C)	Ikeda vd., 1998
Termofilik esteraz	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>E.coli</i>	Topt = 45 °C t _{1/2} = 1 h (64 °C)	Alvarez vd., 1999
Termofilik esteraz	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>E.coli</i>	70 °C'de aktif	Manco vd., 1998

Çizelge 2. 1 (devam) Biyokatalitik termozimlere örnekler

Termofilik lipaz	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>E.coli</i> /IPTG	Topt =68 °C 55 °C'de 30 dk stabil	Kim vd., 2000
Termofilik esteraz	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	<i>E.coli</i>	70 °C'de aktif	Manco vd., 1998
Termofilik lipaz	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	<i>E.coli</i> DH5α/pUC18	Topt = 60-70 °C	Schmidt- Dannert vd., 1996
Hipertermofilik pullulanaz	<i>Thermococcus aggregans</i>	<i>E.coli</i>	Topt = 95 °C t _{1/2} = 2.5 h (100 °C)	Niehaus vd., 2000
Termofilik pullulanaz	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	60 °C'de 30 dk sonrası %55'i aktif/pH 5.5	Stefanova vd., 1999
Termofilik ve asidofilik α-amilaz	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	<i>E.coli</i>	75 °C'de optimum aktivite ve pH = 3	Matzke vd., 1997
Hipertermofilik fruktoz aldolaz (Tip II)	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	>2 h için 90 °C'de aktif ve stabil	De Montigny ve Sygusch, 1996
Hipertermofilik fruktoz aldolaz (Tip I)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.6 h'de 97 °C'de stabil Topt = 37 °C	Götz vd., 1980
Termofilik 2-keto- 3-deoksiglukonat aldolaz	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>E.coli</i> JM109/pREC7	t _{1/2} = 2.5 h (100 °C)	Buchanan vd., 1999
Termofilik nitril hidrataz-amidaz (tüm hücre)	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	65 °C'de optimum büyüme	Graham vd., 2000

Çizelge 2. 1 (devam) Biyokatalitik termozimlere örnekler

Termofilik nitril hidrataz	<i>Bacillus pallidus</i>	<i>Bacillus pallidus</i>	55 °C'ye kadar termostabil	Cramp ve Cowan, 1999
Hipertermofilik alkol dehidrogenaz	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	t _{1/2} = 160 h (85 °C'de), 7 h (95 °C'de)	Ma ve Adams, 1999

Sıcaklığa dayanıklı enzimlere ait en tipik örnek termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiş olan DNA polimeraz enzimidir. Taq polimeraz olarak adlandırılan bu enzim özgül DNA dizilerinin çoğaltılmasında çok önemli bir teknik olan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) tekrar eden basamakların otomasyonu için kullanılmaktadır. Sıcaklığa dayanıklı enzimlere ve diğer termostabil hücre ürünlerine ait birkaç kullanım şekli daha bilinmekte ve endüstriyel uygulamalar için bu tip yeni ürünler geliştirilmektedir (Madigan vd., 2000).

Sadece 2 ticari şirket arke ve ürünlerinin geliştirilmesi ile ticari ürünler haline getirilmesi yönünde çalışmaktadır. Bunlar Archaezyme Ltd., Jerusalem, İsrail ve ArchaeaSolutions Inc., Tyronei Georgia, ABD'dir. Son yıllarda termozimlerle ilgili oldukça iyi bilimsel gelişmeler olmuştur. Bunların ileride uygun yatırımlarla ticari açıdan da değerlendirilmesi beklenmektedir (Pechkove ve Riekal, 2011).

2.4.1.1 Polisakkarit parçalayan enzimler

Karbonhidratlar yaşayan organizmalar için ana enerji ve karbon kaynağıdır. Nişasta, selüloz, ksilan, mannan, pektin, kitin ve diğer polimerlerin değişken yapılarından dolayı biyokatalistler glikozidik yapının farklı bağlarını spesifik olarak hedef almaktadırlar (Elleuche vd. 2015).

2.4.1.2 Nişasta hidrolize eden enzimler

Nişasta, dallanmış çözüner polimer amilopektin ve lineer çözünmeyen amilozdan oluşan heterojen bir polisakkarittir. Nişastanın karmaşık yapısı nedeniyle etkili olarak

parçalanabilmesi için α -amilaz (EC 3.2.1.1), β -amilaz (EC 3.2.1.2), glukoamilaz (EC 3.2.1.3), α -glukozidaz (EC 3.2.1.20) ve pullulanazı (EC 3.2.1.41) içeren çeşitli enzimlere ihtiyaç vardır (Ellueche ve Antranikian 2013). Nişasta gıda endüstrisinde glukoz ve fruktoz (yüksek fruktoz-glikoz şurup) için önemli bir kaynak oluşturmaktadır enzimatik ve sakkarifikasyon ile sıvılaştırma basamağında geleneksel olarak dönüştürülmektedir. Bakteriyal sakkarifikasyon için günümüzde kullanılan α -amilaz ile kombine çalışan glukoamilaz nişasta molekülündeki 1,4 bağlarına karşı olan tipik bir enzim (Bertaldo ve Antranikian 2002).

Son zamanlarda nişastanın endüstriyel sakkarifikasyonunda kullanılmak üzere *Thermus thermophilus* HB'de ısı aktif aminopullulanaz olan TTHPu çalışılmıştır. Birçok pullulanaz ürün olarak maltoz ve diğer küçük oligosakkaritleri oluştururken ilginç bir şekilde TTHPu maltotrioz karışımı oluşturmaktadır. Bunla birlikte ısıya karşı dirençli aminopullulanazın verimli bir şekilde üretimi için önemli bir sorun enzimin büyüklüğüdür (Wu vd., 2014). Örneğin *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E yada *Geobacillus thermoleovorans* NP33 türlerinden elde edilen büyük aminopullulanazın performansı korunmamış C- terminal bölgesinin kesilmesi ile geliştirilmiştir ki bunun sonucunda termostabilite ve aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Lin vd., 2008; Nisha ve Satyanarayana 2013). S450C ve K415C aminoasitlerinin ek bir disülfid bağı ile bağlanması ile mutant arkeal α -amilaz (FSA Δ SK) elde edilmiştir. FSA Δ SK 100 °C'de 30 dk sonra aktivitesinin % 50'sini korumaktadır (Li vd., 2014). *Geobacillus thermoleovorans*'tan elde edilen kalsiyum bağımlı amilazın detaylı araştırması meydana çıkarmıştır ki bu termozim endüstride jelatinleşme koşulları altında ham nişastayı hidrolize edebilme yeteneğindedir (Mehta ve Satyanarayana 2014).

2.4.1.3 Selülotik enzimler

Dünyada çok fazla bulunan bir polimer olan selülozun parçalanması için farklı tipte glokozid hidrolazlar gereklidir. Endo 1,4- β -D glukonazlar (EC 3.2.1.4) farklı boyuttaki oligosakkaritlerin β 1,4 glikozidik bağlarını rastgele kesmektedirler. Ekzo 1,4- β -D glukonazlar (EC 3.2.1.91) küçük oligosakkaritler ve sellobiyoz oluştururlar.

Endo-glukonazlar ve ekzo glukonazlarda artan son ürün inhibisyonuna rağmen 1,4-β-D glukozidazın (EC 3.2.1.21) eklenmesi ile selüloz degradasyonu genellikle artmaktadır (Zhang ve Zhang, 2013).

Selülazlar, tekstil, pulp, kağıt, gıda ve deterjan endüstrisi gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda üretimde ve biyoetanol üretiminde substrat olarak kullanılan glukozun ligninoselülozdan dönüşümünde kullanılmaktadır. Ancak birçok yaygın olarak kullanılan selülazlar sert üretim koşullarında düşük stabiliteye sahiptir (Kuhad vd., 2011).

109 °C'de kristalize selüloza karşı aktif olan bir endoglukonazın keşfi ile Arkeler özgün enzimler için umut verici bir kaynak oluşturmaktadır. Diğer yüksek termostabil endoglukonaz termofilik bir bakteri olan *Dictyoglomus thermophilum*' da keşfedilmiş ve yarılanma ömrü 70 °C'de 336 saat olarak belirlenmiştir (Graham vd., 2011). Bir arkeden elde edilen ve spesifik aktivitesi 3195 U/mg olan β glukozidaz en yüksek aktiviteyi 90 °C'de göstermiştir. Bu termozimlerin uygulaması ile yeni değerli ürünlerin üretimi ve ligninoselülozun ön uygulaması için yeni standartlar getirecektir (Shi vd., 2013; Schroder vd., 2014).

2.4.1.4 Hemiselülotik enzimler

Hemiselüloz bitki hücre duvarında bulunan ve dallanmış polisakkaridlerdir ve oldukça kompleks yapıdadır. Ksilan ve mannanlar yaygın hemiselülozlardır. Yapıları ksiloz, mannoz ve pentoz, hegzoz ya da üronik asit gibi çeşitli yan zincirlerin β-1,4 bağları ile bağlanması ile oluşmaktadır. Ksilan endo-1,4- β-D ksilanaz (EC 3.2.1.8) 1,4-β- D-ksilozidaz (EC 3.2.1.37) ve yan zincir işleyen enzimler tarafından enzimatik olarak hidrolize edilmektedir. Mannanın hidrolizi için endo-1,4- β-D mannanaz (EC 3.2.1.78) , 1,4- β-D mannozidaz (EC 3.2.1.25) ve α-glikozidaz (EC 3.2.1.22) gereklidir (Shallom ve Shoham 2003).

Hemiselülozun endüstriye uygulamaları biyoetanol üretimi için ligninoselülozun çözündürülmesi ve yiyecek ve besin üretim süreçlerinde biyolojik ağartmayı içermektedir. *Thermus brockianus*'dan ve *Thermotoga thermarum*'dan elde edilen ksilanaz endüstriyel uygulamalar için uygun özellikler göstermektedir (Blank vd., 2014; Shi vd. 2013).

Bacillus halodurans' dan elde edilen mannanazın kağıt ve deterjan endüstrisi için ilginç özellikleri karakterize edilmiştir. Bu enzim 70 °C' de, pH 11.0' de deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonuna rağmen yüksek aktivite sergilemektedir (Vijayalaxmi vd., 2013). Hipertermostabil β -mannozidaz bir arke olan *Pyrococcus furiosus* tarafından üretilmektedir. Optimum reaksiyon sıcaklığının 100 °C olması ve transglukozilasyon aktivitesi ile yiyecek ve ilaç endüstrisinde umut vadetmektedir (Park vd., 2011).

2.4.1.5 Pektinolitik enzimler

Pektin bitki hücre duvarının orta lamellerinde bulunan önemli bir bileşendir. Bu bileşim kısmen asetatlı ya da O-metil esterlenmiş α -1,4 D galakturonik asit kalıntılarında oluşmuştur ve bileşimleri bitki türlerine bağlıdır. Ramnogalakturonan 1,4 bağlı D galakturonik asit α 1,2-L-ramnoz ve D-galaktoz ya da L arabinoz yan zincirlerinden oluşur. Poligalakturonaz (EC 3.2.1.15), ramnogalakturonaz (EC 3.2.1.171), pektat lizaz (4.2.2.2) ve pektin lizaz (EC4.2.2.10) poligalakturonanların hidrolizini katalizlerler (Elleuche vd., 2015).

Termostabil pektinaz meyva suyu ekstarksiyonu ya da şarap üretiminde kullanılmaktadır (Sharma vd., 2013). Ancak enzimatik olarak modifiye edilmiş pektinler fonksiyonel gıda ürünlerinde lifli besin olarak kullanılmaktadır (Khan vd., 2013). Son zamanlarda tanımlanana *Caldicellulosiruptor bescii* yüksek sıcaklıklarda stabilite göstermektedir ve 70 °C'de 14 saat yarılanma ömrüne sahiptir. Karakterize edilmiş pektinolitik enzimlerin sayısı amilolitik ve selüloolitik ekstremozimler ile karşılaştırıldığında düşüktür (Chen vd., 2014).

2.4.1.6 Kitinolitik enzimler

Kitin böcekler mantarlar ve kabuklu canlıların yapısal bir bileşenidir. Kitinaz (EC 3.2.1.14) ve kitin deasetilza (EC3.5.1.41)ya da kitinozanaz (EC3.2.1.132) β -1,4-N asetilglukopiranozamin ve ya kitosanın deasetillenmesinde aktiftir. kitinolitik enzimler henüz endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmamasına rağmen bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde ve biyopolimer üretiminde potansiyele sahiplerdir. Kitooligosakkaritler insan sağlığı ve gıda kalitesinin geliştirilmesi için ve antimikrobiyal

ajan olarak kullanılmaktadır. Kitin oligosakkaritlerinin üretimi için çevre dostu enzimatik hidroliz asit hidrolizi ile yer değiştirebilir (Chavan ve Deshpande 2013).

Paenibacillus sp. 1794'ten 70 °C'de 20 saat yarı ömre sahip kitonaz elde edilmiştir. Bu termozimler yüksek sıcaklıklarda konsantre kitosan çözeltilerinin hidrolizinde kullanılabilir (Ziyouni vd., 2013).

2.4.1.7 Proteolitik enzimler

Proteolitik enzimler protein içerikli materyallerin hidrolizi ve endüstriyel uygulamalarda biyokatalist olarak bulunmaktadır. Katalitik etki biçimleri ile karakteristik aktif bölgeleri nin kombinasyonu nedeniyle proteazlar aspartik, sistein, glutamik asit, serin, treonin ya da metaloproteaz olarak adlandırılırlar. Ayrıca pH tercihlerine göre asidik, alkalın, nötral protezlar olarak alt kategorilere ayrılmaktadırlar (Rawlings vd. 2014).

Geniş substrat spesifitelerine ilave olarak dayanıklılıkları deri, gıda ve beslenme ya da ilaç endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanımlarında umut vadetmektedir (Elleuchhe vd., 2015).

Sıcaklık stabilitesine sahip Tk subtilisin protezi hipertermofilik arke olan *Thermococcus kodakarensis* KOD1' den elde edilmiştir. Rekombinan enzim 100 °C' optimal aktivite göstermektedir ve %1 (w/v) SDS, 8M üre ya da 6M guanidium gibi yüksek konsantrasyonlardaki denatürantların kullanılmasında dahi aktivite göstermektedir (Koga vd., 2013). Termosin proteaz benzeri bir enzimdir ve *Sulfolobus solfataricus* 'dan elde edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta ve asit stabil proteolitik arkeal orijinli çok iyi çalışılmış bir proteolitik enzimdir. 75 kDa olan bu proteaz optimum aktivite 70 °C, pH 2.0'de göstermektedir ve 90 °C'de 50 saat yarı ömüre sahiptir (Gogliettino vd., 2014). Buna ilave olarak termofilik bir bakteri olan *Coprothermobacter proteolyticus*'tan serin proteaz olan proteolizin elde edilmiştir ve termostabil özelliği, optimum aktivitesini alkalın pH'da göstermesi, yüksek deterjan konsantrasyonlarına karşı toleranslı olmasından dolayı deterjan endüstrisinde kullanılmaya adaydır (Toplak vd., 2013).

Keratinaz tüy ve kıl gibi keratinli materyallerin degradasyonunu katalizleyen enzimdir. Keratinazlar deri, yiyecek ve yem ya da atık endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılabilirler. Son zamanlarda *Thermoactinomyces strain E79* umut verici bir adaydır. Rekombinant proteaz C2 60-80 °C ve pH11.0' de hem β keratin hem de α keratinde optimum aktivite göstermektedir (Wang vd., 2014).

2.4.1.8 Lipolitik enzimler

Endüstri ile ilgili termofillerden elde edilen lipolitik enzimler olarak tipik trigliserol lipaz ve karboksilesterazlar bulunmaktadır. Lipazlar trigliseridlerdeki uzun zincirli yağ asitlerini (>10 karbon atomu) tercih ederken kısa zincirli (<10 karbon atomu) ail esterlerin bağlanması ve hidrolizini katalizlerler (Elleuche vd. 2015).

Lipid modifiye eden enzimler çamaşır sektöründe uygun maliyet ve yıkıma süreçlerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Alkalin koşullara toleranslı stabil enzimlere ihtiyaç duyulduğu için ekstramozimlerin karakterizasyonu ve incelenmesine ihtiyaç vardır. Arkeal kökenli termostabil lipazlar ki alkalin koşullarda çalışanlar tercih edilmektedir ve *Sulfolobus acidophilus* ve *Pyrobaculum sp.* 'den elde edilmiştir. Sadece asidik koşullarda optimum olarak aktivite gösteren lipolitik termozim *Thermotoga maritima* ve *Thermus thermophilus*'dan izole edilmiştir (Wang vd., 2014; Shao vd., 2014; Tao vd., 2013; Zhang vd., 2014). Genellikle *S. acidophilus* ve *Pyrobaculum sp.* strain 1860'dan elde edilen esterazlar birden fazla saat yüksek sıcaklıkta yüksek stabilizasyon göstermektedir. Lipolitik termozimlerin bu özellikleri endüstriyel uygulamalar için mükemmel aday olduklarını göstermektedir (Shao vd., 2014; Zhang vd., 2014).

Bundan başka enantio selektif ve regioselektif lipazlarlar farmakolojide saf kimyasalların üretiminde ve biofuel üretiminde ya da kimyasal endüstrisinde kullanılmaktadır (Killens-Cade vd., 2014).

2.4.2 Biyoenerji-biyoyakıt

Azalan fosil yakıt rezervi ve iklim değişiklikleri nedeni ile artan kaygılar yeni enerji kaynakları rimi ve özellikle biyoenerji konularına dünya çapında bir ilgi

oluşturmuştur. Standardizasyon Avrupa komisyonu katı biyoyakıtları üretimi için kullanılan kaynakları ve orijinlerine göre odunsu biyokütle, otsu veya meyva biyokütlesi karışımları ve bunların karışımları şeklinde alt sınıflara ayırmıştır (Alakangas vd.,2006).

Sıvı biyoyakıt (biyoetanol, biyodizel, biyobutanol ve biokerosene) ligninoseülötik biyokütlenin ve nişasta gibi fermentatif materyaller ya da mikroorganizma ve bitki gibi çeşitli kaynakalardan lipid akstraksiyonu tarafından elde edilmektedir. Termofiller sıvı biyoyakıt üretimi için ligninoseülözük biyokütleleri (ksiln, selüloz ve hemiselüloz) parçalayan termostabil enzimleri üretebilmektedirler. Cadicellulosiruptor, Caldanaerobius ve Clostridium'dan üretilen selülaz ve ksilanaz çeşitli sıvı biyoyakıt üretiminin potansiyel uygulamalarında ligninoseülözük materyallerin parçalama aktivitesi sergilemektedir (Bhalla vd., 2013; Han vd., 2012; Su vd., 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Bhandiwad vd. (2013) biyobutanol üretimi ile ilgili olarak *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ile ilginç sonuçlar yayınlamışlardır. BCS spesifik genler butiril CoA oluşturulması için sorumlu operonun fazla sentezlendiği ve vahşi tip suşu ile karşılaştırıldığında % 180 n-bütanol üretimi artmıştır (Bhandiwad vd., 2013).

Metan ve hidrojen atıklardan ve hammaddelerden anaerobik fermentasyon ile elde edilen gaz biyoyakıtlara örnektir. 2014 yılında basılan bir derlemede gaz biyoyakıt üretiminde termofil anaerobik mikroorganizmaların kullanılabilmesine yönelik bilgiler bulunmaktadır (Canganella ve Wiegel, 2014). Biyohidrojen fotosentetik çevrim yapan su ve güneş enerjisini kullanabilen siyanobakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Biyohidrojen üretimi organik atıklar kullanılarak karanlıkta anaerobik fermentasyon ile üretilmektedir (Hawkes vd., 2007; Kongjan vd.; 2010; Li ve Fang, 2007) . Buna ek olarak enzimatik reaksiyonlar ile hidrojen üretimi oldukça ilginçtir. Yakıt hücrelerinde oksijen ve hidrojen bir araya geldiği zaman atık ürün olarak su ile elektrik ve ısı üretirler. Biyohidrojen selülozun glukoza transformasyonu ile elde edilir ve sonra glukoz ve kendi ürünü (glukonik asit) hidrojene dönüştürülür (Woodward vd., 2000). Woodward ve arkadaşları enerji üretimi için gerekli ekstramozimlerin tanımlanması, izole edilmesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi çalışmalarını yapmışlardır. Glukozun hidrojene dönüştürülmesi prosesi yüksek sıcaklıklarda daha etkilidir. Bu yüzden standart enzimler yerine ekstramozimlerin kullanılması (örneğin hidrojenaz) daha mantıklıdır. Derin deniz hidrotermal bacalarından izole edilen *Pyrococcus furiosus* 85 °C'de etkili bir

biçimde çalışan ve hidrojen üretmek için elektron alıcısı olarak NADPH kullandığı bilinen 2 enzimden biri olan hidrojenaz üretmektedir (Raven vd., 1992).

Termofillerin kullanıldığı biyohidrojen üretimi birleştirilmiş biyoproses için alternatif sağlar (Parisutham vd., 2014). En önemli avantajı maliyetin düşürülmesidir, genellikle ön uygulama çalışmalarında tehlikeli kimyasallar ve pahalı enzimler biyokütlenin hidrolizi aşamasında gereklidir. Birleştirilmiş biyoproses enzimatik ön uygulama, enzimatik sakkarifikasyon ve spesifik mikroorganizmaların kullanıldığı tek basamaklı şeker fermentasyonunun bir kombinasyonudur. Örneğin *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*'un kullanıldığı anaerobik biyohidrojen üretimi darı, mikrokristal selüloz ve glukozun birleştirilmiş biyoproses sonuçları güzel sonuçlar göstermiştir (Talluri vd., 2013)

Kömür yataklarında sıkışan metan alternatif bir enerji kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. Biyometan bir seri biyokimyasal reaksiyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Bazı anaerobik mikroorganizmalar tarafından kömür metana dönüştürülmektedir (Kotelnikova, 2002). Kömürün metana mikrobiyal dönüşümü uzun bir araştırma konusudur (Jones vd., 2008; Thielmann vd., 2004). Son zamanlarda kömür madenciliği alanında araştırmalar, farklı kömür kaynaklarından yüksek sıcaklıklarda metanogenesiz utarıcı yeteneğe sahip termofilik mikroorganizmaların elde edilmesine yönelik olarak devam etmektedir. Hindistan'daki kömür madenlerinden farklı kömür substratları kullanılarak yapılan çalışmada aynı kömür madenlerinin suyundan zenginleştirilen yerli mikrobiyal komünite kullanılarak 65 °C'de %49 metan üretimi olduğu rapor edilmiştir. Komünitenin filogenetik çalışmaları *Methanoculleus thermophilus*'un en baskın tür olduğunu göstermiştir (Lavania vd., 2014).

Termofillerin bu umut verici kullanımlarına rağmen biyoyakıt üretiminde termofillerin kullanılması dezavantajlara sahiptir (Lin ve Xu, 2013). Farklı grup termofiller kompleks polimerler gibi farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanabilmektedir. Şaşırtıcı bir özellik olarak bazı türler karbonhidratları birlikte kullanabilmektedirler özellikle bir çok mezofilik bakteride bulunan karbon katabolit baskılama mekanizmasının termofillerde eksikliği görülmektedir (Gorke ve Stulke, 2018).

Geniş metabolik çeşitliliğine rağmen, termofillerin çoğunluğu karbon kullanımı açısından düşük verime sahiptir ve bazı durumlarda *Geobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* türleri hariç selüloz gibi polimerleri tamamen parçalayabilmesi için birden fazla türe gerek vardır (Rastogi ve ark, 2009). Benzer şekilde termofiller yüksek enzimatik reaksiyon derecelerine sahip olmasına rağmen termofillerin kültürleri düşük hücre sayılarına sahiptir. termofiller tarafından üretilen biyoyakıt üretimi endüstrinin ihtiyacı altındadır. Termofillerde ki bir diğer sorun mezofillere göre genetik olarak manipülasyonu daha zordur.

2.4.3 Biyomadencilik

Biyomadencilik cevherlerden metallerin geri kazanımı için birçok farklı süreç içerir. Biyoliç ve biyooksidasyon biyomadencilikte sülfür minerallerine uygulanan iki biyolojik süreçtir. Her iki biyolojik süreçte de aynı mikroorganizma ve aynı mekanizma kullanılmaktadır. Biyoliç süresince biyolojik kataliz ile ilgili metaller çözündürülür. Demir ve sülfür mikrobiyolojik olarak oksitlenip ferrik demir ve sülfürik asit oluşmakta; bu kimyasallar bakır, nikel ve çinko sülfür gibi çözünmez mineralleri suda çözünür metal sülfatlara dönüştürmektedir. Mikroorganizmaların yardımıyla metal çözünme süreci; metallerin çözünmesi mineral yüzeyine ferrik demir ve/veya asidin etkisinin bir sonucu olduğu için kimyasal işlemin ve mikroorganizmalar ferrik demir ve asit oluşumuna sebep olduğundan mikrobiyolojik işlemin bir kombinasyonudur. Süreç; baz metaller çözünerek su içine alındığından dolayı bazen biyoliç olarak ve bazen de altın kazanımında altın mineral içinde kaldığından ötürü biyooksidasyon şeklinde ifade edilmektedir (Rawlings, 1997; Sand vd., 1995). Biyomadencilik için uygun mikroorganizmalar oksidasyon yapabilmeli, asidik koşullarda metal sülfütlere saldırabilmeli ve ilgili metallerin salınmasına izin vermelidir. Asidofilik demir ve sülfür okside eden prokaryotlar Fe(II)'yi Fe(III)' e ve sülfür bileşiklerini sülfürik aside okside edebildiği için biyoliç ve biyooksidasyon süreçlerinde kullanılmaktadır (Donati ve Sand, 2007).

Biyomadencilik diğer metaller içinde teorik olarak uygulanabilmesine rağmen yaygın kullanım alanları bakır biyoliçi ve altın biyooksidasyonudur. Diğer metallerin biyoliçi (kobalt, nikel ve çinko) nadirde olsa özel durumlar haricinde ticari koşullarda gerçekleştirilebilir. Biyomadencilikte iki farklı teknoloji kullanılmaktadır: karıştırmalı

tanklar ve yığınlar. Bir çok biyomadencilik uygulamaları 40-50 °C'nin altındaki sıcaklıklarda yapılmaktadır başlıca nedeni ilk ve en iyi çalışılan biyomadencilik mikroorganizmaları mezofiller ya da ılımlı termofillerdir (Donati ve Sands, 2007). Ancak termofil mikroorganizmaların kullanılması biyoliç sürecinde avantaj sağlamaktadır. Yüksek sıcaklıklarda çalışılabileceği için sürecin etkinliğini artıracaktır. Buna ek olarak termofillerin kullanılması soğutma sistemi için gerekli olan enerji girişini elemine etmektedir (biyoliç reaksiyonları ekzotermiktir, biorektör ve yığınlarda ciddi sıcaklık artışına neden olmaktadır). Daha yüksek sıcaklıkların kullanılması reaksiyona girecek olan gazların çözünürlüğünü azaltma (aerobik termofillerin tükettiği O₂ gibi) ve buharlaşma oranının artması ve asidik çözeltinin korozif etkisinin artması (çelik tanklardan seramik tanklara geçiş gerekmektedir) gibi sorunlara neden olabilir. Kalkopritten (CuFeS₂) bakır ekstraksiyonunun artırılması için bakır biyoliçinde termofillerin kullanılması bir çok ana problemi çözebilir. Kalkoprit dünya bakır rezervlerinin yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadır (Wang, 2005) bununla birlikte kimyasal ya da mezofilik biyoliçe yüksek ölçüde dirençlidir (Johnson vd., 2008). Bir çok araştırma bakır elde etme veriminin termofillerde mezofillerden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Abdollahi vd., 2014; d'Hugues vd., 2001; Li vd., 2014; Qin vd., 2013). Plumb ve ark (2007) tarafından tanımlanan bir arke *Acidianus sulfidivorans* sp. nov. bunun en belirgin örneğidir ki yüksek ekstrem şartlar altında metal ekstraksiyonu yapabilme yeteneğine sahiptir. optimum büyüme koşulları pH 0.35-3.0 ve 45-83 °C' dir ve pirit, arsenopirit ve kalkopiriti içeren çeşitli sülfid minerallerinde büyüebilme yeteneğine sahiptir (Plumb vd.,2007).

2.4.4 Biyoyileştirme (Biyoremediasyon)

Biyoremediasyon mikroorganizmaların kullanıldığı doğa dostu kirlilik arıtma teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. Genellikle düşük maliyetli ve organik ya da inorganik kontaminantları elemine etme ve/veya tehlikesiz yan ürünlere dönüştürme şeklindedir (Tabak vd., 2005). Metallerle kirlenmiş alanların temizlenmesinde ekstremofilik mikroorganizmaların kullanılması umut vaat etmektedir. Termofiller sülfür ve/veya demir oksidasyonu yolu ile metal çözünürlüğünde artış sergilediği için umut vaat etmektedirler. Mn (IV), Cr (VI), U (VI), tC (VII), Co (III), Mo (VI), Au (I, II) ve Hg(II) biyoyileştirme sürecinde toksik metallerin immobilizasyonunda ve hatta radyoaktif atıkların bulunduğu sıcak su kaynaklarında atıkların yok edilmesinde kullanılırlar (Sen vd., 2014).

Geobacillus türleri, *Anoxybacillus flavithermus*, *Thermus thermophiles* ve *Thermococcus zilligii* ile Cd, Cu, Ni, Zn ve Mn gibi farklı metallerin biyosorpsiyonu çalışılmıştır (Chatterjee vd., 2010; Sar vd., 2013). Termofillerin toksik metallerin ve radyonüklidlerin çöktürülmesinde ve/veya immobilizasyonunda kullanılması avantajlar sağlamaktadır. Enzimatik uranyum teknesyum redüksiyonu *Thermus scotoductus*, *Pyrobaculum islandicum*, *Thermoanaerobacter* sp. ve *Thermoterrabacterium ferrireducens* te görülmektedir (Cherny vd. 2007). Cr (VI), Se (IV) ve Te (IV) redüksiyonunun termofilik türler tarafından yapıldığı rapor edilmiştir (Sar vd., 2013).

Termofiller hidrokarbonların biyolojik yıkımında da kullanılmaktadır. Yağ ekstraksiyon süreçleri sonrasında Basra Körfez'indeki ve Körfez savaşında atık yağların yıkımı için termofilik Bacillus cinsleri kullanılmıştır (Al-Maghrabi vd., 1999). Margesin ve Schinner (2001) tarafından hidrokarbonların biyolojik iyileştirilmesi ve yıkımı diğer çalışmalarda tartışılmıştır. Haloorganik bileşiklerin biyolojik yıkımına ilişkin olarak Guerraro-Barajas vd. (2014) hidrotermal sedimentelerden alınan sulfidojenik çamur ile aşılınmış akışkanlı anaerobik çamurda trikloroetilenin (TCE) % 74 oranında biyolojik yıkıma uğratıldığı rapor etmiştir. TCE yıkımı yapan mikroorganizmalar tanımlandığında *Dehalobacter*, *Desulfotomaculum*, *Sulfospirillum*, *Desulfitobacterium*, *Desulfovibrio* ve *Clostridium* cinslerine mensup olduğu görülmüştür (Guerraro-Barajas vd., 2014).

Termofil mikroorganizmaların son derece kirli organik bileşiklerin temizlenmesine hizmet veren birçok uygulaması bulunmaktadır. *Aeribacillus* ve *Geobacillus* cinsleri hidrokarbonların ve inatçı aromatik bileşikleri biyolojik yıkıma uğratma kapasitesine sahiptir (Mnif vd., 2014). Endüstride kullanılan azo boyaların yaklaşık olarak % 50'si toksiktir ve *Anoxybacillus* sp.'nin azo boyaları yıkıma uğrattığı rapor edilmiştir (Deive vd. 2010). Son birkaç yıldır çeşitli sektörlerde yayılan kokuların giderimi için termofillerin kullanılması çalışılmaktadır. Termofilik biyofiltrasyon gazlarda soğutma gerekmeyen süreçlerde kullanılması avantajlıdır ve böylece maliyette azalma olmaktadır. Etanol, benzen, etil asetat gibi uçucu organik bileşiklerin ve sülfür içeren gazların arıtılmasında kullanıldığının bildirilmesi umut verici sonuçlardır (Ryu vd. 2009).

Düşük maliyetli ve çevre dostu uygulama olduğu için organik ve inorganik kirleticilerin biyolojik yıkımı geleneksel arıtım teknolojilere göre daha avantajlı olmasına

rağmen henüz uygulanamamaktadır. Çalışmalar ile elde edilen bu sonuçlar sürecin etkinliğinin artırılmasında umut vaat etmektedir (Ryu vd. 2009).

2.4.5 Biyosürefektan

Biyosürefektan mikroorganizmalar tarafından üretilen suda çözünmeyen bileşiklerin dağılmasını artıran amfifilik bir bileşiktir. Biyosürefektan glikolipid, lipopolisakkarit, lipoprotein, fosfolipidden oluşmaktadır. Biyosürefektan yiyecek, tarım, ilaç, petrol ve kağıt endüstrisinde toksisitenin düşürdüğü, biyolojik yıkımı artırdığı, ekstrem sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği için kullanılmaktadır. Diğer alanlarda olduğu gibi termofiller tarafından üretilen biyosürefektan yüksek sıcaklıklara ve pH ve tuzluluk gibi ekstrem fizikokimyasal parametrelere karşı daha dayanıklıdır. Şimdiye kadar *Aneurinibacillus*, *Geobacillus*, *Alcaligenes*, *Bacillus* ve *Brevibacillus* türleri çalışılmıştır (Bharali vd., 2011; Joshi vd., 2008; Mnif vd., 2011; Sharafi vd., 2014)

2.4.6 Arkeal lipidler

Arkeal lipidler oksidatif strese, yüksek sıcaklığa, bazik pH'a, fosfolipaza, serum ortamına karşı yüksek stabilite gösterir (Benvegna vd., 2005; Brard vd., 2007; Patel vd., 2000; Patel ve Sprott, 1999). Arke lipid özellikleri sayesinde arkeozomlar fizyolojik aralıkta ya da daha düşük herhangi bir sıcaklıkta oluşturulabilir bu da termal olarak kararsız bileşiklerin enkapsülasyonunu mümkün kılar. Bununla birlikte degradasyon olmaksızın hava/oksijen varlığında hazırlanabilir ve saklanabilir (Patel ve Sprott, 1999). Teknolojik yöntemlerin gelişmesi, uzun süreli stabiliteye (Dante vd., 1995), intrinsik olarak atak yapan özelliklere (Gliozzi vd., 1982), düşük geçirgenliğe (Gliozzi vd., 2002) sahip arkeal lipidlere dayalı iyi organize edilmiş üretimini olanaklı hale getirmiştir. Katı destek üzerinde film birikmesi yeni biyomimetik materyal geliştirmek için ve yüzey özelliklerini değiştirmek için kolaylık sağlar. Örneğin, bazı araştırmacılar biyolojik uygulamalarda filtrasyon özelliklerini değiştirmeyi hedefleyen doğal tetraeter türevlerinin ultra ince filmlerine sahip nano boyutta porlu aliminyum oksit membranlarını kaplamışlardır (Muller vd., 2006). Böylelikle arkeal lipid özellikleri sayesinde kaplanmış membranlar daha düşük geçirgenliğe sahip olmuş ve daha kolay sterilize edilebilmişlerdir.

Bipolar moleküllerin bir diğer uygulama alanı biyosensör tasarımlarında ultra ince tabakaların hazırlanmasıdır (Meister ve Blume, 2007). Bipolar molekülün bir baş grubu katı yüzeye lipidi bağlamada kullanılabilir, hidrofobik kısım bariyer görevi yapabilir ve ikinci baş grup da ortamla temas halindedir, solütlerin moleküler identifikasyonu için bulunur (Fuhrhop vd., 2004). Bu yolla çift tabakalı lipid membranı ile meydana gelen stabilite problemi önlenmiş olur. Bununla birlikte arkeal lipidler protein veya peptid/lipid etkileşimi açısından yeni yapısal fırsatlar sunar (De Rosa vd., 1994) ve biyomoleküllerin immobilizasyonu için doğal bir çevre sağlar. Bu nedenle biyolojik açıdan aktif sistemler üretmek için farklı biyolojik moleküller tek tabakalı lipidlere adsorbe edilebilir ya da içine doğru gömülebilir. İyi tanımlanmış doğal bir antibiyotik peptid olan valinomisin, arkeal filmler üzerinde konuqlanan fonksiyonel moleküllere bir örnektir. Valinomisinin lipid filmlerinin stabilitesi zamanla bozulduğu için Berzina vd. (1995, 1997) yarı sentetik arkeal tetraeter baryum tuzunun koruyucu çift tabakalarını kullanmışlardır. Bu sonuçlar, filmde valinomisin molekülü ile potasyum iyonunun seçici etkileşiminin yer aldığını ve potasyum iyon sensörü olarak potansiyel bir uygulama gösterdiğini bildirmişlerdir (Berzina vd., 1995; 1997)

Tek tabakalı lipidlerin organizasyonu proteinlerle olan etkileşimlerden etkilenebilir. Doğal tetraeter lipid filmleri üzerinde S-tabaka protein rekristalizasyonu yeni konseptte biyomimetik membran oluşumuna imkan tanımıştır (Schuster vd., 1998). Lipid membranları ile desteklenen S-tabaka, lipid/protein etkileşimi çalışmalarında yeterince fleksibl ve stabil olan ilginç özellikli biyomimetik bir matriks sağlamaktadır (Jacquemet vd., 2009). Sonuç olarak arkeal lipidler; redoks proteini veya enzimlere dayalı elektronik aletlerin montajında kullanılan protein-lipid etkileşimi için yeni bir fırsat sunan bipolar tetraeter yapısında olduğu gibi çeşitli nedenlerden dolayı biyoelektronikler için monomer olarak önerilmektedir (De Rosa vd. 1994).

2.4.7 Arkeozomlar

Lipozomlar aşı, enzim ve ilaçlar için salınım aracı olarak kullanılabilen veziküllere bağlı çift tabakalı yapılardır. Arkeozom terimi ilk kez Sprott ve arkadaşları tarafından kullanılmış olup lipozomal veziküller üzerinde önemli stabilite sağlayan ve sadece arke domaininde bulunan eter lipidlerinin oluşturduğu lipozomlar olarak tanımlamışlardır.

(Sprott vd., 1997). Arkeozomlarla ilgili olarak intravenöz, ağızdan ve deri altı uygulamaları içeren ve fareler üzerinde yapılan model çalışmalar, arkeozomların güvenli ve toksik olmayan moleküller olduğunu kanıtlamıştır (Patel vd., 2004).

2.4.8 Arkeal S-tabaka

Hücre zarfının diğer bileşenlerinde olduğu gibi S-tabaka mikrobiyal hücrenin çevre ile etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır (Sleytr ve Sara, 1997). Bu tabakaların moleküler düzeninden, yüksek bağlama kapasitesinden ve katı yüzeyler (hava:su ara yüzeyi ve lipid filmleri) üzerinde eşsiz özellikte rekritalize olabilmelerinden dolayı moleküler nanoteknoloji ve biyomineralizasyonda mükemmel model yapılar olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. (Sleytr ve Sara, 1997).

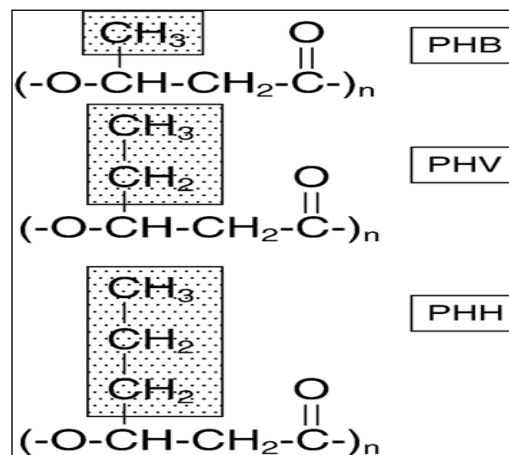
2.4.9 Polihidroksibutirat (PHB) üretimi

Günümüzde, biyoplastik gibi biyolojik olarak parçalanabilir, yenilenebilir, biyoyumlu ve doğayla dost plastiklerin mikroorganizmalar tarafından sentezine ve polimer kimyasındaki uygulamaları ile ilgili alınan olumlu sonuçlar sayesinde biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Braunegg vd., 1998; Poirier, 2002). Petrokimyasal rezervlerin tükenme tehlikesi olmasından dolayı biyoplastik daha cazip hale gelmektedir. Günümüzde endüstrileşen dünya, bu süreçte enerji kaynağı olarak fosil yakıtlara bağımlı hale gelmiş durumdadır. Ancak, fosil yakıtlar sınırlı kaynaklardır ve son yıllarda kullanımlarına bağlı olarak bu yakıtlardan faydalanma oranlarının giderek azalacağı düşünülmektedir (Zagar, 2000).

Dünyada her yıl yaklaşık olarak 140 milyon ton plastik tüketilmektedir. Bu plastiklerin üretimi için yaklaşık olarak 150 milyon ton fosil yakıt kullanılmaktadır, uzun bir süre de bunun yerini başka bir madde almayacak gibi gözükmektedir. Bütün karbon bazlı yapısal maddeler (plastik, köpük, kaplama, adezifler gibi) bu özelliklerini uzun zincirli karbon-karbon bağlarına borçludur. Uzun karbon zincirleri elde ederek plastik üretiminde sürdürülemeyen bir kaynağın yerini sürdürülebilir ve yenilenebilir bir kaynağın alması tüm dünyanın ilgisini çekmektedir (Suriyamongkol vd., 2007).

Hammadde kaynağı olarak fosil kaynaklara dayanan üretim süreçlerinin önemli bir sorunu da, üretim sırasında oluşan atıklardır. Çevre kirliliğinde inorganik ve organik kökenli katı atıkların önemi büyüktür. Organik kökenli olan plastik atıklar günümüzün önemli çevre sorunlarından (Boşgelmez vd., 2000). Petrolden elde edilen sentetik polimerler, plastik atık olarak doğaya terk edildiklerinde, toprakta uzun süre parçalanamadığından çevre kirliliğine ve toksik madde birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretimi önem kazanmış ve petrol kökenli polimerlerin yerini almalarına yönelik çalışmalar artmıştır (Page, 1992; Beyatlı,1996, Güngörmedi vd., 2014).

Biyolojik kökenli plastiklerin arasında en önemli form olarak bilinen polihidroksi alkonatlar (PHA) lineer formda, baştan uca polyester olan 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.5). PHA genelde 103-104 monomerden oluşan polimer olarak üretilmektedir, 0.2-0.5 µm çapında inklüzyonlar olarak birikir. Bu inklüzyonlar ya da granüller konakçıya herhangi bir zararlı etki göstermeksizin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde sentezlenir ve depolanır (Luengo vd., 2003). Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen Polihidroksibütirat (PHB), kısa zincirli β-hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (Slater vd., 1992; Poirier, 2002).



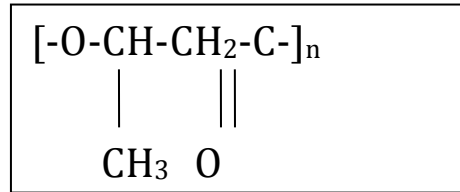
Şekil 2. 5 PHA'ların kimyasal yapısı. İlave R grupları farklı zincir uzunluğunda olabilmektedir. PHB (R=metil), PHV (R=etil), ve PHH (R=propil) (Suriyamongkol vd., 2007).

PHB'ler, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer özellikler gösterirler (Madison ve Huisman, 1999). Ancak, bir termoplastik olan PHB'nin sertliği, polietilene kıyasla dört kat fazladır. Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olur (Dave vd., 1996; Madison ve Huisman, 1999; Lafferty vd., 1988).

Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'nin erime sıcaklığı, 157-188 °C olup, sentetik polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır. PHB, termoplastik olduğundan preslenerek şekil verilebilir bir polimerdir (Dave vd., 1996; Madison ve Huisman, 1999; Lafferty vd., 1988).

PHB'nin, UV ışınlarına dirençli olduğu ancak, asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağladığından PHB'nin kullanım olanakları genişlemektedir (Poirier, 2002).

Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB'nin genel formülü $(C_4HO_2)_n$ şeklindedir (Şekil 2.6). (n) sayısı 35.000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir (Madison ve Huisman, 1999; McCool vd., 1996).

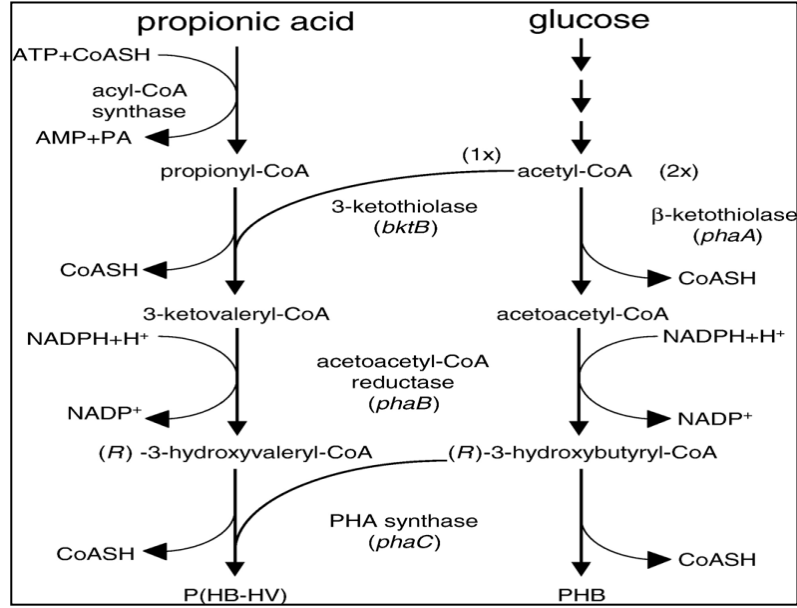


Şekil 2. 6 D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı (Yılmaz ve Beyatlı, 2003)

PHA'larda bulunan çeşitli monomerler farklı fiziksel özelliklere sahip polimerlerin oluşumunu sağlamaktadır. PHB homopolimeri sert ve kırılğan bir biyoplastiktir. Bu durum PHA kullanımını sınırlamaktadır. PHA'lar daha uzun monomerlerden oluşmaktadır, genelde elastomer olup yapışkan maddelerdir. PHA kopolimeri, HV, HH veya HO gibi uzun zincirli monomerlerin fraksiyonuna sahip HB'den oluşmaktadır, daha esnek ve dayanıklı plastiktir. Bu maddeler şişelerde, kutularda, paketlerde kullanılabilir (Hocking ve Marchessault, 1994).

Archaea'dan *Halobacteriaceae* familya üyelerinde birçok bakteri türü PHA sentezlemektedir. Bu organizmaların listesi giderek uzamaktadır ve günümüzde 300'den fazla PHA üreticisi vardır (Anderson ve Dawes, 1990; Steinbüchel ve Valentin, 1995; Braunegg vd., 1998; Madison ve Huisman, 1999; Zinn vd., 2001; Ciesielski vd., 2006; Berlanga vd., 2006). PHA kimyasal açıdan oldukça çeşitlidir, ancak en iyi bilinen ve en fazla üretilen formu PHB'dir (Hankermeyer ve Tjeerdema, 1999; Kim ve Lenz, 2001). Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (Taguchi vd., 2001). Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (Braunegg vd., 1998).

En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, üç enzim ve bunları kodlayan genlerden oluşmaktadır (Şekil 2.7). *phaA* geni β -ketotiyolazı kodlar, bu enzim asetoasetil-CoA oluşturmak için 2 asetil-CoA molekülünün kondensasyonu için ilk enzimdir. Gelecek basamak asetoasetil-CoA redüktazın katalizlediği bir reaksiyon olan asetoasetil-CoA'nın (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenmesidir (Steinbüchel ve Schlegel, 1991). Enzim *phaB* tarafından kodlanır ve NADPH bağımlıdır. Son reaksiyon *phaC*'nin kodladığı PHA sentazın katalizlediği (R)-3-hidroksibütiril-CoA monomerinin polimerizasyonudur (Rehm, 2003; Stubbe ve Tian, 2003). PHB sentezinden sorumlu bu 3 enzim de hücrede PHB birikiminin yapıldığı sitozolde yer almaktadır (Anderson ve Dawes, 1990).



Şekil 2. 7 *Rhizobium eutropha*'da PHB ve P(HB-HV) biyosentetik yol izi (Poirier, 2002).

Prokaryot hücrelerde PHB'nin hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil CoA'dır. Substrat ve Asetil CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla oluşan koşullar, sentezde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini basitleştirmektedir. Enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonun düzenleyici mekanizmanın kontrolü altında olması bunun nedeni olarak gösterilmektedir (Lafferty vd., 1988). Hücrede PHB'den başka biyopolimerler de sentezlenir (Kim ve Lenz, 2001; Luengo vd., 2003). Büyüme ortamındaki karbon kaynağının tipi ve miktarındaki değişikliklerle farklı monomerlere sahip çok sayıda PHA üretilmektedir (Steinbüchel ve Schlegel, 1991; Dias vd., 2006). Örneğin glukoz ortamına valerik asit ya da propiyonik asidin eklenmesi HB ve HV [P(HB-HV)]'den oluşan rasgele bir polimerin oluşumuna neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir kısmı tarafından sentezlenebilen PHB, toprak, deniz ve tatlısu, bunların sedimentleri gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, Actinomycetesler, Cyanobakteriler, anaerobik, yağ asidi okside eden bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından depolanabilmektedir (Labuzek ve Radecka, 2001; Findlay ve White, 1983).

Ticari olarak biyoplastik üretiminde İmperial Kimya Şirketi öncelikle metilotrofik bakterileri ve *Azobacter*'leri kullanmış ancak daha sonra PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* ile devam etmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). PHB, özellikle *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* ve çeşitli toprak mikroorganizmaları gibi bir çok mikroorganizma tarafından oluşturulur (Braunegg vd., 1998; Rosovitz vd., 1998; Anderson ve Dawes, 1990).

Yapılan çalışmalarda, *A. eutrophus*'un fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre kuru ağırlığının % 80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği ve *A. eutrophus*'un glukozu kullanabilen mutantlarının da PHB üretiminde kullanılabileceği bildirilmektedir (Madison ve Huisman, 1999).

Bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlığının %50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir (Dave vd., 1996; Chen vd., 1991). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, zenginleştirilmiş besiyerinde büyütülen *Bacillus* suşlarında hücre kuru ağırlığına göre %5-20 arasında PHB biriktirildiği bildirilmektedir (Chen vd., 1991).

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomonas*'ların da PHB üretimi araştırılmış ve yüksek verim görülmüştür. *Ps. oleovorans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testotereni*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir (Anderson ve Dawes, 1990; Holmes, 1985). *Ps. extorquens* bakterisini metanol içeren karbon kaynağında ürettiklerinde % 27 PHB üretimi saptamışlardır (Karaboz ve Umay, 1994).

Güney Tayvan'da bir sıcak su kaynağından izole edilen bir termofil olan *C. taiwanensis* glukozu kullanarak hücrede PHB granüllerini biriktirme yeteneğine sahiptir (Chen vd. 2005). Kültürel sıvıda belirlenen nişasta sindiren enzimler; fermentasyondan önce nişasta sindirimi olmaksızın *Caldimonas taiwanensis*'in doğrudan nişastadan PHB biriktirebileceğini gösterir (Sheu vd., 2009).

Thermus türlerinin laktoz gibi disakkaritleri kullandığı bilinmektedir, *Thermus sp.* IB-21 en az 3 laktoz-hidrolaza sahiptir (Kang vd., 2005, Berger vd., 1995). Yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak sodyum glukonat veya sodyum oktanoat varlığında ve

azotun sınırlandırıldığı bir ortamda *T.thermophilus*'un PHA biriktirebildiği gösterilmiştir (Pantazaki vd. 2004).

Yüksek sıcaklıkta işlev gören biyoteknolojik süreçler bazı avantajlara sahiptir. Örneğin yüksek sıcaklıkta PHB fermentasyon sürecinin gerçekleştirilmesi kontaminasyon riskini azaltır. Bununla birlikte termofiller; mezofillerden daha hızlı büyüdüğü için termofilik PHA birikimini gerçekleştirmek için daha az zamana gereksinim olur. Örneğin *Cupriavidus necator* mezofilik bakteri 48-72 saatte 30 °C'de glukonattan en yüksek PHB üretimi sağlanabilmiştir (Loosdrecht vd., 1997). Bir termofil olan *C.taiwanensis* 14 saatte 55 °C'de aynı karbon kaynağı kullanarak en yüksek PHB üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Sheu vd., 2009).

PHB kopolimerlerinin üretimi uygulama alanlarının gereksinimleri düşünüldüğünde son derece önemlidir. PHB polimeri sert ve kırılğan bir yapıya sahiptir. Bu özelliğinden dolayı kullanım alanı sınırlıdır. Bu durumun aşılabilmesi için kopolimerlerinin ya da başka bir ifade ile özellikli PHB üretimi önem kazanmıştır. Polimer üretim ortamına asetik asit, valerik asit, propiyonik asit gibi karbon kaynakları katılarak kopolimerler elde edilebilir. 3-hidroksivalerat gibi monomerlerin eklenmesi ya da diğer polimerlerle karıştırılarak yapılan denemelerle PHB'nin kırılğanlığının azaldığı bildirilmektedir (Holmes, 1985; Holmes, 1988; Kunioka vd., 1989; Du vd., 2001). PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği, ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de söylenmiştir (Doi vd., 1986; Bloembergen vd., 1986).

Ramsay ve arkadaşları *Alcaligenes latus*, *A. eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas cepacia* ve *Micrococcus halodenitrificans* bakterilerini glukoz ve propiyonik asit bulunan ortamda geliştirdiklerinde, nitrojeni sınırlandırılmış şartlar altında P(HB-co-HV) kopolimeri ürettiklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, kopolimer içindeki HV oranının propiyonik asit miktarına bağlı olarak değiştiğini de saptamışlardır (Ramsay vd., 1990).

Chen ve arkadaşları (Chen vd., 1991), hücre kuru ağırlığının %85'i kadar PHB biriktirdiğini bildikleri *A. latus* DSMZ 1122 suşunun PHV üretimi üzerine yaptıkları

çalışmada, ortama Na-valerat eklediklerinde sadece PHV, propiyonat ve asetatı aynıve a ilave ettiklerinde PHB ve PHV elde edildiğini tespit etmişlerdir .

PHB oluşumu için kullanılan şeker substratının fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Page, 1992a). Kullanılan glukozun, maliyeti yükseltmesi sonucunda üretilen PHB'nin kg fiyatı 15-30 dolar arasında değişmektedir. Polimerin kullanım sınırlarını belirleyecek olan maliyet fiyatını düşürmek için, rekombinant türler üzerinde çalışmalar yapılmasının yanısıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB verimi elde eden suşlar üzerinde araştırmalar da yapılmaktadır (Witholt ve Kessler, 1999).

Çeşitli çalışmalarda, düşük fiyatlı biyoplastik üretimi için melas, (Wu vd., 2001; Gouda vd., 2001), ksiloz, arpa ve soya atık suları (Law vd., 2001) ve peynir altı suyunun (Ahn vd., 2000) kullanılabilirliği araştırılmıştır. Ucuz PHB üretimi için kullanılabilen melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile, büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Beaulieu vd., 1995).

Page *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melası gibi kompleks karbon kaynaklarında da yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır (Page, 1992a). Page, iyi bir polimer üreticisi olan *A. vinelandii* UWD suşunun, ucuz karbon kaynağı olan şeker pancarı melasında üretildiğinde, glukozla kıyasla üç kat daha ucuza mal olduğunu ve eğer ortama valerat ilave edilirse PHV kopolimerinin oluştuğunu bildirmiştir. Şeker pancarı melasının tanımlanmamış büyümeyi uyarıcı faktörler içerdiğini söyleyen Page, şeker pancarı melasından polimer üretimini arttırmak için ortama azot bileşenleri ilave edilebileceğini de belirtmiştir (Page, 1992b).

PHB'nin pratik uygulamalarında üretim maliyetlerinin azaltılması için çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla daha ekonomik kültür ortamlarının araştırılması, substrat maliyetinin düşürülmesi ve karbon döngüsünde görev alan fotosentetik organizmaların kullanıldığı çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Miyake vd., 2000; Asada vd., 1999; Klinke vd., 1999).

Ahn ve arkadaşları (Ahn vd., 2000), rekombinant *Escherichia coli* kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi alındığını bildirmişlerdir. Kim ise çalışmasında, yine rekombinant *E. coli*'yi peynir altı suyunda geliştirmiş ve %20 PHB verimi; *Azotobacter chroococcum*'u ise nişasta içeren besi ortamında geliştirerek, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında %46 PHB verimi elde etmiştir (Kim, 2000).

Endüstriyel olarak üretilen biyoplastikler polietilene oranla dört kat daha fazla serttir (20 kg/m). PHB'nin petrol kökenli polipropilene göre daha kristal yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özelliklerinden dolayı üretiminin daha iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham vd., 1984; Beyatlı, 1996). PHB'nin doğaya bırakıldığında tamamen parçalanabilmesi, çevre kirliliği yaratmaması gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalar açısından önemleri her geçen gün artmaktadır (Page vd., 1995; Lee, 1996).

Biyoplastikler ilk olarak şişelerin ve paketleme malzemelerinin imalatında kullanılmaya başlanmıştır (Steinbüchel ve Fuchstenbusch, 1998; Angelova ve Hunkeler, 1999). Daha sonraları biyoplastiklerin tıp, tarım, veterinerlik ve kimyasalların eldesi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahiptirler. Biyolojik uygunluğundan ve maliyetinden dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılık alanında kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularına yerleştirilen PHB'nin toksik bir etkiye neden olmamasından dolayı, vücutta absorbe edilebilen protez aletlerinin, yapay kan damarlarının ve cerrahi dikişlerde PHB'nin kullanılması bir çok araştırmacının bu alana yönelmesine neden olmuştur. Sonuçta veterinerlikte ve tıpta ilaçla tedavide teröpatik bileşiklerin kontrollü salınımında PHA'lar kullanılmıştır (Lafferty vd., 1988; Chowdhury ve John, 1998). Ayrıca PHA'lar tıpta; kan damarı, vasküler aşı, kemik kırığını sabitleyen levhaların yapımında da kullanılmaktadır (Holmes, 1985).

PHB'lar tarımda; toprakta parçalanma gerektiren uygulamalar ve kaplama işlemlerinde kullanılabilir. Biyoplastikler, ekin sulaması için yapılan olukların üretiminde tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ve pestisitlerin kontrollü salınımında plastik kılıflar olarak ta kullanılabilir (Holmes, 1985).

PHB'ler kimyasalların eldesinde de kullanılmaktadır. Antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi kimyasalların sentezinde kiral yapı blokları olarak, kiral bir merkeze ve iki fonksiyonel gruba (-OH, -COOH) sahip olan (R)-(-)-hidroksi asitler kullanılmaktadır (Lee vd., 1994). PHB oldukça aktif bir bileşik olup D-(-) konfigürasyonundadır. PHB solüsyonları ve PHB'den yapılan filmler içlerinden geçen polarize ışığın konumunu değiştirmektedir. Bu optik izomerler buldukları ortamda kiral merkezlerinden dolayı kuvvetli bağlanma özelliğine sahiptirler ve kromatografide kullanılabilirler. Bu nedenle PHB'ın yağ/su emülsiyonları için emülsifikasyon ajanı olarak kullanılması da mümkün olmaktadır (Holmes, 1985).

D-(-)-3-hidroksibütirat monomerlerinden saf kimyasal maddelerin organik sentezinin gerçekleştiği bildirilmiştir. Bunlardan Hindistan mısırında bulunan bir zararlıın eşey hormonu, balarısı hormonu, *Cerambycidae* familyasından bir böceğin koruyucu substratı ve güzel kokulu S-citrenellol gibi kimyasallar sayılabilir (Holmes, 1985).

Ayrıca; PHB kolay şekil alabildiğinden ve parçalanabilme özelliğinden dolayı daha çok paketleme malzemesi olarak kullanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999). PHB ve kopolimerleri preslenebilmekte, biçimlendirilebilmekte, lif haline dönüştürülebilmekte, filmleri yapılabilen ve sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir. Biyolojik olarak parçalanabildiklerinden tek kullanımlık ürünlerin üretimi için biyoplastikler ilgi çekmişlerdir. Tıraş bıçağı, hijyenik kadın ürünleri, çocuk bezleri, tek kullanımlık mutfak malzemeleri, şampuan şişeleri gibi ürünlerin imalatında kullanılmaktadır (Lafferty vd., 1988).

Ayrıca, biyoplastikler, özellikle uzun yan zincire sahip olan PHB'ler, basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılabilirler. Lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB kullanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999; Weber, 2000; Lootz vd., 2001). Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı korumada, parlaklık sağlamada, aroma kaybını önlemek amacıyla da PHB kullanılmaktadır (Lee, 1996).

ESOGÜ Biyoteknoloji Laboratuvar'ında da mezofilik ve halofilik mikroorganizmalar kullanılarak PHB üretimi çalışmaları yapılmaktadır. Hidrokarbon ile kirli alanlardan izole edilen mikroorganizmaların PHB üretim yetenekleri araştırılmış ve seçilen *Bacillus megaterium* izolatı ile PHB üretim veriminin artırılması için optimizasyon yapılarak polimer karakterize edilmiştir (Güngörmedi, 2014) Halofil arke ve bakterilerin PHB üretim yetenekleri ESOĞÜ BAP'tan alınan proje desteği ile çalışılmış ve elde edilen veriler doğrultusunda patent başvurusu yapılmıştır.

2.5 Termofilik Popülasyonun Çeşitlilik Analizi

2.5.1 Kültür bağımlı çalışmalar

Saf kültürlerin fizyolojik ve kültürel özelliklerini karakterize etmekte ya da tüm hücre uygulamalarında önemli olan yöntemler geleneksel mikroorganizma kültür yöntemleridir. Ancak petride gelişen kolonilerin sayısı mikroskop ile görüntülenebilen hücrelerin sayısının çok altındadır. Buna ek olarak, kolay gelişebilen termofiller doğal mikrobiyatada baskın olanları temsil edemeyebilmektedir. *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, ve *Meiothermus* Malezya kaplıcalarından izole edilen cinsler olmuştur ancak azınlığı temsil etmektedirler. Agar yerine kullanılan gelrite ve nanofibröz selüloz gibi jelleştirici ajanlar özellikler termofillerin katı kültürde koloni oluşturabilen izolatların biyoçeşitliliğini arttırmaktadır (Tsudome vd., 2009). Kültür bileşen içeriği, pH, inkübasyon sıcaklıkları ya da farklı izolatların sağlanması için gaz seviyeleri gibi büyüme şartlarını zenginleştirmek için yaygın manipülasyonlar uygulanmaktadır; ancak zor gelişen termofiller kaybedilebilecektir. Kültüre edilememelerin nedeni çeşitli makalelerde ele alınmıştır (Phamve Kim, 2012; Stewart, 2012; Vartoukian vd., 2010). Doğal ortamda büyüme hızının yavaşlığı, popülasyondaki diğer hücrelerin ürettiği antibakteriyel maddelerin neden olduğu inhibisyon, kültür bileşenlerinin neden olduğu inhibisyon ağarın neden olduğu inhibisyon, quorum-sensing veya yararlı etkileşim yokluğu ile sinyaller, sıkı kimyasal gereksinimleri veya yüksek konsantrasyonda verilen besinler gibi çeşitli faktörler termofillerin kültürde büyümesini engellemektedir. Bazı termofiller karbon monoksitten faydalanmaktadır, ancak insana olan toksisitesinden dolayı bazı laboratuvarlarda seyrek olarak kullanılmaktadır. Ek olarak pek çok hipertermofiller zorunlu anaerobik ya da fakültatif anaerobik koşullarda büyümektedir. Kültüre edilebilir anaerobik

mikroorganizmalar aerobik mikroorganizmalardan nispeten daha zor gelişmektedir. Candidatus türleri henüz izole edilememiş ve geliştirilememiştir. Costas vd, 2012'de rapor ettikleri makalede bu durumun nedenlerini açığa kavuşturmuşlardır. Bu nedenler arasında, iki farklı yardımcı strainin gerekliliği, yavaş büyüme ve yüksek CO₂ basıncı gibi sıkı büyüme koşulları bulunmaktadır (Costas vd., 2012).

2.5.2 Geleneksel kültür bağımsız çalışmalar

Kültür bağımlı çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman kültür bağımsız çalışmalar, biyoçeşitlilik analizi 18S ve 16S rRNA gen dizilerini tanımlayan kapsayıcı yaklaşımları içermektedir. Kültür bağımsız çalışmalarda, genomik DNA'dan neredeyse 16S rRNA'nın tamamını içeren genler amplifiye edilerek klonlama vektörüne klonlanır ve rekombinant plazmidin genellikle *Escherichia coli* olan uygun klonlama konakçılarında transformasyon yapılır. Sonrasında yüzlerce ya da binlerce rekombinant klonlar sıklıkla parmak izi analizlerinden olan restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ile ayırt edilir. Manuel olarak yapılırsa zahmetli bir iş olmaktadır, tek bant profilinin yüzdesi düşüktür. Bu nedenle popülasyonu temsil eden geniş bir kütüphane ile başlamak avantajlıdır. Ancak 16S rRNA gen amplifikasyonu primerlerin sınırlandırması, DNA polimerazlar ve PCR artefaktlarından dolayı hata eğilimlidir (Hongoh vd., 2003). Amplifikasyon humik asit gibi kaplıca ya da toprakta bulunan inhibitörler ile engellenebilmektedir. Ek olarak evrensel primerler tüm türlerdeki 16S rRNA genlerini tanımayabilir ve dolayısıyla amplifikasyonu yapamayabilir. Ek olarak düşük kopya sayısındaki genler sıklıkla kaybolur. Bu sınırlamaların bazılarının mini primer PCR ve mühendislikle üretilen *Taq* DNA polimeraz kullanılarak üstesinden gelinebilir (Goh vd., 2011; Isenbarger vd., 2008). 16S rRNA gen dizilerinin tamamının sağlanması için geleneksel metodlar kullanılarak kültüre edilemeyen adaylar tespit edilebilmektedir.

2.5.3 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis - Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi)

ARDRA tekniği ilk olarak insan patojenlerini tanımlama amacıyla geliştirilmiştir (Vanechoutte vd., 1995). 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PCR-RFLP temelli bir yöntem olan ARDRA'da türe özgü spesifik primerlerin ya da evrensel

primerlerin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Andrighetto vd. 1998). Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler restriksiyon enzimleri ile kesilir (Bouton vd. 2002). Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya gidilir. Bu jel görüntüleri genelde bilgisayar tabanlı programların yardımı kullanılarak dendogramların oluşturulması ile değerlendirilmektedir. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ile ortaya çıkarılmış olan profillere göre, çok kısa zaman içerisinde çok fazla izolata ya da klonu ait, genotipi yansıtan, karakteristik bantlar belirlenerek bunların analiz edilmesi sağlanabilmektedir. Özellikle çevresel örneklerden gen kütüphanesi kurularak yapılan çalışmalarda, gen çeşitliliğini kısa sürede gözler önüne süren bir tekniktir (Liu vd., 1997; Tiedje vd., 1999).

ARDRA tekniğinde bakteriyel kültür ve DNA izolasyonu gerekmektedir. PCR amplifikasyonunda rRNA geninin 16S bölgesini çoğaltmak için kullanılır. Bu amplifikasyonu PCR ürünlerinin bir restriksiyon parçalanması takip eder. ARDRA bantlarında restriksiyon enzimlerinin seçimi geniş sayıda türün net bir ayrımı için gereklidir. Restriksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyamasından sonra UV ışık altında görüntülenir. Bazı yakın türler arasında ayırım elde edebilmek için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması gerekebilmektedir.

2.5.4 Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE)

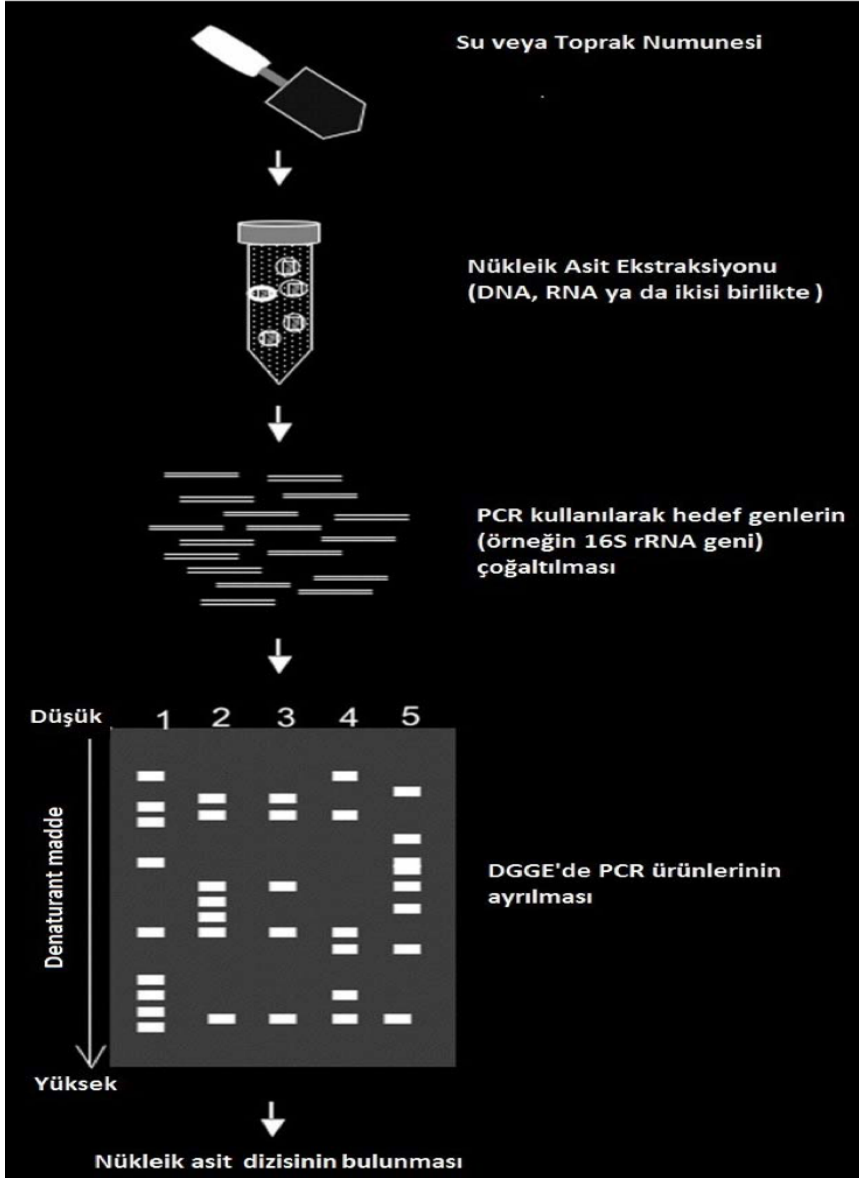
DGGE, mikrobiyal ekoloji çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılan, aynı boyutta ancak farklı nükleotid dizilimlerine sahip çift zincirli DNA moleküllerini ayıran elektroforetik bir yöntemdir. DGGE’de PCR ile çoğaltılan belirteç gen ürünleri (16S rRNA ya da 18S rRNA genleri), üre ve formamid gibi denatüre edici ajanların varlığında ve giderek dereceli artan bir konsantrasyona sahip poliakrilamid jel içinde elektriksel alana maruz bırakıldıklarında ayrışırlar. Çift sarmalın birbirinden ayrılmasındaki farklılıklar, baz dizilerindeki farklılıklardan kaynaklanır. Yarı ayrılmış DNA molekülünün jel üzerindeki hareket kabiliyeti büyük oranda azalır sonunda da durur. Çift zincirli DNA parçalarının birbirinden ayrılmasını önlemek için GC kuyrukları eklenmiş primerler kullanılır.

Böylece DNA molekülü tamamen açılıp jelden çıkmaz. DNA parçalarının görünür hale geçmesi, jelin uygun DNA boyası (Etidyum bromür, SYBR Green vs.) ve uygun tampon çözeltisinde bekletilmesi ile sağlanır (Muyzer ve Vaal, 1993).

DGGE beş temel aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.8)

1. Su/toprak/çamur örneklerinden DNA ekstraksiyonu;
2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile rDNA bölgesini çoğaltma;
3. Denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE) ile PCR ürünlerinin birbirinden ayrılması,
4. Dizi Analizi
5. Belirlenen dizilerin gen bankalarındaki diziler ile homoloji taraması

DGGE’de ayırım, doğrusal olarak artan miktarda formamid ve üre gibi DNA denatürantı içeren poliakrilamid jel içindeki çift iplikli kısmen denatüre olmuş DNA molekülünün elektroforetik hareketine dayanmaktadır. Benzer denatürasyon sıcaklıklarında baz çiftleri açılır. Domainlerdeki dizilim farklılıkları denatürasyon sıcaklığının farklılık göstermesine neden olmaktadır. Belirli fragmentlerdeki dizilim farklılıkları denatüre edici gradient jellerde farklı pozisyonlarda göç olayının sonlanmasına neden olur. DGGE primerlerinden biri 40 baz uzunluğunda GC’ce zengin yapay bir kuyruk taşır. Yüksek sıcaklık melting domaini olarak iş gören bu dizinin DNA fragmentine eklenmesi ile dizilim varyansı %100’e kadar çıkabilmektedir. Başlangıçta ürünler moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Jel içinde ilerledikçe giderek artan denatüre edici koşullara maruz kalırlar. PCR ürünleri bir noktaya geldiklerinde çift iplikli DNA’da ayrılmalar başlar. Bu “melting” olayı dizinin uzunluğuna, GC içeriğine ve nükleotit dizisine bağlıdır (Muyzer vd. , 1999).



Şekil 2. 8 Denatüre edici jel elektroforezinin aşamaları (Nakatsu, 2006)

DGGE'nin en önemli avantajı birden fazla numunenin aynı jel üzerinde yürütülebilmesi, dolayısıyla zamanla ve farklı çevresel koşulların etkisiyle oluşan popülasyon değişimlerinin izlenmesine olanak sağlamasıdır. Ayrıca, klonlama ve dizi analizi gibi zahmetli, pahalı ve numune sayısı arttıkça vakit alıcı bir teknik değildir (Çallı vd., 2007). DGGE genomik, klonlanmış ve PCR ile çoğaltılmış DNA'daki tek baz değişimlerinin ve polimorfizmin belirlenmesinde etkili bir genetik analiz yöntemidir.

DGGE gerçekleştirildiğinde, bantlar tek tek kesilip alınabilir ve dizileri belirlenebilmektedir. Bu bantların dizi analizleriyle, topluluk içinde varolan gerçek türler, uygun veri tabanında, bilinen türlerin uygun dizilerinin karşılaştırılmasıyla tanımlanabilmektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Mikrobiyal popülasyonların çeşitliliğini basit ve hızlı göstermesi, ekosistemdeki dominant türleri saptanmasının kolay olması, çok sayıda (klonlamadan daha fazla) örneğin analizi için kullanılması avantajları arasında sayılırken temsili DNA'nın ekstraksiyonu ve amplifikasyonunun zor olabilmesi, PCR sonrası DNA kopyasının farklı olabilmesi ve bunun da bant yoğunluğunu değiştirebilmesi, belirlenen bant sayısının her zaman mikroorganizma kompozisyonunu tam yansıtmaması, bantlarının sekanslarının kısa DNA fragmentlerine sahip olması gibi dezavantajları da olabilmektedir (Tiedje vd., 1999).

2.5.5 Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi, PCR temelli bir yöntem değildir. FISH, mikroorganizmaların hücrelerine zarar vermeden hücre içerisinde, spesifik dizilimlere sahip nükleik asitlerin, floresan boyalı oligonükleotidlerle (prob) hibritlenmesi sonucunda hedef moleküllerin hücre içinde epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu kullanılarak üç boyutlu dağılımlarının izlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Amann vd., 1995). Oligonükleotidler, hücrede çok miktarda bulunan rRNA'ların belirli kısımlarına bağlanabilen floresan boyalı, tek sarmal halinde özel baz dizileridir. rRNA'ların mikroorganizma tayininde hedef olarak kullanılmasının sebepleri şu şekilde özetlenebilir;

- rRNA moleküllerinin her canlı hücrede bulunması,
- Numunedeki mikroorganizma miktarı düşük olsa da besi yerinde çoğaltmaya gerek kalmadan rRNA'larına ulaşılabilirlik,
- Pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA gen dizisi ile ilgili geniş bilgi birikimi mevcuttur.

İdentifikasyon, komünite analizleri, popülasyonların zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılmasında kullanılabilir. Yöntem temelde hibridizasyon süresince 16S rRNA kopyasını içeren her bir ribozomun boyanmasına dayanmaktadır. Ancak düşük ribozom içeriğine sahip hücrelerin standart FISH protokolu ile belirlenmesini

sınırlayabilmektedir. Bu hücreler yavaş büyüyen hücreler ya da besinsel azlığa maruz kalmış hücreler olabilir. Bunların üstesinden gelmek için FISH yöntemi tyramime sinyal amplifikasyon tekniği ile birleştirilebilir ya da standart protokolde çalışılan organizma grubuna özgü değişiklikler yapıp yöntem optimize edilebilir. Sekanslar yüksek kopya sayısına sahip olmazsa FISH yönteminin hassasiyeti azalabilmektedir (Kirk vd., 2004).

FISH'in temel basamakları şunlardır.

- Fiksasyon aşamasında hücre duvarı paraformaldehit ya da etanol çözeltileri kullanılarak problara geçirgen hale getirilmesi.
- Hibridizasyon basamağında proplar hedef hücredeki rRNA dizisine bağlanması
- Bağlanmayan propların ortamdan uzaklaştırılması
- Görüntüleme epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu kullanılması

Nükleik asit spesifik flüoresan boyalar, (DAPI, SYBER Green I, Yo-Pro I gibi) kullanılmaktadır. DAPI ile boyanmış hücreler parlak mavi flüoresan verir ve sayma da kolaylık sağlar.

FISH yönteminin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Gerekli proplar varsa çok hızlı ve basit bir yöntem olan FISH kültüre edilmeden mikroorganizmaların direk görüntülenmesini ve sayılmasını sağlar. Ayrıca yüksek uzmanlık gerektirmez. Ekosistem hakkında ön bilgi gerektirmesi, belirlenecek organizmanın rRNA sekansının bilinmesinin gerekliliği, spesifik prob dizaynının bazen mümkün olmaması, yeni bir prob için hibridizasyon dizaynı ve optimizasyonununun gerekmesi, manuel sayımın öznel olabilmesi, agregatların yapısal analizi, konfokal mikroskop ve resim analiz gerektirmesi gibi yöntemle ilgili sınırlamalar vardır (Kirk vd., 2004).

2.5.6 16S klon kütüphanesi oluşturma

16S klon kütüphanesi oluşturma mikrobiyal çeşitliliği belirlemede biraz zaman almasına rağmen önemli ve oldukça geçerli bir yöntemdir. Bir genin kopyasını yapma işlemidir. İstenilen gen, DNA taşıyıcı birimi denilen vektörler ile konak hücreye yerleştirilir ve çoğaltılır. Bu sayede genler ayrıntılı olarak incelenebilir. Dolayısı ile bir

çevresel örnekten elde edilen karışık genomik DNA'da hangi mikroorganizmaların bulunduğu belirlenebilir.

Klonlamanın aşamaları şöyledir (Mocalli ve Benedetti, 2010)

- i) DNA'nın izole edilmesi PCR ile çoğaltılması
- ii) DNA'nın uygun vektörlere eklenmesi
- iii) Uygun konak hücreler içinde istenen DNA'nın klonlanması yani transformasyonu
- iv) Klon kütüphanesinin taraması
- v) Biyoinformatik analizi

Kopyalamak istediğimiz ve PCR ile çoğaltılan DNA parçası, genellikle bir plazmid vektöre ligasyon işlemiyle eklenir. Ligasyon iki DNA molekülünün uçlarının birleştirilmesi işlemidir. Dışardan eklenen DNA'yı (veya geni) içeren plazmid rekombinant DNA olarak isimlendirilir. Oluşturulan rekombinant plazmidler bakteri kültürüne eklenir. Ardından konakçı hücreler dış ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alırlar. Konakçı hücrenin her bölünmesinde klonlanan genler de çoğalır.

Plazmid vektörler, konakçı hücreye yerleştirildiklerinde, klonlanan hücrelerin seçici ortamlarda belirlenmesini sağlayan işaretleyicileri vardır. Mavi-beyaz seçimi olarak adlandırılan teknik, klonlanan hücrelerin seçiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknikte klonlanmak istenen DNA, vektörün lacZ geninde bulunan restriksiyon bölgesine eklenir. Böylece lacZ geninin bütünlüğü eklenen DNA ile bozulur ve β -galaktosidaz olarak isimlendirilen enzimi kodlayamaz. β -galaktosidaz enzimi, laktozu, glikoz ve galaktoza parçalama özelliğine sahiptir. Klonlama sonunda örnek, ampisilin içeren bir besiyerine ekilir. Plazmit içermeyen bakteri ampisilin direnç geni içermediği için besiyerinde üremez. Ancak sadece bu basamak rekombinat plazmit seçimi için yeterli değildir. Rekombinant plazmit içeren bakteriyi ayırt etmek için besiyerinin, antibiyotik dışında renk oluşturan ve β -galaktosidaz tarafından parçalanabilen X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) olarak adlandırılan bir substrat içermesi gerekir. X-gal, laktoza benzer ve β -galaktosidaz tarafından parçalandığında mavi renge dönüşür. Sonuçta rekombinant plazmit içermeyen bakteriler lacZ genini bütünsel olarak taşıdığından β -galaktosidaz üretirler ve besiyerindeki X-gal parçalandığı için koloniler maviye dönüşürler.

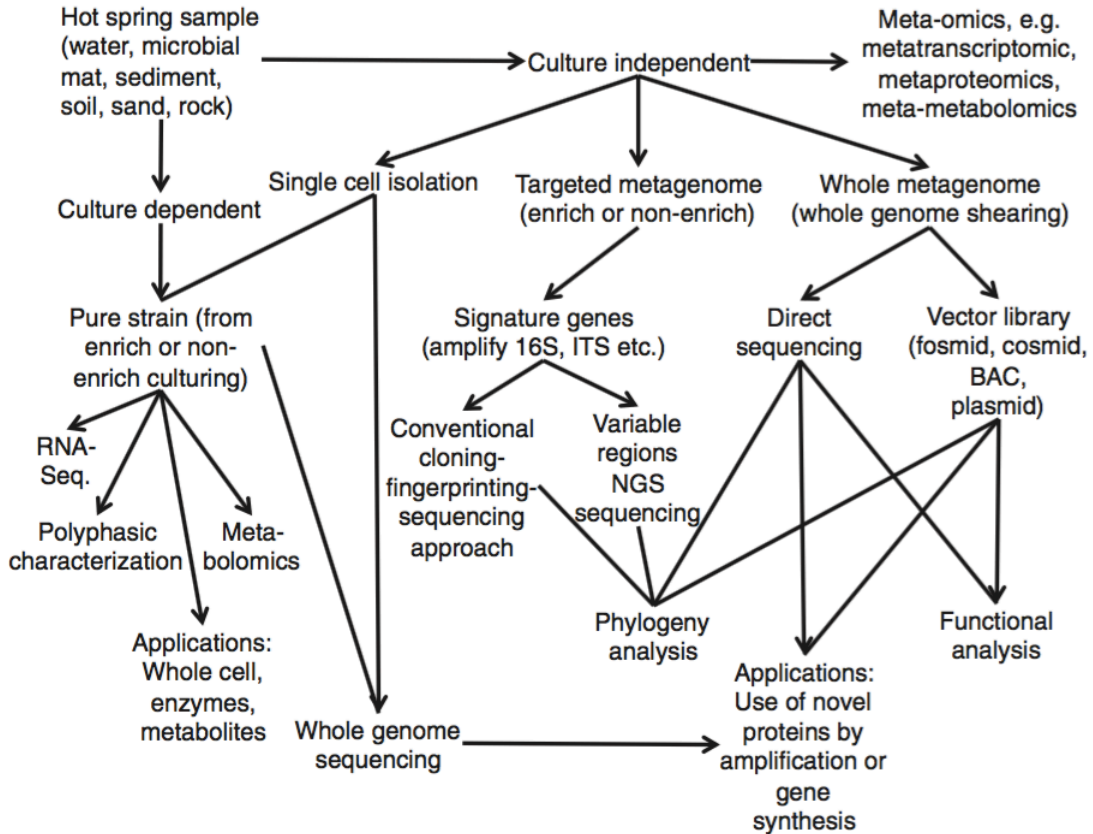
Rekombinant plazmit içeren bakterilerde ise işlevsel lacZ geni olmadığı için β -galaktosidaz enzimi üretmezler ve besiyeri üzerindeki koloniler beyaz renkte kalırlar. Klonlama işleminin başarılı olduğu koloniler beyaz kolonilerdir. Seçilen beyaz kolonilerin plazmit izolasyonu ve sonra dizi analizi yapılır (Thieman ve Palladino, 2013; Madigan ve Martinko, 2010).

Doğruluğunun yüksek olması ve henüz kültüre ve identifiye edilmemiş organizmaların identifikasyonuna olanak tanıdığı için oldukça avantajlıdır. Çok zaman harcanması ve yorucu olması, toprak ve sedimentlerle çalışıldığında DNA ekstraksiyonunun zor olması, kantitatif olmaması, olması gerekenden daha fazla klon dizilenebilmesi dezavantajları arasında sayılabilir (Kirk vd., 2004).

2.5.7 Kısmi 16S rRNA gen dizileme ve kültür bağımsız çalışmalar

İkinci jenerasyon dizileme olarak da bilinen yeni nesil dizileme (NGS) düşük dizileme fiyatlarında daha çok örnek ile 16S rRNA gen temelli çeşitlilik çalışmalarının eğilimini geliştirmiştir (Şekil 2.9). NGS dizileme platformlarının çoğu okuma uzunluğu nispeten kısa olduğu için, 16S rRNA gen dizileri analizler için sıklıkla kullanılmaktadır. 16S rRNA genlerinin çoğu dokuz tane değişken bölge (V1-V9) ve dokuz tane korunmuş bölge vardır. Dejenere ya da dejenere olmayan primerler seçilmiş korunmuş bölgeler için tasarlanı ve hedeflenmiş metagenomik olarak da bilinmektedir. Ancak tüm 16S rRNA gen analiziyle karşılaştırıldığı zaman biyoçeşitlilik çalışmalarında çapraz sonuçlar oluşturacak bazı belirtiler vardır. V1-V2 primer seti metagenome çeşitlilikte doğru olarak değerlendirilemediği için; çamur metagenomik değerlendirmesinde, V3 ve V4 bölgeleri için bir primer seti dizayn edilmiştir . Ayrı bir deneyde V7, V8 ve V9'un kötü bölgeler olduğunu V1 ve V2 değişken bölgelerinin aslında daha iyi seçimler olabileceğini önerdiler (Guo vd., 2013). Termofilik mikrobiyaya popülasyonlarının çalışılması için uygun tam değişken bölgeler yoğun çalışma gerektirir ama in silico analizler SILVA16S/18S rRNA gibi yetersiz kaynak verilerinin sağladığı görüşler ile yürütülmektedir (Klindworth vd., 2012). Bu çalışmanın yazarları tek primer çiftinin tüm prokaryotik filum veya cinslerin, n 16S rRNA genlerinin amplifiye etmek için mükemmel uyumlulukta olabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak, okunan kısa uzunluktaki ve dizilene eksik 16S rRNA gen dizilerinin, birçok benzersiz ve kaçırılmaması gereken yeni çevre mikroorganizmaların

olası olabileceği gibi talihsiz bir sonuç vardır. 16S rRNA temelli metagenomik yaklaşım yalnızca kaplıcalardaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798135>) (Inskeep vd., 2013)) mikrobiyal çeşitliliği belirleme de değil toprak örnekleri (Fierer vd., 2012), atık su ile muamele edilmiş bitki örnekleri (Cai vd., 2013) ya da mikrobiyaya ile kaplı dilden alınan örnekler ile fare bağırsığından alınan örnekler de çalışılmaktadır (Jiang vd., 2012). Bu yaklaşım ekologların, mikrobiyologların ve kolay anlaşılmasını ve veri gmsterimini sağlamak amacıyla kullanıcı dostu grafik ara yüzleri geliştiren biyoinformatikçilerin ilgisini çekmektedir. Bu arayüzler VITCOMICS ((Mori vd., 2010), Krona (Ondov vd., 2011)) ve Windows temelli CLcommunity kapsamaktadır. Yaşam ağacındaki taksonomi boyunca gen sayıları değişiklik gösterdiği için çevresel örnekteki bakteri topluluğunun tahmini doğru olmayabilir. Ancak hesaplamalı simülasyonların analizlerin gelişmesi ve anlaşılmasının sağlayabildiğini gösteren belirtiler vardır (Kembel vd., 2012).



Şekil 2. 9 Termofiller ve hipertermofiller ile ilgili çalışmaların akış diyagramı

2.5.8 Shotgun metagenom ve kültür bağımsız çalışmalar

Tüm ya da parça 16S rRNA gen dizisinin filogenetik analizi organizmalar için nedir sorusuna cevap vermektedir. Hedefli metagenomik (16S rRNA biyomarker) karşılaştırmalı ekolojik bilgidendir ve nasıl ilişkileri olduğu ya da ne yapıyorlar sorularına cevap veremez. Bu sorulara yanıt veren ayrı bir metagenomik yaklaşım vardır; shotgun metagenomik olarak bilinen bu yaklaşım belirli bir bölge için ekolojik görünüm sağlayabilir. HiSeq® SBS Kit v4, HiSeq Cluster Kit v4 ve the Illumina HiSeq2500 sequencer, 6 günden daha az sürede okuma gerçekleştirebilmektedir. Shotgun metagenomik dizileme verileri metabolomik yeniden düzenlemeyli sağlamaktadır ama 16S rRNA ampikon NGS ile mümkün değildir (Şekil 2.9). Biyoinformatik arayüzleri analizlerde büyük role sahiptir. Biyolojik sistemlerde işlevsel gen sekanslarının varlığı, KEGG (Kyoto Genes Ansiklopedisi ve genomlar), COG (ortolog grubu kümelerini) ya da patojen veya hastalık oluşturma genlerin belirlenmesi SEED kullanılarak mümkündür. Bu konu ile ilgili Inskeep vd. (2010) ve Jiménez vd. (2012)'in çalışmaları vardır. Shotgun metagenomik dizileme ile ilgili iki sorun vardır; pahalı kurulum maliyeti ile analiz, bilgi çekme ve veri depolama için yüksek işlem gücü gerekliliğidir. Sadece programların bir çoğu yeterli miktarda verileri yeterli miktarda işleyebilir. Programlar, MetaCluster (Wang vd., 2012), IDBA-UD (Peng vd., 2012), metAMOS (Treangen vd., 2013), MetaVelvet (Namiki vd., 2012), Meta-IDBA (Peng vd., 2011), ve SOAPdenovo (Xie vd., 2014)'dır.

Sonuçlar MEGAN (Huson vd., 2007), MGRAST (Glass vd., 2010), CAMERA (Seshadri vd., 2007) gibi programlar kullanılarak görüntülenebilmektedir. Yakın ilişkili türlerin birlikte yaşadığı mikrobiyal komunitelerin karmaşıklığından dolayı, çevirici contiglerin oluşturduğu konsensüs dizilerin yığılmasına, alt tür genomlarında küçük varyasyonların test edilmesiyle katkı sağlanmıştır (Peng vd., 2011). Bir derlemede, Thomas vd. (2012) metagenom çeviricilerin gelişimini yorumladığı zaman daha erken dönemlerdedir. Dataların doğruluğuna ulaşmak zorlayıcıdır. Shotgun metagenomik için sorun kısa okuma dizilerinin karmaşıklığıdır. Bu çeşit çalışmalar için NGS enstrümanları daha uygundur. Thomas ve Tümmler (2013), bilgisayar temelli analizlerin gelişmelerini tartışmışlar ve shotgun dizileme ile ilgili sorunlar için ipuçlarına değinmişlerdir.

2.5.9 Metagenomikler

Bu yaklaşımda, bir mikrobiyal topluluktan klonlanmış toplam DNA'nın rasgele dizi analizi o topluluğun tüm genlerinin ortaya çıkarılması için kullanılır. Metagenomiklerin amacı organizmanın genom dizilerini tamamlayıp bitirmek değildir. Bunun yerine, tanımlanabilir proteinleri kodlayan bir çok geni taramak ve daha sonra hangi filogenetik ağaca ait olduğunu tanımlamaktır. Bu 16S rRNA gibi filogenetik işaretleyicileri içeren genlere eş dizilerle yapılır. Moleküler topluluk analizi tek bir genin biyoçeşitliliğine odaklanır. Metagenomiklerde ise mikrobiyal topluluk içindeki tüm genler (metagenom) örneklenir. Bu da komünitenin çok daha sağlam bir resmini ortaya çıkarır. Ayrıca tek gen yaklaşımı ile mikrobiyal topluluğun gözden kaçırılan özellikleri de ortaya çıkarabilir. Metagenomikler mikrobiyal toplulukların hem filogenetik çeşitliliğini hem de metabolik çeşitliliğini tayin edebilir (Madigan vd., 2000).

2.6 Deneysel Tasarım Yöntemleri

Deney tasarımı, bir süreçteki girdi faktörleri üzerine istenilen değişikliklerin sistematik bir şekilde yapılması ile cevap değişkeni üzerindeki değişkenliğin gözlenmesi ve yorumlanmasıdır. Deney tasarımları ile sonuç üzerinde en etkin girdi faktörlerini belirlemek, performans özelliğini hedef değere en yakın sonuca ulaştıracak şekilde girdi faktörlerinin seviyelerini belirlemek, kontrol edilmeyen girdi etmenlerinin sonuç üzerindeki etkisinin en az olacağı kontrol edilebilen girdi faktörleri kombinasyonunu oluşturmak, tüm faktör ve seviyelerin eş zamanlı deneye tabi tutulmak suretiyle optimizasyon sürecini kısaltmak mümkündür. Deney tasarımı sırasında kullanılan 3 ilke söz konusudur. Bunlar rassallaştırma, tekrarlama ve bloklama ilkeleridir (Çömlekçi, 2003). Rassallık, çevresel gelişmelerin belirli bir kurala ve düzene bağlı olmadan tesadüfi olarak oluşmasıdır. Deney tasarımı için rassallaştırmanın en önemli yolu bağımsız faktörlerin seviyelerinin her bir deney için rassal olarak atanmasıdır. Deneylerin birden fazla sayıda yapılmasıdır, tekrarlama deney hatasının ölçümünü sağlamak için gereklidir. Hata, tesadüfler ve değişkenliğe katloda bulunabilecek diğer faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Belirli bir anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilen istatistiksel anlamlılık testinin kesinliği arttırılmak isteniyorsa deneydeki tekrarlama sayısının artırılması gerekir. Bloklama bir deneyin hassasiyetini arttırmak için kullanılan bir teknik olup deney alanın

bölgümlere ayrılmasıdır. Burdaki temel düşünce, benzer deneysel birimlerin gruplara bölünmesidir (Çömlekçi, 2003).

Deney tasarımları genel olarak tesadüfi parselleri, tesadüfi blokları, latin karesi, tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel deney tasarımları olmak üzere 5 ayrı grupta incelenebilir (Şanyılmaz, 2006).

2.6.1 Cevap yüzey yöntemi (Response Surface Methodology, RSM)

Cevap Yüzeyi Yöntemleri (Respon Surface Methodology/RSM), genellikle birden fazla yanıt değişkeninin birçok faktörden etkilendiği durumda, problemin modellenmesi ve analiz edilmesinde kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamı olarak tanımlanır (Montgomery, 2009). Cevap Yüzeyi Yönteminin en yaygın uygulamaları, bir kaç girdi değişkeninin (faktörün) bir ürün veya sürecin performans ölçüsü veya kalite karakteristiğini etkilediği durumlardır. Bu performans ölçüsü veya kalite karakteristiği cevap olarak adlandırılmaktadır. Girdi değişkenleri (faktörler), araştırmacı veya uygulayıcı tarafından kontrol altında tutulabilmektedir (Özler, 1997).

Cevap Yüzeyi Yöntemi, çeşitli bağımsız değişkenlerin söz konusu olduğu bir fonksiyonun çıktı değerinin optimize edilmesi için uygulanan bir seri deney prosedürüdür. Temel yaklaşımı lokal minimum veya maksimum değere ulaşmak için maksimum artış veya düşüşün olduğu yönde hareket edilmesidir (Myers ve Montgomery, 1995). Klasik yöntemlerde analiz sonuçları yorumlandıktan sonra yapılan deneylerden hangisinin yanıt değişkenini istenilen değere taşıdığı belirlenir. Ancak RSM’de Derringer ve Suich (1980) tarafından geliştirilen Çekicilik (Desirability) fonksiyonu kullanılarak, bir veya birden fazla yanıt değişkeni aynı anda optimize edilebilmektedir. Çekicilik fonksiyonu ile, RSM tasarımlarında denemesi yapılmamış faktör seviyelerine ait tahminler oluşturularak en iyi sonuca ulaşılmaktadır (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). Çekicilik fonksiyonu 3 farklı amaca yönelik optimizasyon seçeneği sunmaktadır (Croarkin ve Tobias, 2015). Bunlardan ilki, yanıt değişkeninin maksimum olması istendiğinde; ikincisi, yanıt değişkeninin minimum değerinde olması istendiğinde ve son olarak, yanıt değişkeninin hedef gösterilen bir değerinde olması istendiğinde kullanılmaktadır. Ayrıca, birden fazla yanıt değişkeni olması durumlarında, istenilen amaçlara yönelik kullanılan fonksiyonlar birleştirilerek

bileşke fonksiyonu elde edilir. Bu sayede bütün yanıt değişkenleri aynı anda optimize edilmiş olacaktır.

Literatürde en fazla kullanılan cevap yüzeyi tasarımları Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design-CCD) ve Box-Behnken Tasarımı (Box-Behnken Design BBD)'dir. Bu tasarımlar ikinci dereceden terimler içeren ikinci seviyeden modellerdir. Bu modeller ile elde edilen sonuçlar cevap yüzeyi olarak adlandırılan ve kontür çizimleri ile grafik haline getirilen şekilde gösterilir ve bu değerleri tahmin etmek için kullanılan deney tasarımlarına da Cevap Yüzeyi Tasarımları adı verilir (Myers ve Montgomery, 1995).

2.6.1.1 Box-behnken tasarım yöntemi (BBD)

Box- Behnken tasarımı bağımsız kuadratik bir tasarımdır. İçine gizlenmiş faktöriyel ya da kesirli faktöriyel tasarım içermez. Tasarımda deneme noktaları kenarların orta noktaları ve merkezde olmak üzere konumlanır. Bu tasarımlar döndürülebilir ve her faktörün üç seviyesine ihtiyacı vardır. Tasarımların merkezi kompozit tasarıma kıyasla ortogonal bloklama için limitli bir kabiliyeti vardır ([http://www.itl.nist.gov/div_898/handbook /pri/ selection/pri_3362.htm](http://www.itl.nist.gov/div_898/handbook/pri/selection/pri_3362.htm),11/14/2006).

BBD yönteminin en önemli dezavantajı, gerçekleştirilen deneylerin genellikle faktörlerin orta seviyelerinde olmasıdır. Düşük (-1) ve yüksek (+1) seviyelerde az sayıda deneyin gerçekleştirilmesi, optimizasyon aşamasında bu bölgelere ait tahminlerin başarısını düşürmektedir (Croarkin ve Tobias, 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich, Fluka ve Merck'ten temin edilmiştir. Moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan kimyasal, enzim ve kitler Invitrogen, Fermentas MBI, New England Biolabs, Bioline, Biobasic, Beckman Coulter, Promega ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3. 1 Çalışma süresince kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermal cycler	Techne, Applied Biosystems
pH Metre	WTW, Almanya
Jel Dökümantasyon sistemi	Bio-Rad
Saf su cihazı	Mes Mp Multipure
Mikrosantrifüj	Centurion Scientific K3 series, UK
Yatay jel elektroforezi	Clever Scientific, UK
Elektroforez için güç kaynağı	Clever Scientific, UK
-85 °C derin dondurucu	Dairei, Japonya
Mikroskop	Olympus
Flouresesans mikroskobu	Leica DM6000B
Sıcak su banyosu	Memmert, Almanya
DGGE sistemi	BioRad
Etüv	Binder, USA
Hassas tartı	Ohaus Adventurer-Pro
Çalkalamalı inkübatör	Lab Companion SI 600R, Lab Companion SI 7100, Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Almanya

Çizelge 3. 1 (devam) Çalışma süresince kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
UV-visible spektrofotometre	Schimadzu, Japonya
Pipet seti	Thermo Scientific, Biohit
Hibridizasyon fırını	Hybridization Oven H0-10
Vorteks	IKA MS2 minishaker
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Bruker Tensor 27
Termogravimetrik analizör/DTA	Perkin Elmer-Diamond
ICP-AES	Perkin Elmer 3100
GPS cihazı	Garmin GPS-12
Arazi tipi analiz cihazı	WTW

3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerlerinin içerikleri izleyen metinde verilmiştir.

1.Ortam (Maya Özütü Ortamı)

Malt Özütü	4,00 g
Maya Özütü	10,00 g
Glukoz	4,00 g
dH ₂ O	1000 mL
pH 8,0 %10 Na ₂ CO ₃ solüsyonu ile ayarlanmıştır.	

2.Ortam (Nutrient Agar)

Beef Ekstrakt	5,00 g
Pepton	3,00 g
Agar	15,00 gr
dH ₂ O	1000 mL

Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'sı 7.0'ye ayarlanmış 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3. ortam ATCC medium: 697 Thermus medium

Pepton	8,00 g
Maya Özütü	4,00 g
NaCl	2,00 g
Agar	30,00 g
dH ₂ O	1000 mL

pH 7.5 olarak ayarlanır ve 121 °C’de 15 dakika steril edilir.

4.Ortam (Thermus Medium)

Tryptone	3,00 g
Maya Özütü	1,00 g
Castenholz 10X Basal Salt Solution	100 mL
dH ₂ O	1000 mL

pH 7,5-7,8’e NaOH ile ayarlanarak katı besiyeri için % 2,3-3 oranında agar katılmıştır. 131 °C de 30 dakika otoklavlanarak % 0.015 sodyumazid ve % 0.01 lizozim katılmıştır (Williams ve Da Costa 1994).

Nutrient Broth

Nutrient Broth	8,00 g
dH ₂ O	1000 mL

Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Polimer üretim ortamı

CaCl ₂ .2 H ₂ O	15 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	123 mg
Na ₂ HPO ₄	1.50 mg
KH ₂ PO ₄	1,50 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	9,00 g
NaCl	10,00 g
(NH ₄)SO ₄	0,5 g
Sükroz	20,00 g
Mineral solüsyon	6 mL
d H ₂ O	1000 mL

pH 7,2' ye ayarlanmış ve süzkroz ayrı olarak 110 °C de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan tüm çözeltilerin içerikleri izleyen metinde verilmiştir.

Castenholz 10X basal salt solution

Nitritotriasetikasit (NTA)	1,00 g
CaSO ₄ .7H ₂ O	0,60 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g
NaCl	0,08 g
KNO ₃	1,03 g
NaNO ₃	6,89 g
Na ₂ HPO ₄	1,11 g
FeCl ₃ (0.28 g/l)	10 mL
Nitsch İz Element Solüsyonu	10 mL
dH ₂ O	1000 mL
+ 4 °C' de saklanacaktır (Williams ve Da Costa 1994).	

Nitsch İz Element Solüsyonu

H ₃ BO ₃	0,50 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,046 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,25 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 mg
H ₂ SO ₄	0,5 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,50 mg
dH ₂ O	990 mL
+ 4 °C' de saklanacaktır (Williams ve Da Costa 1994).	

Mineral Solüsyonu

H ₃ PO ₄	1,96 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	56 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	29 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	22 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	3 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
dH ₂ O	1000 mL

3.1.4.1. Gram Boyamada Kullanılan Çözeltiler**Kristal Viyole**

Kristal Viyole	2,00 g
Etanol	20 mL
Amonyum Oksalat	0,80 g
dH ₂ O	80 mL

Kristal viyole (2 gr) ile Etanol (20 mL) bir kapta, Amonyum oksalat (0,8 gr) ile dH₂O (80 mL) bir başka kapta karıştırıp hazırlanır, her biri çözüldükten sonra başka bir kapta birleştirilir.

Lugol

Potasyum İyodür	2,00 g
İyot	1,00 g
dH ₂ O	100 mL

Potasyum iyodür ve distile su iyice çözüldükten sonra, iyot eklenmiş ve karanlık ortamda saklanmıştır.

Safranin

Safranin	0,25 g
dH ₂ O	90 mL

Safranin, distile su içinde iyice çözdürülmüştür.

3.1.4.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

TAE 50X

Tris base	242 g
Asetik Asit	57,1 mL
EDTA (0,5 M pH 8)	20 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd. 1989).

TBE 5X

Tris base	54 g
Borik Asit	27,5 mL
EDTA (0,5 M pH 8)	20 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd.,1989).

PBS 10X

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,00 g
KH ₂ PO ₄	2,00 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanıp pH 7,2'e ayarlanmış, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

Lizozim stok çözeltisi (10 mg/mL)

Lizozim	100 mg
EDTA (0,5 M)	1 mL
Tris-HCl (1M)	1 mL
dH ₂ O	8 mL

Filtre ile sterilize edilerek kullanılmıştır. -20 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

%80'lik DGGE stok solusyonu

Üre	13,45 g
Deiyonize Formamid	12,8 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	8 mL
TAE (20X)	2 mL

mQ su ile 30 mL'ye tamamlanıp +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

%0'lık DGGE stok solusyonu

Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	8 mL
TAE (20X)	2 mL

mQ su ile 30 mL'ye tamamlanmış, buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

%10 SDS çözeltisi

Sodyumdodesilsülfat (SDS)	10,00 g
dH ₂ O	1000 mL

Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd. 1989).

In situ hibridizasyon tamponu

NaCl (5 M)	360 µL
Tris-HCl (1 M)	40 µL
Formamide	700 µL
mQ su	900 µL
SDS (%10)	2 µL

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton, 1999).

FISH için yıkama tamponu

Tris-HCl (1 M pH 8)	1 mL
NaCl (5 M)	700 µL
EDTA (0,5 M)	500 µL

mQ su ile 50 mL'ye tamamlanır (Anton 1999).

X-gal çözeltisi

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside 100 mg

N,N'-dimethylformamide 2 mL

Çözelti hazırlandıktan sonra alüminyum folyo ile kaplanmış güneş ışığından korunmuştur, -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

IPTG çözeltisi (0.1 M)

IPTG 1,2 g

DNA-az ve RNA-az içermeyen su 50 mL

Bu çözelti filtre ile steril edilmiş ve -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Çözücü solüsyonu

Amonyum asetat 0.5 M

Magnezyum asetat 10 mM

EDTA (pH 8.0) 1 mM

SDS % 0.1

3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotit problemler

Çalışmada kullanılan primer ve oligonükleotid problemler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2 İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid problemler

Primer (ya da probun) adı	Spesifik olduğu grup	Primer (ya da probun) dizisi (5'-3')	Referans
20F	Archaea	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG	Orphan vd. 2000
27F	Bacteria	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1387R	Bacteria	GGGCGG(AT)GTGTACAAGGC	Marchesi vd. 1998
915R	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	De Long 1992
341F	Bacteria	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer vd., 1993
907R	Evrensel	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Muyzer vd. , 1993

Çizelge 3. 2 (devam) İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid proplar

341F(GC)	Bacteria	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCC GTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCT ACGGGAGGCAGCAG	Muyzer vd., 1993
907R(GC)	Evrensel	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCC GTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCGT CAATTCCTTTGAGTTT	Muyzer vd., 1993
Arc915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCT	Amann vd., 1990
Eub338	Bacteria	GCTCCCTCCCGTAGGAGT	Amann vd., 1995

3.2 Yöntem

Örnekleme alanlarının belirlenmesinde hedef organizmaların yaşayabileceği en uygun fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip alanlar seçilmiştir. Bu amaçla ülkemizde çok sayıda bulunan kaplıcalar araştırılmış ve daha önce mikrobiyal biyoçeşitlilik açısından çalışılmamış olan Kütahya-Simav'da bulunan Çitgöl ve Naşa kaplıcaları seçilmiştir.

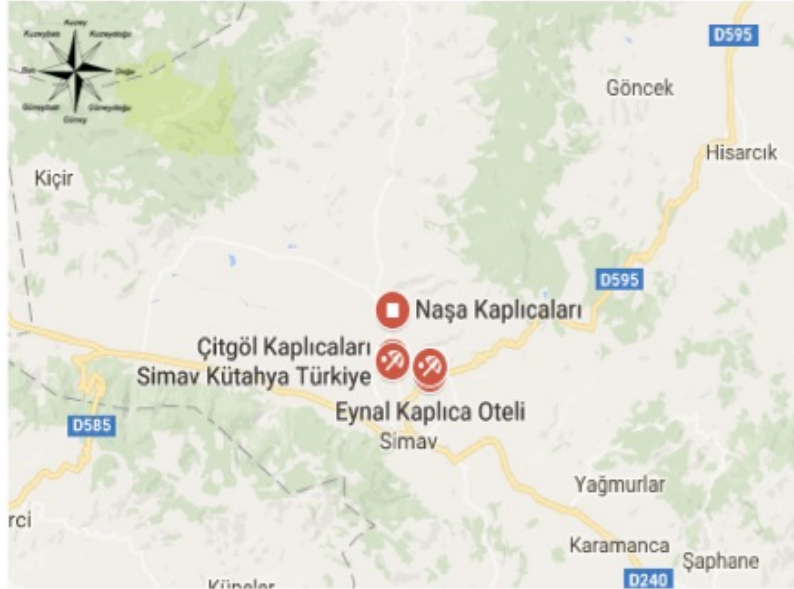
Örnekleme alanlarından 2011 Mayıs ve 2012 Eylül aylarında örnekler alınmıştır. Alınan su örnekleri iki şekilde laboratuara getirilmiştir. Steril şişelerde +4 °C de muhafaza edilerek getirilen örnekler I.Grup olarak numaralandırılmıştır. II. Grup ise örnek alınan kaynağın sıcaklık değerinde sabit kalmasını sağlayacak biçimde termoslara konularak numuneler laboratuara getirilmiştir. Burada amaç ortamda var olan mikroorganizmaların mümkün olduğunca zarar görmeden izolasyon çalışmalarında kullanılabilmesidir.

Tez kapsamında çalışılan örnekleme noktaları aşağıda verilmiştir. Örnekleme alanlarına ait enlem ve boylamları belirten koordinat değerleri Garmin GPS-12 model GPS cihazı ile belirlenmiştir. Örneklerin sıcaklık, pH değerleri WTW arazi tipi analiz cihazı kullanılarak örnekleme anında belirlenmiştir. Aynı zamanda Çitgöl ve Naşa Termal kaplıcalarından alınan su örneklerinin elemental analizleri ise induktif eşleşmiş plasma

spektroskopisi (ICP) kullanılarak Balıkesir Üniversitesi Temel Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Naşa Kaplıcaları, Kütahya ili Simav ilçesi sınırları içerisinde bulunmakta olup Simav ilçe merkezine 7 km. mesafede yer almaktadır (Şekil 3.1, Şekil 3.2b) . Denizden yüksekliği 800 m. dir. Naşa sıcak sularının kireçlenme, bel fıtığı, siyatik lumbago, romatizma, egzama, böbrek kumları, mide ülseri, nefrit, cinsel hastalıkları, guatr, cilt rahatsızlıklarına olumlu etkileri görülmektedir.

Çitgöl Termal Kaplıcaları ise Kütahya ili Simav ilçesine 4 km uzaklıkta yer almaktadır (Şekil 3.1, Şekil 3.2a). Tedavi ettiği hastalıklar ise; cilt deri hastalıkları, her tür romatizma , kırık ve çıkık, siyatik, kireçlenme, ruhen ve bedenen görülen yorgunluklar, mide ülseri, kadın hastalıkları, egzama, nevralsi, bel fıtığı, nefrit, ortopedik, limbo ameliyat sonrası rehabilitasyon gibi bir çok hastalığa iyi gelmektedir.



Şekil 3. 1 Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarının haritadaki yerleri



Şekil 3. 2 (a) Naşa Termal Kaplıcası (b) Çitgöl Termal Kaplıcası sıcak suyun yer yüzüne çıktığı ve örnek alınan yerler

3.2.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri

Bölüm 3.2.1’de belirtildiği biçimde alınan ve laboratuara getirilen örneklerdeki mikrobiyal komünitenin belirlenmesi için iki ayrı strateji izlenmiştir. Bunlar; kültüre bağlı ve kültürden bağımsız tekniklerdir.

3.2.2.1.Kültüre bağlı yöntemler

i)Termofil mikroorganizmaların izolasyonu

Bölüm 3.1’de içerikleri verilen besiyerlerinden maya özütü ortamı, nutrien broth, thermus ortamı ATCC 697 ve thermus ortamı sıvı olarak 250 ml’lik erlenlerde 100 ml hacimde ve katı olarak petrilere hazırlanmıştır. Sıvı besiyerlerine gelen su örneklerinden 5ml ekim yapılmış ve 15 gün süre ile 70 °C’de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. 15 gün sonunda % 0,1’lik serum fizyolojik çözeltisi ile 10^{-6} ‘ya kadar dilüsyonlar hazırlanmış yayma plaka tekniği ile ekimler yapılmış 15 gün süre ile 70 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda petrilere gelen su örneklerinde yayma plaka yöntemi kullanılarak ekimleri yapılmış 70 °C’de 15 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petrilere her gün kontrol edilerek farklı morfolojide görünen koloniler alınmış ve çizgi ekim tekniği kullanılarak saflaştırmaları yapılmıştır. Gram boyama ile saflıkları kontrol edilmiştir.

ii) İzolatların moleküler identifikasyonu

DNA ekstraksiyonu Cifuentes vd. (2000) ve Nogales vd. (1999)'a göre bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Saf olarak izole edilen izolatlardan mercimek tanesi büyüklüğünde koloniler toplanarak 600 µL ekstraksiyon tamponunda (100 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM EDTA) resüspanse edilmiş ve 6 µL lizozim (3 mg/mL) eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında %10 SDS (60 µL), 9 µL proteinaz K (150 µg/mL) eklenmiş ve bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 120 µL 5 M NaCl eklenmiş ve ters-düz çevrilerek resüspanse edilmiştir. 90 µL CTAB (%10 CTAB, 0.7M NaCl) resüspanse karışıma eklenmiş ve 10 dakika 65°C'lik su banyosuna alınmıştır. Karışım su banyosundan alınarak 1-2 dakika sıvı azotta bekletilmiştir. Donan tüp yeniden 65°C'lik su banyosunda bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır ve sonra yine sıvı azot işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem en az 3 kez tekrarlandıktan sonra 900 µL Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) karışıma eklenmiş ve 5 dakika 4 °C'de 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz alınmış ve alınan miktar kadar Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) sıvı faza eklenmiştir. Bu işlem protein ara fazı indirgenene kadar devam ettirilmiştir. Sonrasında 80 µL sodyum asetat (3M pH:4.8), 480 µL isopropanol, 8 µL MgCl₂ (1M) eklenmiş ve 30 dakika 13.000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra -20 °C'de bekletilmiş olan %70'lik alkolden 100 µL pelet üzerine eklenmiştir. 15 dakika 13.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Alkol pipet ile uzaklaştırıldıktan ve pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 µL DEPC ile pelet resüspanse edilmiştir (Cifuentes vd., 2000; Nogales vd., 1999). DNA varlığını kontrol etmek için 2 µL örnek %0.8'lik agaroz jelle yüklenmiş ve 1X TAE tamponunda yürütülmüştür. İncelenecek nükleik asitin tipine göre jellerde 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ya da Hind III ile kesilmiş Lambda DNA fragmentleri marker olarak kullanılmıştır. Tüm jellerde DNA'nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µL konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuşlar ve 312 nm dalga boyunda UV veren transilluminatörler yardımıyla gözlenmişlerdir. Jel fotoğrafları jel Dökümantasyon ve görüntüleme sistemi ile (BioRad) elde edilmiştir. DNA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

iii) İzolatların ARDRA profillerinin belirlenmesi

İzolatların ARDRA profillerini belirlemek amacıyla elde edilen ve -20°C 'de saklanan toplam DNA'lardan 27 F-1387 R ve 20 F-915 R primerleri kullanılarak 16S rDNA gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon bileşenleri ve şartları aşağıdaki gibidir (Okibe vd., 2003).

PCR bileşenleri

5X renksiz tampon	4 μL
dNTPs (2 mM)	2 μL
MgCl ₂	2 μL
İleri primer (bakterie için 27F, arke için 20F)	0,4 μL
Geri primer (bakterie için 1387R, arke için 915R)	0,4 μL
DMSO	0,4 μL
GoTaq Hot Start enzim	0,2 μL
Ultra saf su	9,6 μL
Kalıp DNA	1 μL

PCR koşulları (16S PCR bakterie)

95 $^{\circ}\text{C}$ 5 dakika (Denatürasyon),

95 $^{\circ}\text{C}$ 30 saniye

55 $^{\circ}\text{C}$ 1 dakika

72 $^{\circ}\text{C}$ 1 dakika 30 saniye

Bu şekilde 30 döngü,

72 $^{\circ}\text{C}$ 10 dakika

4 $^{\circ}\text{C}$ Süresiz

PCR koşulları (16S PCR arke)

95 $^{\circ}\text{C}$ 5 dakika (Denatürasyon),

95 $^{\circ}\text{C}$ 30 saniye

62 $^{\circ}\text{C}$ 30 saniye

72 $^{\circ}\text{C}$ 1 dakika 30 saniye

Bu şekilde 35 döngü,

72 °C	10 dakika
4 °C	Süresiz

Negatif kontrol olarak DNA içermeyen karışımlar hazırlanmış ve elde edilen PCR ürünleri % 1'lik agaroz jel ile gözlemlenmiştir ve SureClean çözeltisi kullanılarak saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir.

16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için Mbo I, Hinf I (New England Biolabs Cat no R01555) ve Hae III (New England Biolabs Cat no R0147S) enzimleri kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir:

1 reaksiyon için;

HaeIII	1 µL
Tampon C	1 µL
Bovin serum albümin (1/10)	1 µL
Saflaştırılmış DNA	1 µL
Ultra saf su	6 µL

Hinf I için reaksiyon koşulları;

Hinf I	0,5 µL
Buffer	1 µL
Saflaştırılmış DNA	5 µL
Ultra saf su	3.5 µL

Toplam hacmi 10 µL olan karışımlar 37 °C'de bir gece inkübe edilmiş ve analiz amacıyla 0.5X TBE (Tris- Borik asit-EDTA) tamponu içindeki %2 lik agaroz jele yüklenerek 90 V' ta 3 saat yürütülmüşlerdir. Jeller DNA'nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µL konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuşlardır. Elde edilen bant profilleri incelenerek farklı profil gösteren izolatlar seçilmiş dizi analizine yollanmıştır.

İzolatların dizi analizi sonrası gen analizleri NCBI “National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)” veritabanındaki BLAST (Altschul vd., 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece dizi analizinde elde edilen dizilerin filogenetik benzerlikleri ortaya koyulmuştur.

3.2.2.2.Kültürden bağımsız yöntemler

DNA ekstraksiyonu için su örnekleri membran filtrasyona tabi tutulmuş ve 0,45 µm por çapına sahip GTTP tipi filtreler doygunluğa ulaşana dek su örneği filtreden geçirilmiştir. Ekstraksiyon için de bu filtre örnekleri kullanılmıştır. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu Cifuentes vd. (2000) ve Nogales vd. (1999)’a göre bazı değişiklikler yapılarak elde edilen ve bölüm 3.2.2.1’de verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır.

i) Fluerosan in situ hibridizasyon (FISH)

Fiksasyon amacıyla, 1 mL, 3 mL, 5 mL ve 10 mL su örneği %4 Formaldehit (Fluka) eklenerek 4 °C’de 1 gece fikse edilmiştir. Mackintosh ortamının kullanılmasının nedeni, düşük pH’da çevresel su örneğinde bulunabilecek ağır metallerin çözünebilirliğini sağlamaktır. Sonrasında filtrenin yıkanması amacı ile 10 mL 1X steril PBS eklenerek karışım 0,2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Filtreler yıkandıktan sonra hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C’ye konulmuştur. Fiksasyon işleminin sonrasında hibridizasyon için filtrenin küçük bir kısmı kullanılmıştır. Hibridizasyon tamponununun 18 µL’sine ve 2 µL prob (Arc 915 ve Eub338) eklenerek elde edilen karışım filtre üzerine pipetlenmiştir. Geriye kalan hibridizasyon tamponu hibridize edilecek filtrelerin yerleştirildiği falkon tüplerinin içini nemli tutmak ve formamid buharı oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. Lam üzerinde hibridizasyon çözeltisi içeren filtre parçaları yatay şekilde önceden 46 °C’ye getirilmiş hibridizyon fırınında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında filtreler önceden 48 °C’de ısıtılmış yıkama solusyonu içerisine alınarak 15 dakika 48 °C bekletilmiştir. Bu süre sonrasında filtreler kurutma kağıdı üzerine alınarak havada kurumaya bırakılmıştır (Amann vd. 1995; Anton vd. 1999). Örneklerdeki toplam mikroorganizma sayısını belirlemek için ortamdaki tüm DNA’ları boyama özelliğindeki DAPI boyaması uygulanmıştır. DAPI boyaması için filtre parçasına 25 µL DAPI boyası pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

Aynı filtre parçası önce saf alkol ile sonrasında mQ su ile 10 saniye yıkanmıştır. Yıkanmış filtrenin havada kuruması sağlandıktan sonra, lam üzerindeki filtre üzerine citifluor damlatılmış ve lamelle kapatılmıştır. Preparatın incelenmesi epifluoresan mikroskopta (Leica DM6000B) 100X'lik objektifte gerçekleştirilmiştir (Amann vd. 1995; Anton vd. 1999; Aman vd. 2000).

ii) Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)

DGGE analizi için 16S rRNA geninin amplifikasyonu için "GC clamp" adı verilen yaklaşık 40 nükleotidlik bir diziyi 5' uçlarında içeren özel primerler kullanılmıştır (Muyzer vd., 1993). Archaeal 16S rRNA geni amplifikasyonları için 344F-GC ve 907R olarak adlandırılmış olan primerler, Bacteria örnekleri için de 341F-GC ve 907R primerleri kullanılmıştır. Primerlerle ilgili ayrıntılı bilgi 3.1.1 kısmında verilmiştir. Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak filtrelerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen nükleik asitler kullanılmıştır. PCR reaksiyonu karışımı bölüm 3.2.2.1'de verildiği şekilde hazırlanmış ve aşağıdaki PCR koşullarında çalışılmıştır.

Bacteria için DGGE PCR koşulları;

İlk Döngü

94 °C	5 dakika
65 °C	1 dakika
72 °C	3 dakika

9 Döngü (her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1 °C azaltılarak)

94 °C	1 dakika
64 °C (63, 62, 61,....55 °C'e kadar)	1 dakika
72 °C	3 dakika

20 Döngü

94 °C	1 dakika
55 °C	1 dakika
72 °C	3 dakika

Son Döngü

94 °C	1 dakika
55 °C	1 dakika

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Archaea için aşağıdaki şartlar sağlanmıştır;

94 °C 5 dakika

29 döngü

94 °C 3 saniye

56 °C 45 saniye

72 °C 2 dakika

1 döngü

94 °C 30 saniye

56 °C 45 saniye

72 °C 7 dakika

4 °C Süresiz

Elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırılması için Promega Wizard SV gel ve PCR Clean-up system saflaştırma kiti kullanılmıştır. Bunun için pozitif PCR tüpleri büyük taraklı agaroz jelle yüklenerek 95 V'da 50 dakika yürütülmüş daha sonra da UV ışığı altında jeller kesilmiş ve ependorftaki örnekler için her 10 mg jel için 10 µL membran binding solution eklenmiş tüp hafifçe vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 60 °C'de 5-15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda eriyen jel içeriği kolonlu toplama tüpüne transfer edilmiş ve "toplama tüpü" içine yerleştirilmiş ve saflaştırma protokolü takip edilmiştir. En sonunda 50 µL nükleaz içermeyen su mini kolona eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir, mini kolonlar atılarak saflaştırılmış olan örnek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu ürünler yeterince konsantre edilmiş ve yapılacak olan poliakrilamid jelle yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

DGGE işlemi için BioRad Firmasının DGGE sistemi kullanılmıştır. Elektroforez sistemi 1 mm'lik poliakrilamid jellerin oluşumuna izin veren "spacer" lar kullanılarak uygun şekilde hazırlanmış ve sızdırmaz hale getirilmiştir. Sonrasında %0'lık ve %100'lük DGGE stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden % 40'lık ve %60'lık solüsyonlar hazırlanarak gradient oluşturucu düzenek yardımıyla solüsyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. Denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu %40'dan %60'a kadar artacak şekilde ayarlanmıştır. Tarak jel

içine yerleştirilerek polimerizasyon için en az 2 saat bekletilmiştir. Polimerizasyon sırasında elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur ve sıcaklığın 60 °C'ye ulaşması beklenmiştir. Daha önceden Low mass DNA ladder marker kullanılarak DGGE PCR ürünlerindeki DNA konsantrasyonu belirlenmiş 500 ng'a karşılık gelecek miktarda örnek, 4 µL jel yükleme boyası ile karıştırılarak çukurlara yüklenmiş ve 90 V'ta 18 saat yürümesi sağlanmıştır. Elektroforez sonrasında poliakrilamid jel etidyum bromür solüsyonu (1 µg/mL) ile 15 dakika boyandıktan sonra 10 dk boyunca 2 kez distile su içine yıkanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Jel ağırlığı oranında çözücü buffer ilave edilmiş ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmış sonrasında bölüm 3.2.2.1'de verilen DNA izolasyon yönteminin Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) aşamasından sonrası uygulanmış ve GC kuyruğu bulunmayan DGGE primerleri ile tekrardan amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen ürünler dizi analizine yollanmış ve NCBI "National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)" veritabanındaki BLAST (Altschul vd., 1997) programı ile analizleri yapılmıştır.

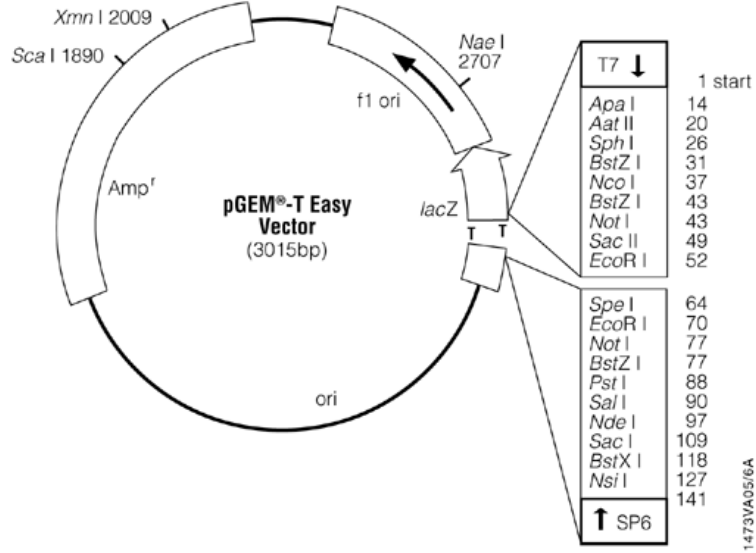
iii) 16S klonlama deneyleri

Saflaştırılmış PCR ürünlerinin pGEM-T vektör sistem II (Promega)'e ligasyonu kitle belirtilen talimatlara göre yapılmıştır. pGEM-T easy vektörün haritası Şekil 3.7'de verilmiştir. Buna göre 10 µL toplam hacme; 1 µL rapid ligasyon tamponu (2X), 1 µL pGEM T vektör (5ng/µL), ve 1 µL T4 DNA ligaz (0.3U/ µL) eklenmiştir. Kontrol reaksiyonu kontrol DNA (0.8ng/µL) içermiştir. Eklenecek DNA miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (<http://www.promega.com>). Bu formülden yola çıkarak DNA:insert oranının 3:1 olması sağlanmıştır.

$$\frac{\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{DNA fragmentinin büyüklüğü(kb)}}{\text{Vektörün Büyüklüğü(kb)}} \times \text{DNA} : \text{Vektör} = \text{DNA miktarı (ng/ } \mu\text{L)}$$

Ependorflara koyulan ligasyon reaksiyonları +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için kitle sağlanan kontrol DNA fragmenti (4ng/ µL) 1 µL pGEM-T kullanılarak aynı şartlarda ligasyona bırakılmıştır.

Aynı zamanda negatif kontrol olarak DNA içermeyen bir ligasyon reaksiyonu da ortamda denenmiştir (<http://www.promega.com>).



Şekil 3. 3 pGEM-T easy vektör haritası (<http://www.promega.com>)

İnkübasyonu takiben kompetent hücelere (*E.coli* DH5α suşu) transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon pGEM-T vektör sistem II’de belirtilen prosedür modifiye edilerek yapılmıştır. Belirtilen prosedüre göre işlem basamakları şöyledir: Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet ampisilinli LB Agar petri hazırlanmıştır. LB besiyeri otoklavla sterile edildikten sonra 50 °C civarına kadar soğuması beklendikten sonra 100 mg/ml ampisilin stoğundan, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir. Ampisilinli agar petrilere bek alevi yanında X-Gal (%4 ve 0,1M) stok solusyonundan 20 µL konularak steril bir drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Kompetan hücreler -80 °C’den çıkarılarak buza koyulmuş ve 5 dakika hücrelerin çözünmesi beklenmiştir. Transformasyon tüpüne 50-100 ng plazmit DNA olacak şekilde 10 µL ligasyon reaksiyonundan konulmuştur. Kompetan hücrelerden de 200 µL eklenmiştir. Yavaş bir pipetaj ile tüpün içindekilerin karışması sağlandıktan sonra 30 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 42 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika buzda bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde, önceden 37 °C’ye ılıtılmış olan LB besiyerinden 800 µL eklenmiştir. 90 dakika 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu

sürenin sonunda transformasyon kültüründen 100-150-200 µL'si petrilere yayılmıştır. 15-20 dakika petrilere kültürü emmesi beklenmiştir. Daha sonra petrilere 37 °C'deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüm beyaz renkli koloni yeni bir LB agar besiyerine ekilmiş, inkübasyondan sonra 4 °C'de beklenip mavi renge dönüşüp dönüşmediği takip edilmiştir (<http://www.promega.com>). Sonra bu beyaz kolonilerden 27F ve 1387R primer setleri ile koloni PCR reaksiyonu kurulmuştur. Bu PCR ürünlerinden bölüm 3.2.2.1'de anlatılan ARDRA tekniği ile Hinf III kesim enzimi kullanılarak klonlar arasındaki farklılık belirlenmiştir. Elde edilen farklı paternlere sahip klonlar ampisilin içeren LB sıvı ortamına transfer edilmiş ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bu sıvı kültürlerden Fermantas plazmid izolasyon kitinin yönergeleri doğrultusunda plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu plazmidlerden vektörün primerleri olan T7 ve SP6 primerleri kullanılarak amplifikasyonları gerçekleştirilmiş ve dizi analizine gönderilmiştir.

3.2.3 İzolatların PHB üretim yeteneklerinin araştırılması

ARDRA profillerine göre seçilen izolatların PHB üretim yeteneklerinin değerlendirilmesi amacı ile Nutrient Broth hazırlanarak 250 ml'lik erlenlerde 100 ml hacimde olmak üzere aşı kültürler hazırlanmış 48 saat 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek bölüm 3.1.3 'te verilen polimer üretim ortamına hücreler transfer edilmiştir. Polimer üretim ortamında izolatlar 48 saat 55°C'de inkübasyona bırakılmış sonrasında PHB ekstraksiyonu yapılmıştır. Polimer ortamının inkübasyonu bittikten sonra steril santrifüj tüplerinde 10000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen pelletler -80 °C'de 1 gece bekletilmiştir. -80 °C'den çıkartılan pelletler çözüldükten sonra üzerlerine 5 ml sodyumhipoklorid eklenip ve vorteksledikten sonra 37 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 1 gece bekletilmiştir. Pellet – Sodyumhipoklorid karışımı 6000 rpm'de 30 dk. santrifüj edilerek ve sodyumhipoklorid kısmı atılmıştır. Lipid ve diğer molekülleri ekstrakte edebilmek için pelletlerin üzerine 5 ml etanol eklenip vortekslenmiş ve daha sonra 6000 rpm'de 30 dk santrifüj yapılarak etanol kısım atılmıştır. Geriye kalan pelletlerin üzerine 5 ml kloroform eklenmiş ve tüpler vorteksledikten sonra 60 °C'lik çalkalamalı su banyosunda PHB'nin çözünmesi için 1 saat inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra PHB ekstraksiyonun gerçekleştiği her tüpten ayrı tüplere 0.1 ml alınacak ve 45 °C olan etüvde

kloroform tamamen uçurulmuştur. Kloroformun uçurulmasıyla ekstrakte olan PHB kristalleşmesi sağlanmış ve üzerine 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilerek ve 100 °C'deki su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler soğuduktan sonra 235 nm dalga boyunda daha önceden laboratuvarımızda çizilen standart eğri grafiği kullanılarak spektrofotometrede H₂SO₄ körüne karşı absorbans değerleri okunmuştur.

3.2.3.1 Seçilen İzolat ile Box Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları

Yapılan tarama çalışması sonunda seçilen Ç2-4 izolatı ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak karbon kaynağı (g/L), inkübasyon sıcaklığı (°C) ve inkübasyon süresi olmak üzere 3 faktörün 3 düzeyi çalışılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 3 Box-Behnken deney tasarım yöntemi deney setleri

		Factor 1	Factor 2	Factor 3
Std	Run	A:Karbon kaynagi miktarı (g/L)	B:inkübasyon sıcaklığı (°C)	C:inkübasyon suresi(gün)
1	10	10	35	4
2	6	50	35	4
3	12	10	75	4
4	8	50	75	4
5	17	10	55	2
6	7	50	55	2
7	14	10	55	6
8	15	50	55	6
9	2	30	35	2
10	11	30	75	2
11	1	30	35	6
12	5	30	75	6
13	9	30	55	4
14	16	30	55	4
15	4	30	55	4
16	3	30	55	4
17	13	30	55	4

3.2.3.2 Elde edilen PHB'nin karakterizasyonu

i) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi

Sıvı proton (^1H) NMR analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversite'si Merkezi Laboratuvar'ında bulunan JEOL ECZ 500R cihazında gerçekleştirilmiştir.

ii) Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) spektroskopisi analizi

PHB örneği potasyum bromür (KBr) ile %1 oranında karıştırılarak (1 mg PHB örneği ve 100 mg KBr) preslenmiş ve disk haline getirilmiştir. Diskin FTIR spektrumu 400-4000 cm^{-1} bölgesinde alınmıştır. FTIR spektroskopisi Bruker Optics IFS66v/s FTIR spektrometresi kullanılarak yapılmıştır.

iii) Viskozite ve yoğunluk analizi

PHB'nin yoğunluk ve viskozite ölçümleri 20 °C sıcaklıkta Anton Paar DMA-4500 yoğunluk ölçer ve Anton Paar AMVn Viskometre (AMVn-HT Versiyon) kullanılarak yapılmıştır. Viskozite ölçümleri düşen bilye prensibi kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerde iç çapı 1,6 mm olan cam kapiler ve çapı 1,5 mm olan çelik bilyeler kullanılmıştır. Ölçümler 70 derecelik açıyla yapılarak dörder kez tekrarlanmıştır.

iv) Termogravimetrik analiz (TGA)

TG/DTA Cihazı ile malzemelerin sıcaklığa bağlı olarak kütle değişimleri, aktivasyon enerjileri, kristalleşme sıcaklıkları, camsı geçiş sıcaklıkları, erime ve kaynama sıcaklıkları, öz ısı, reaksiyon kinetiği, ısıl kararlılık gibi termal özellikleri incelenebilmektedir. 10 mg ağırlığındaki PHB 10 °C/dk hızla ısıtılmış ve izotermal olarak 600 °C sıcaklığında, 50 cm^3/dk akış hızında azot gazı ve kuru hava karışımına maruz bırakılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklem Yerleri ve Alman Sıcak Su Örneklerinin Metal Analizleri

Çalışılan örneklem yerleri Çizelge 4.1’de koordinatları ve bazı özellikleri ile birlikte belirtilmiştir. Ayrıca su örneklerinin belli dönemlere ait metal analizleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4. 1 Çalışılan örneklem yerlerinin bazı özellikleri

Örneklem Noktası	N (Kuzey)	E (Doğu)	pH	Kaynaktan çıkış noktasının ortam sıcaklığı (°C)
Çitgöl Kaplıcaları	N 39° 08. 093’	E28° 57.974’	8.54	162
Naşa kaplıcaları	N 39° 08. 641’	E28°57. 621’	8.35	80

Çizelge 4. 2 Çevresel örneklerin metal analizleri

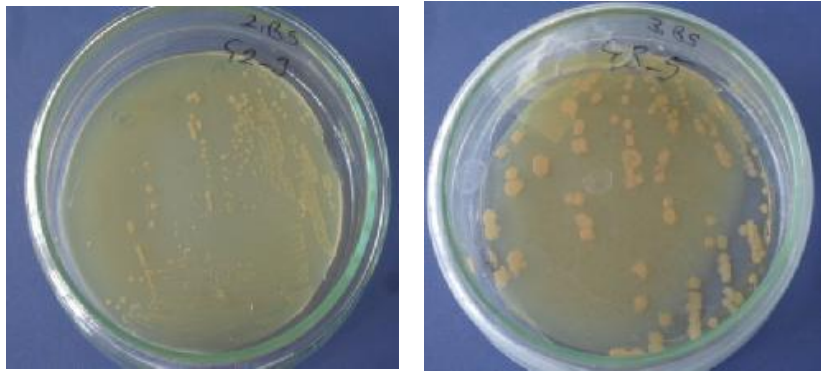
Elementler	Naşa Termal Kaplıcası (2011)	Çitgöl Termal Kaplıcası (2011)	Naşa Termal Kaplıcası (2012)	Çitgöl Termal Kaplıcası (2012)
	Konsantrasyon (mg/L)			
Fe	0,208	2,038	0,284	0,405
Al	0,0	0,0	0,0	0,0
Zn	0,0	0,0	0,0	0,0
Mg	27,80	9,140	13,05	5,23
Mo	0,019	0,058	0,005	0,033
Mn	NA	0,008	NA	0,039
Cr	0,0	0,0	0,0	0,0
Co	0,0	0,0	0,0	0,0
Cd	0,0	0.032	0,0	0,018
Cu	0,010	0,023	0,0	0,0
Ni	0,0	0,0	0,0	0,0
Pb	0,0	53,66	0,0	0,0
Ca	113,6	0,0	80,56	0,0
V	0,0	2,038	0,0	1,005

*NA:Not Available

4.2. Çevresel Su Örneklerinden Termofil Bakteri İzolasyonları

İzolasyon çalışmaları için kültüre bağlı klasik izolasyon yöntemleri ile kültürden bağımsız yöntemler eş zamanlı olarak yapılmıştır.

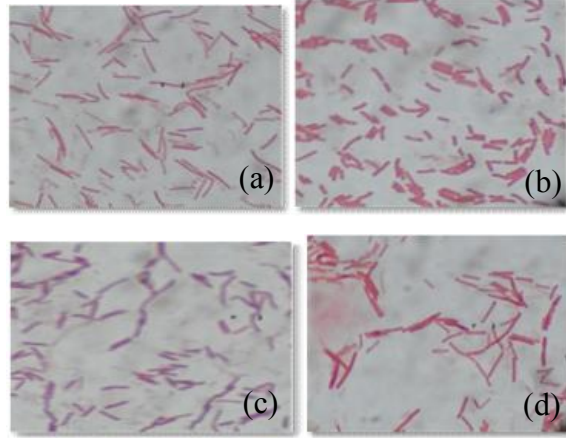
Tez kapsamında Kütahya Simav da bulunan koordinatları Çizelge 4.1’de verilen Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından Mayıs 2011 ve Ekim 2012 dönemlerinde alınan su örneklerinin mikrobiyal çeşitliliği kültüre bağlı ve kültürden bağımsız olarak çalışılmıştır. Alınan su örnekleri laboratuvara sıcaklıklarını koruması açısından termosla aynı zamanda steril şişeler ile +4 °C’de muhafaza edilerek 2 şekilde getirilmiştir. Çitgöl Termal Kaplıcasının kaynaktan çıkış sıcaklığı 162 °C ve Naşa Termal kaplıcasının ise 80 °C suyun alındığı andaki sıcaklıkları sırasıyla 80 °C ve 65 °C olarak ölçülmüştür. Laboratuvara getirilen su örneklerinden bölüm 3.1.3’te içerikleri verilen nutrient broth, maya özütü ortamı, Thermus ATCC 697 ve thermus medium hazırlanarak sulardan 5’er ml ekim yapılarak 70 °C’de su banyosunda 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve zenginleştirilmeye çalışılmıştır. 15 gün sonunda seri dilüsyonlar hazırlanarak yayma plaka yöntemi ile ekimleri yapılmış hergün petrilerin kontrolü sağlanmış, koloniler tek koloni düşürme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Şekil 4.1’de bazı izolatların petri görüntüleri verilmiştir. İzolatların saflıkları gram boyama yöntemi ile kontrol edilmiştir.



(a)

(b)

Şekil 4. 1 Bazı izolatların petri görüntüleri (a) Ç2-3 kodlu izolat (b) Ç3-5 kodlu izolat



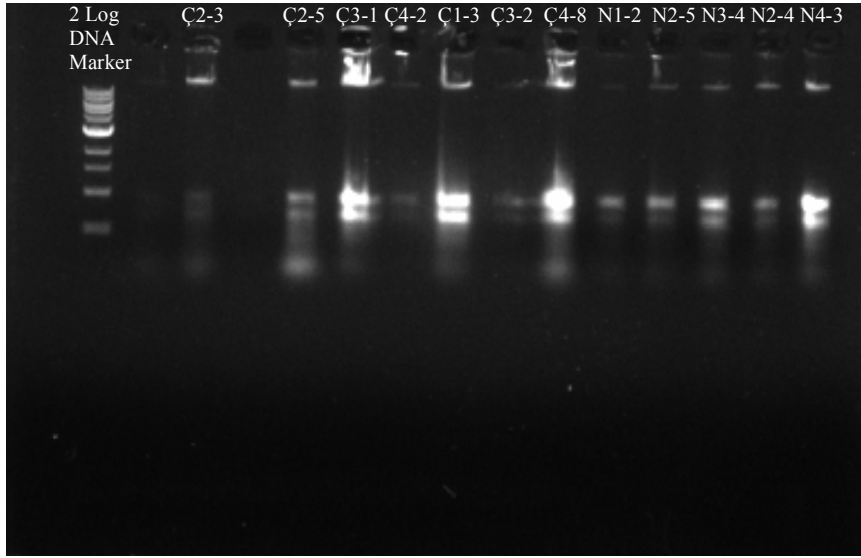
Şekil 4. 2 Bazı izolatların gram boyama görüntüleri

Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 yılında alınan su örneklerinden 17 adet izolat Ekim 2012 tarihli su örneklerinden 22 adet izolat elde edilmiştir. Naşa Termal Kaplıcasından Mayıs 2011’ de alınan su örneğinden 14 izolat Ekim 2012’de alınan su örneğinden ise 16 izolat izole edilmiştir. Yapılan gram boyamalar sonunda gram değişkenlikler gözlemlenmiş ve tüm izolatların basil formunda olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.2’de bazı izolatların gram boyama görüntüleri verilmiştir.

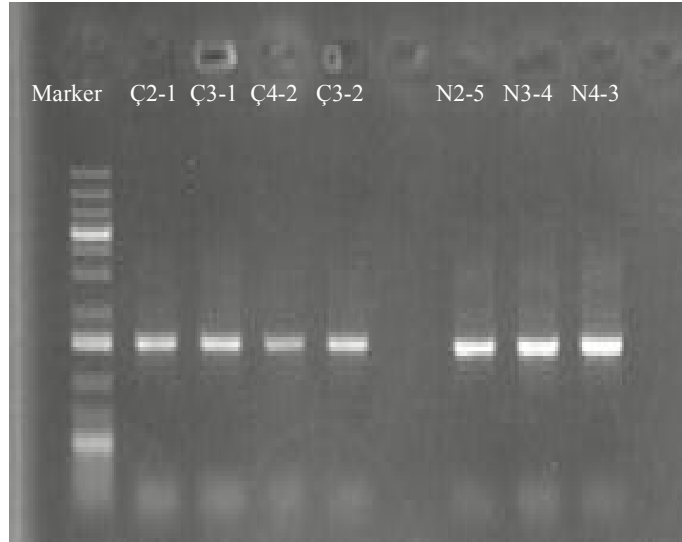
4.3. Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri

4.3.1. İzolatların moleküler identifikasyonu

Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcalarından alınan su örneklerinden izole edilen toplam 69 izolatın moleküler olarak identifikasyonları için Bölüm 3.2.2.1’ de anlatıldığı gibi DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Bakteriler için 27F-1387R ve arkeler için 20 F-915 R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR işlemi ile 16S rRNA geninin çoğaltılmasını takiben bakteri primerleri ile kurulan rekasiyonlar çalışmıştır. PCR ürünlerinin %0.1’lik agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen jel fotoğrafında yaklaşık 1350 bazlık ürün veren jel görüntüsü Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3 Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından izole edilen bazı izolatların genomik DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jelde görüntüleri

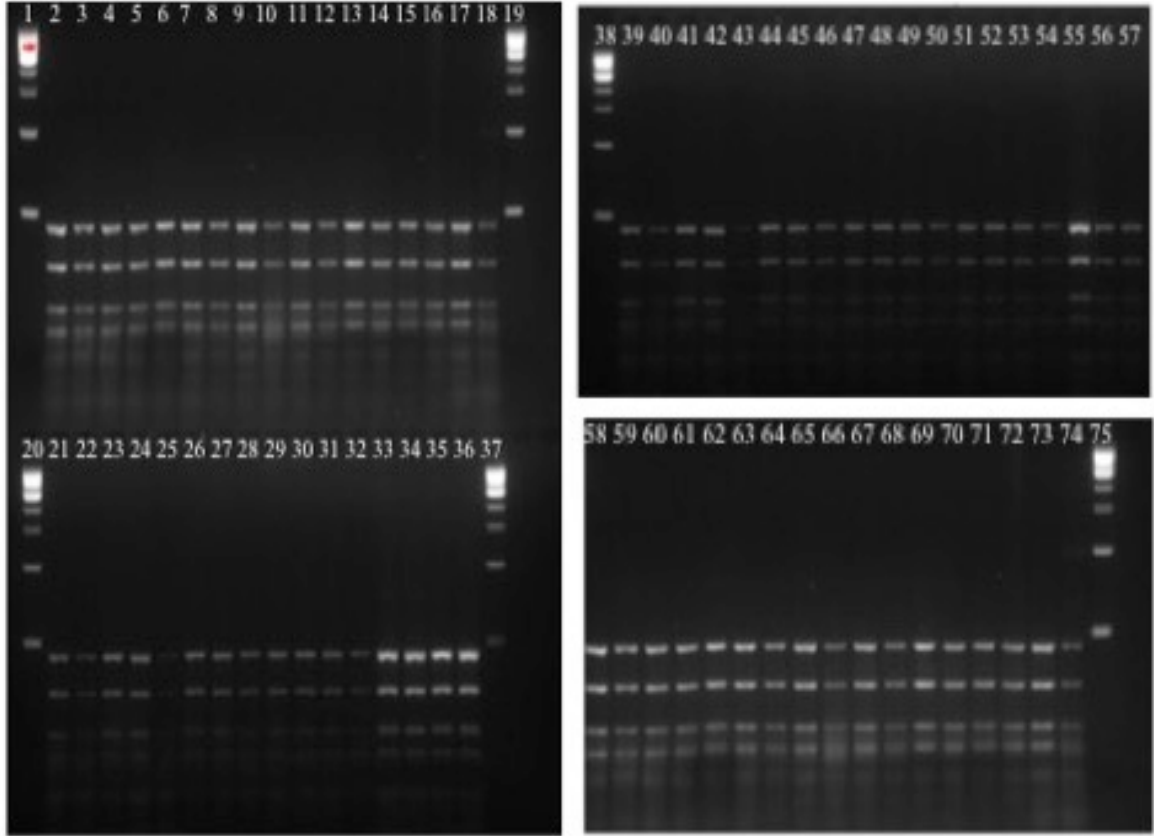


Şekil 4. 4 Bazı izolatların 16S rRNA gen amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü

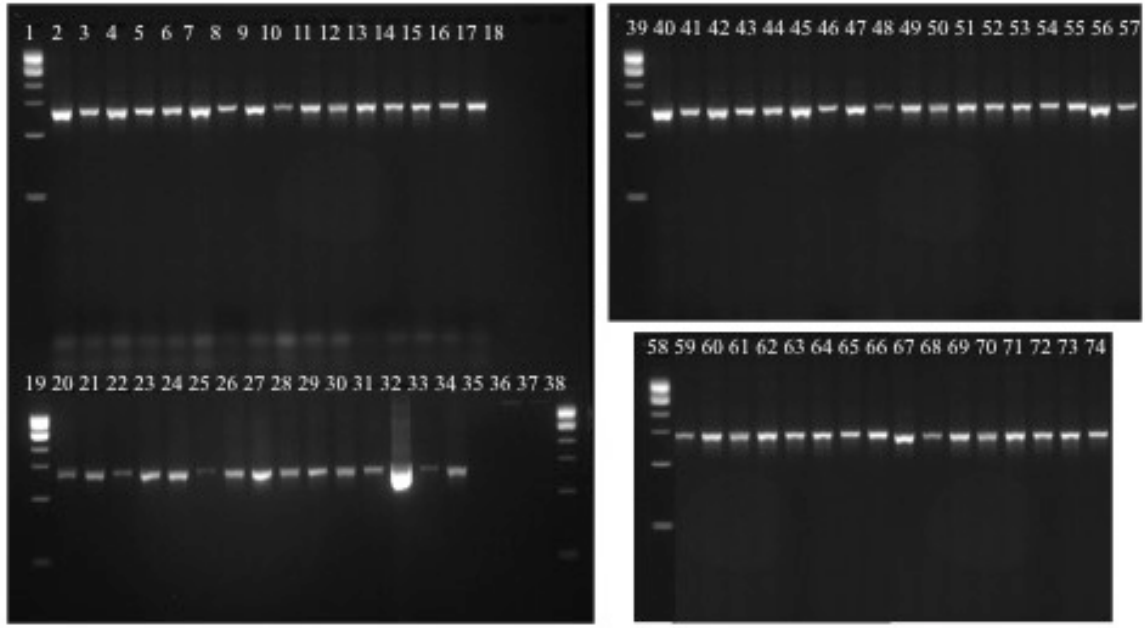
İzolatların restriksiyon analizleri için 16S rRNA ürünleri Mbo I, Hinf I (New England Biolabs Cat no R01555) ve Hae III (New England Biolabs Cat no R0147S) enzimleri kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.1' de verilen yöntem uygulanmıştır. Mbo I (Şekil 4.5) ve Hae III kullanılarak yapılan restriksiyon analizinde herhangi bir çeşitlilik gözlemlenememiştir (Şekil 4.6). Hinf I ile yapılan restriksiyon analizinde ise farklı kesim

profilleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Farklı kesim profili elde edilen izolatlardan temsili örnekler seçilerek dizi analizine gönderilmiştir. İzolatların dizi analizi sonrası gen analizleri NCBI veritabanındaki BLAST programı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen eş türler Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’te verilmiştir.

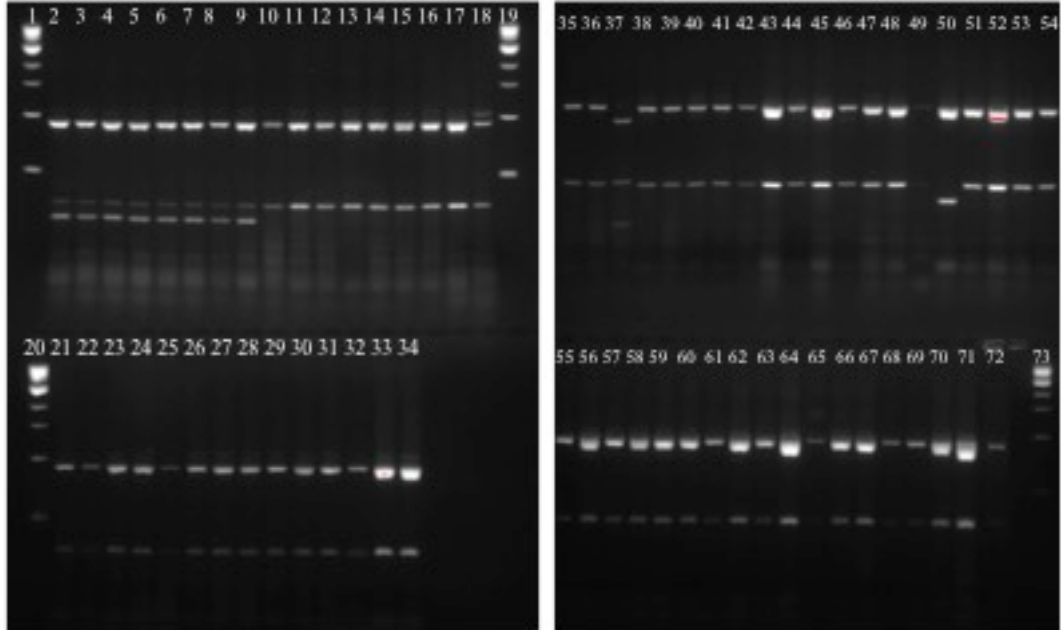
Literatüre göre Alu I *Geobacillus* türleri arasında farklılığın belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir restriksiyon enzimidir (Nazina vd, 2001; Blanck vd, 1997). Aynı zamanda Cfo ve Hae III restriksiyon enziminin kullanıldığı yayınlarda mevcuttur (Kuisiene vd, 1991). Fakat Kuisiene vd’nin 2007 yılında *Geobacillus stearothermophilus*’un Alu I ile tanımlanması ile ilgili bir çalışma yapmıştır. *Geobacillus stearothermophilus*’un farklı suşları ve *Geobacillus* cinsine ait 14 farklı türün Alu I enzimi ile ADRA’sını yapmış kesim profilleri arasında *Geobacillus stearothermophilus* haricinde diğer türler arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir. Çalışma sonunda *Geobacillus* türleri arasında *Geobacillus stearothermophilus* için Alu I enziminin ayırt edici bir kesim enzimi olabileceği rapor edilmiştir. Tez kapsamında yapılan ARDRA çalışmasında Hinf I enzimi ile farklı kesim profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 5 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Hae III restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri (1, 19, 20, 37, 38, 75:marker; sırasıyla 2-18 Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç3-7, Ç1-2, Ç1-3; sırasıyla 21-34 Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; N2-1,N2-2, N2-3, N2-4, N2-5, N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N1-1, N1-3; sırasıya 35-58 Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç4-1, Ç4-2, Ç4-3, Ç4-4, Ç4-5, Ç4-6, Ç4-7, Ç4-8; sırasıyla 59-74 Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N3-8, N3-9, N4-1, N4-2, N4-3, N4-4, N4-5, N4-6, N4-7)



Şekil 4. 6 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Mbo I restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri (1, 19, 38, 39, 58: marker; sırasıyla 2-18 Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç3-7, Ç1-2, Ç1-3; sırasıyla 20-33 Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; N2-1, N2-2, N2-3, N2-4, N2-5, N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N1-1, N1-3; sırasıyla 34-57 Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç4-1, Ç4-2, Ç4-3, Ç4-4, Ç4-5, Ç4-6, Ç4-7, Ç4-8; sırasıyla 59-74 Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N3-8, N3-9, N4-1, N4-2, N4-3, N4-4, N4-5, N4-6, N4-7)



Şekil 4. 7 İzolatların 16S rDNA ürünlerinin Hinfi I restriksiyon enzimi kesimi sonrası jel görüntüleri (1, 19,20 ve 73: marker; sırasıyla 2-18 Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç3-7, Ç1-2, Ç1-3; sırasıyla 21-34 Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 izolatları; N2-1,N2-2, N2-3, N2-4, N2-5, N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N1-1, N1-3; sırasıya 35-56 Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: Ç2-1, Ç2-2, Ç2-3, Ç2-4, Ç2-5, Ç2-6, Ç2-7, Ç2-8, Ç3-1, Ç3-2, Ç3-3, Ç3-4, Ç3-5, Ç3-6, Ç4-1, Ç4-2, Ç4-3, Ç4-4, Ç4-5, Ç4-6, Ç4-7, Ç4-8; sırasıyla 57-72 Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 izolatları: N3-1, N3-2, N3-3, N3-4, N3-5, N3-6, N3-7, N3-8, N3-9, N4-1, N4-2, N4-3, N4-4, N4-5, N4-6, N4-7)

Elde edilen kesim profillerine göre Çitgöl Termal kaplıcasından Mayıs 2011 yılında alınan sudan 3 farklı tür izole edildiği belirlenmiştir. Yapılan blast sonuçlarına göre temsili olarak seçilen Ç2-1, Ç1-3 ve Ç3-4 kodlu izolatlar sırasıyla %100 benzerlik oranı ile *Geobacillus subterraneus strain FZWP-19*, % 99 benzerlik oranı ile *Geobacillus stearothermophilus strain D2-3-3-1* ve %100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoleovarans CCB_US3_UF5 strain CCB_US3_UF5* olarak adlandırılmıştır (Çizelge 4.3). Naşa Termal Kaplıcasında (Mayıs 2011) ise 1 farklı tür izole edildiği belirlenmiştir. Temsili olarak seçilen N2-5 kodlu izolat % 100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoleovarans CCB_US3_UF5 strain CCB_US3_UF5* eşleşmiştir. Ekim 2012’ de Çitgöl Termal Kaplıcasından alınan su örneğinden 4 tane farklı tür, Naşa Termal Kaplıcasından ise 2 farklı tür izole edilmiştir. Temsili olarak seçilen Ç4-1, Ç2-3, Ç4-2, Ç3-2, Ç3-1 sırasıyla %98 benzerlik oranı ile. *Geobacillus sp. Strain N7*, % 99 benzerlik oranı ile *Thermus thermophilus SG0.5JP17-16*, %99 benzerlik oranı ile *Geobacillus kaustophilus strain NBRC 102445* ve %100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoleovarans CCB_US3_UF5 strain CCB_US3_UF5* ve % 100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoparaaffinivorans strain TH1* olarak adlandırılmıştır (Çizelge 4.4). Naşa Termal Kaplıcasından seçilen temsili izolatlar olan N4-5 ve N4-6 % 100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoparaaffinivorans strain TH1*, N2-3 ise % 100 benzerlik oranı ile *Geobacillus thermoleovarans CCB_US3_UF5 strain CCB_US3_UF5* ile eşleşmiştir. Laboratuvara termos ve +4 °C’de getirilen örneklerdeki çeşitliliğin belirlenmesi için yapılan kültüre bağımlı çalışmalarda herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. İzole edilen türlerin *Bacillus* genusundan yeni ayrılan *Geobacillus* genusu üyeleri olduğu görülmüştür. İlk termofilik *Bacillus*’un 1888’de Miquel tarafından 70 °C de, Paris Seine nehrinden izole edildiği bildirilmiş, sonraki 30-40 yıl içinde toprak, lağım ve besinlerden yaklaşık 60 °C’de yaşayabilen basiller izole edilmiş, 1920’li yıllardan sonra geçen 20 yıl içinde çok sayıda yeni termofilik basil türü tanımlanmıştır (Sharp vd. 1991). *Bacillus stearothermophilus* orijinal suşu ise 1920’de Donk tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlanan bu suş kaybolmasına rağmen Gordon ve Smith daha sonra yaptıkları çalışmalarda bu suşu, obligat termofilik suşlara referans olarak kabul etmişler ve *B. stearothermophilus*’un en önemli özellikleri arasında 37-70 °C’de büyüme, nişastayı hidroliz edebilme, %3 NaCl toleransı gösterme, olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan pek çok karakteristik özellik araştırmasından sonra da, *B. stearothermophilus*’un, Bergeys Manuel sekizinci baskısında yerini aldığı bildirilmiştir (Sharp vd., 1991). Nazina vd. (2001) Rusya, Çin ve Kazakistan’dan petrol

alanlarında oluşmuş sulardan almış olduğu örneklerden 16S rRNA ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarını yapmışlar ve bu izolatları yeni bir cins içindeki iki farklı tür olarak isimlendirmişlerdir (*Geobacillus uzenensis*, ve *Geobacillus subteraneus*). Önceden *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasis* ve *Bacillus thermodenitrificans* olarak bilinen türlerinde bu yeni cinse dahil edilmesini önermişlerdir. Nazina vd.'ne göre *Geobacillus* genusuna ait türlerin vejetatif hücreleri çubuk şeklindedir. Hücreler tekli veya kısa zincirler halinde bulunmakta ve peritrik flagellaya sahiplerdir. Hücre duvar yapısı Gram (+) olmakla birlikte gram değişkenlik gösterebilmektedirler. Elips ya da silindirik endosporları şişkin veya şişkin olmayan bir şekilde bulunmaktadır ve hücrede terminal ya da subterminal olarak konumlanmaktadır. Koloni morfolojisi olarak çeşitli şekil ve büyüklüklere sahiplerdir ve üretildikleri ortama göre pigment üretebilmektedirler. Aerobik veya fakültatif anaerobiktirler. Son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanırlar fakat bazı türlerinde nitrat son elektron alıcısı olarak bulunabilmektedir. Kemoorganotrofturlar. pH 6.0-8.5 aralığında gelişebilmektedirler ve optimum gelişme pH aralığı 6.2-7.5'tur. Zorunlu termofiliklerdir, Geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilme yeteneğine sahipleridir (35-75 °C). Optimum gelişme sıcaklığı ise 55-65 °C'dir. Birçok tür büyüme faktörleri, vitaminler, sodyum klorür ve potasyum klorüre ihtiyaç duymamaktadır. Glukoz, fruktoz, maltoz, mannoz ve sükrozu kullanabilirler ve bu karbon kaynaklarından asit oluşturabilmektedirler fakat gaz oluşumu yoktur. Birçok türü ise laktozdan asit oluşturmamaktadır. Genus üyelerinin 16S rRNA gen dizisi benzerlik oranı % 96,5 'den fazla olan ve doğada yaygın olarak bulunan bir genus olarak belirtmişlerdir (Nazina vd. 2001).

Çizelge 4. 3 Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 ARDRA sorası temsili seçilen izolatların gen bankasındaki karşılıkları

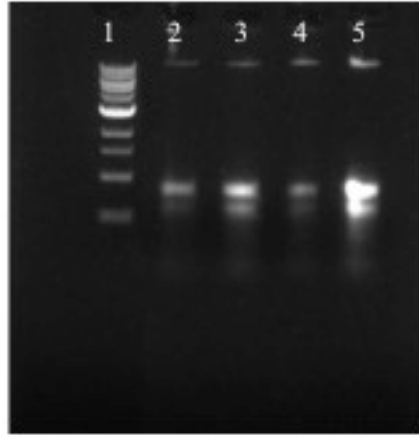
İZOLAT KODU	TANIMLANAN TÜR	BENZERLİK
Ç2-1	<i>Geobacillus subterraneus</i> strain FZWP-19	%100
Ç1-3	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain D2-3-3-1	%99
N2-5	<i>Geobacillus thermoleovarans</i> CCB_US3_UF5 strain CCB US3 UF5	%100

Çizelge 4. 4 Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 ARDRA sorası temsili seçilen izolatların gen bankasındaki karşılıkları

İZOLAT KODU	TANIMLANAN TÜR	BENZERLİK
Ç4-1	<i>Geobacillus</i> sp. Strain N7	%98
Ç2-3	<i>Thermus thermophilus</i> SG0.5JP17-16	%99
Ç3-2	<i>Geobacillus thermoleovarans</i> CCB_US3_UF5 strain CCB US3 UF5	%100
Ç4-2	<i>Geobacillus kaustophilus</i> strain NBRC 102445	%99
N4-5	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain TH1	%100
N4-6	<i>Geobacillus thermoleovarans</i> CCB_US3_UF5 strain CCB US3 UF5	%100
Ç3-1	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain TH1	%100

4.3.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri

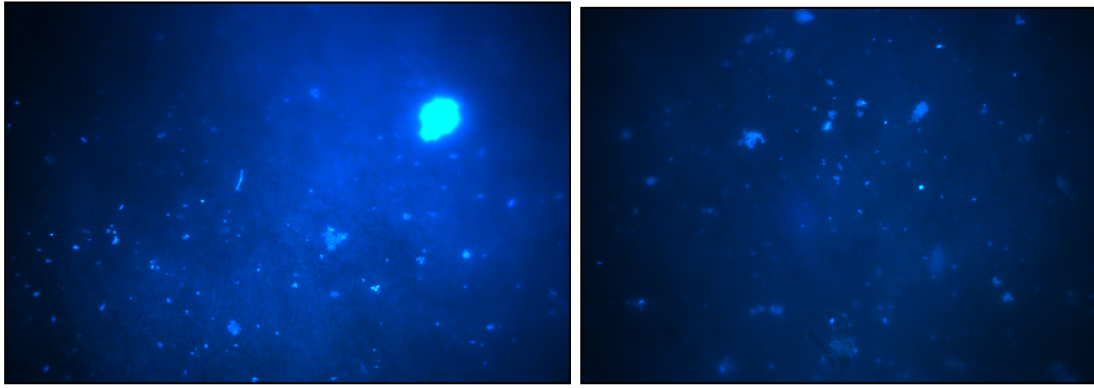
Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından farklı zamanlarda (Mayıs 2011 ve Ekim 2012) alınan su örneklerinden 3'er litreleri filtre edilmiş ve total DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.1' de anlatıldığı gibi fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve %1'lik jeldeki görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir.



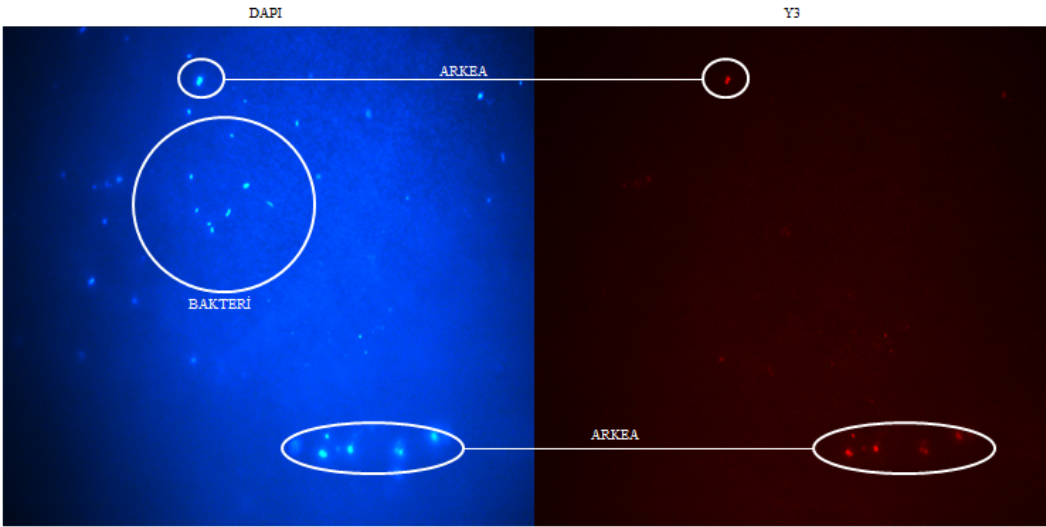
Şekil 4. 8 Çevresel su örneklerinin total DNA ekstraksiyonu sonrası jel görüntüsü (1- marker, 2- Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011, 3-Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011, 4- Termal Kaplıcası Ekim 2012, 5- Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012)

4.3.2.1. Floresan in situ hibridizasyon

FISH mikroskopik sayıma dayalı sonuç veren kültürden bağımsız yöntemlerden birisidir. FISH ile fikse edilmiş ve spesifik problemlarla hibritlenmiş mikrobiyal hücreler; epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu ile görselleştirilebilir. Mikroorganizmaların hücrelerine zarar vermeden rRNA'larını hedef alan floresan boyalı oligonükleotidler kullanılarak izlenmesine dayalı bir tekniktir. rRNA hedefli nükleik asit problemlerinin metabolik olarak aktif hücrelerin tanımlanması, önemli popülasyonların morfolojilerinin belirlenmesi, filogenetik olarak tanımlanması ve kantitatif analizlerinin yapılmasına olanak sağlaması FISH tekniğinin önemli avantajları arasında sayılabilir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotidlerin türlere özgünlüğünün kontrol edilebilmesi de FISH tekniği ile sağlanabilmektedir. Farklı floresan boyalar ile işaretlenmiş oligonükleotidler kullanıldığı takdirde FISH tekniği ile mikroorganizma dağılımı miktarsal olarak tespit edilebilmekte, ayrıca işlevsel etkileşimde bulunan mikroorganizmalar, konumsal olarak da incelenebilmektedir (Moter ve Globel, 2000). Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından alınan Mayıs 2011 ayı örneklerine Bacteria sayımını gerçekleştirmek için Eub338, Archaea sayımını gerçekleştirmek için Arc915 problemleri uygulanmıştır. İzleyen metinde bu problemlere ait floresan mikroskop görüntüleri ile DAPI boyamaları verilmiştir (Şekil 4.9 a, b). Ekim 2012 ayı FISH ve DAPI boyamalarında çeşitli sorunlar ile karşılaşmıştır. Prob miktarı, hibridizasyon süresi, DAPI boya miktarı ve yıkama solüsyonları ile ilgili olarak optimizasyon çalışmaları yapılmış fakat istenilen görüntü elde edilememiştir.



(a)

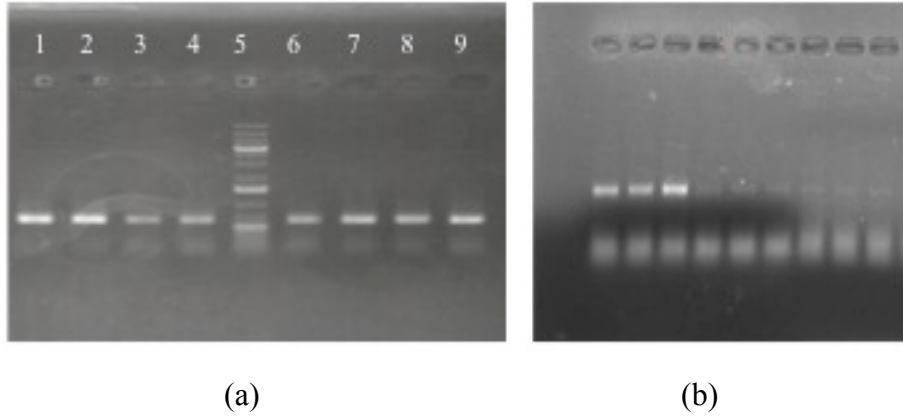


(b)

Şekil 4. 9 Çevresel Su örneklerinin DAPI ve FISH görüntüleri (a) Çitgöl Termal Kaplıcası (b) Naşa Termal Kaplıcası

4.3.2.2. Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE)

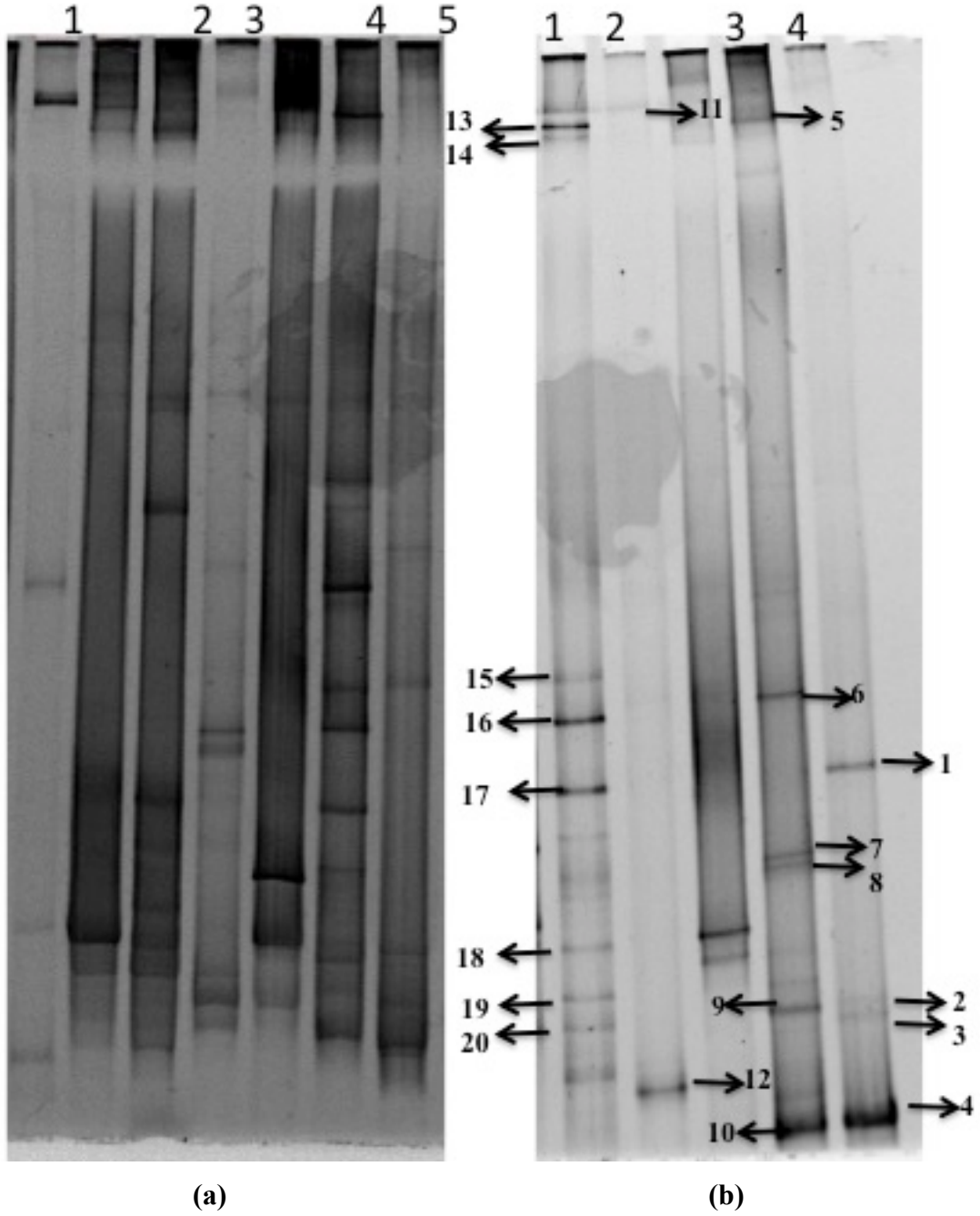
Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından alınan Mayıs 2011 ve Ekim 2012 ayı çevresel örneklerinden DGGE analizinin gerçekleştirilmesi için her iki örnekten elde edilen ortalama 500 bazlık 16S PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.10). 400-500 ng olacak şekilde DGGE jeline yüklenecek PCR ürün miktarı elde edildikten sonra denatüre edici gradient jel elektroforez sistemi hazırlanarak örneklerdeki popülasyonların çeşitlilikleri jel profilleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4. 10 Çevresel su örneklerinin DGGE PCR ürünlerinin jel görüntüsü ((a) 1,2- Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE ürünleri; 3,4- Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE PCR ürünleri ; 5-Marker, 6,7- Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE PCR ürünleri, 8,9- NaşaTermal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE PCR ürünleri; (b) NaşaTermal Kaplıcası Ekim 2012 arke DGGE PCR ürünleri)

Mikrobiyal çeşitliliğin kültürden bağımsız olarak belirlenmesi için ikinci yöntem olarak DGGE çalışılmıştır. Muyzer ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bir yöntem olan DGGE, mikrobiyal ekolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. DGGE aynı boyuttaki farklı nükleik asit dizilerinin, jel üzerinde hareketi temeline dayanır. Yani, farklı rRNA dizileri, elektroforez üzerinde kendine özel farklı denatüre bölgelerinde erimeye başlar ve belirli bir bölgede durur. Bu yöntemin önemli bir avantajı, jelden bantların kesilerek komüniteyi oluşturan üyelerin dizilenmesine olanak vermesidir (Muyzer 1999). Yöntemin dezavantajları ise 550 baz gibi kısa DNA fragmentlerinin ayrımını gerçekleştirebilmesidir. Aynı zamanda primerlerin bozulmasıyla ya da heterodupleks moleküllerin varlığıyla oluşan çift bantlar, birbirine yakın bantların her zaman reel bant olmaması bu tayini zorlaştırabilmektedir (Muyzer 1999). Aynı zamanda DGGE farklı ortam özellikleri doğrultusundaki komünite yapılarındaki değişikli incelemede iyi bir yöntem olmasına rağmen, örnekteki toplam hücrelerin %0.5-1'inin dizilerinin edilebilirliğini sağlamaktadır (Benlloch vd., 2012). Bu tez çalışmasında Naşa ve Çitgöl Termal kaplıcalarından alınan su örneklerinin toplam DNA'larından bakteriler için GC kuyruklu 341F-907R, arkeler için ise GC kuyruklu 344F-907 evrensel primerler kullanılmıştır. 2014 yılında yapılan DGGE profili ile 2015 yılında yapılan DGGE profilleri arasında su örneklerindeki bant sayıları arasında fark olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda Naşa Termal Kaplıcasından Ekim 2012'de alınan su örneğinde arke olduğu tespit edilmiştir ve 4 farklı bant gözlemlenmiştir. Fakat rePCR'ları çalıştırılmadığı için tanımlanmaya yollanamamıştır. rePCR'ların

çalışmama nedeninin jelden ekstraksiyon aşamasında başarı sağlanamadığı olarak belirlenmiştir. Kesilen jellerden DNA ekstraksiyonu için bandlar +4 °C’de 1 gece moleküler grade su içerisinde bekletilmiş, başka bir yöntem olarak jelden ekstraksiyon kiti kullanılmış fakat rePCR’ları çalıştırılmamıştır. Son olarak bölüm 3.1.4.2’de verilen çözücü buffer kullanılarak bölüm 3.2.2.2’de verilen yöntem ile jelden ekstraksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve rePCR’ları ortama bovine serum albümin ilavesi ile çalıştırılmıştır. Buna rağmen bazı dizi analizi okumalarında sonuç alınamamıştır. Bunun nedeninin ise DGGE jelinden bantlar kesilirken UV’den etkilenmiş olabileceği ya da bir diğer neden olarak jelden ekstraksiyon aşamasında yeterince geri kazanım sağlanamamış olması düşünülmüştür. Şekil 4.11 (a) ve (b) de verilen farklı zamanlarda yapılan DGGE profilleri karşılaştırıldığında tür çeşitliliği açısından farklılık görülmesinin nedeni çevresel suda bulunan türlerin sayılarının azlığı olarak düşünülmektedir. PCR’ın bilindiği üzere amplifikasyon sırasında bazı kısıtlamaları mevcuttur ve bu nedenle tür zenginliğinin kesin göstergeleri olarak kullanılamamaktadır. PCR’a dayanan “parmak izi” teknikleri sadece en bol bulunan türleri ortaya koyduğu için bu tür farklılıklar gözlemlenebilmektedir (Ovreaş vd., 2003). Özellikle ekstrem çevreler mikroorganizma düzeyinde düşük çeşitlilik gösterdiği için DGGE profillerinde bu farklılığın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bazı bantların birbirine yakınlığı göz önünde bulundurulduğunda daha dar bir denatürant aralığında da çalışılması gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 4. 11 Çevresel su örneklerinden yapılan DGGE analizi ve seçilen bantlar **(a)** (2014 yılında yapılan) 1-Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 arke DGGE bant profili, 2- Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE bant profili, 3- Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE bant profili, 4- Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE bant profili, 5-Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE bant profili; **(b)** (2015 yılında yapılan) 1- Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE bant profili, 2- Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE bant profili, 3- Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 bakteri DGGE bant profili, 4- Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 bakteri DGGE bant profili

Naşa Termal Kaplıcasından Mayıs 2011 yılında alınan su örneğinde 4 farklı DGGE profili elde edilmiştir. 4 numaralı bant olan *Streptosporangium* sp. NCCP-1213 türüne 16S klonlama çalışmalarında da rastlanmıştır (Çizelge 4.5). Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneğinin DGGE profilinde ise 6 farklı bant kesilmiştir. Blast analizinden sonra gen bankasındaki türlere benzerlik oranlarını düşük olmasına rağmen çoğunluğunun termal alanlardan elde edildiği görülmüştür. Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 su örneğinin DGGE profilinde 2 farklı bant gözlemlenmiş ve 11 nolu bant %100 benzerlik oranı ile kültüre edilemeyen *Tepidomonas* sp. Clone TPN8 ile eşleşmiştir (Çizelge 4.5). Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneğinde ise 8 farklı bant kesilmiş fakat 3 bantın dizi analizi sonuçlarından başarı elde edilememiştir. Aynı zamanda DGGE ile elde edilen profil ile 16S klon kütüphanesi sonuçlarının kısmen örtüştüğü görülmektedir. Fakat izole edilen türlere DGGE profilinde rastlanmamıştır. DGGE’nin denatürant aralığı değiştirildiğinde ya da farklı primer seti kullanıldığında gözlemlenebileceği düşünülmektedir. Munoz vd. 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada zenginleştirdiği çevresel örneğinin DGGE profilini çalışmıştır. 907R-358F GC kuyruklu primerleri kullanılarak elde ettiği PCR ürünlerini %20-80 denatürant aralığında çalışmış ve kontrol olarak *Geobacillus jurassicus* kullanmıştır. Elde edilen jel görüntüsünde jelin sonuna yakın bant verdiği gözlemlenmiştir. Wang vd.’nin (2008) yapmış olduğu çalışmada petrol rezervindeki mikrobiyal çeşitliliği DGGE kullanarak belirlemiştir. Çalışmada GC kuyruklu 341F-534R, GC kuyruklu 341F-907R ve 1055F-GC kuyruklu 1406R olmak üzere 3 farklı primer seti kullanarak %40-60 denatürant aralığı kullanılmıştır. 1055F-GC kuyruklu 1406R primer setinde Proteobacteria ve Bacilli grubundan *Bacillus licheniformis* and *Geobacillus* sp.’ye rastlanıldığı rapor edilmiştir. Kültüre bağlı tekniklerde su örnekleri zenginleştirme için 70 °C’de inkübasyona bırakıldığı için DGGE profilinde görülen ılımlı termofil olarak adlandırılan 40 °C’de gelişebilen türler izole edilememiştir.

Çizelge 4. 5 Çevresel su örneklerinden elde edilen DGGE bantlarının gen bankasındaki karşılıkları

DGGE Bant Numarası	Tanımlanan Tür	Benzerlik Oranı
1	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> clone OPPB187	%100
2	<i>Thermovum composti</i> partial 16S rRNA gene, isolate 16-2-VM-3	%92
3	Uncultured <i>Aquificaceae</i> bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: ST-B01-44	%95
4	<i>Streptosporangium</i> sp. NCCP-1213	%99
5	Uncultured <i>Hydrogenophaga</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone TPB_GMAT_150_21	%94
6	<i>Porphyrobacter</i> sp. SLCR_2 partial 16S rRNA gene, isolate SLCR_2	%88
7	Uncultured gamma <i>Proteobacterium</i> clone GASP-MB3S1_B02	%93
8	Uncultured <i>Rhizobiaceae</i> bacterium clone TDNP_Wbc97_42_3_189	%95
9	<i>Thermovum composti</i> partial 16S rRNA gene, isolate 16-2-VM-3	%92
10	<i>Streptosporangium</i> sp. NCCP-1213	%99
11	Uncultured <i>Tepidimonas</i> sp. clone TPN8	%100
12	-	
13	Uncultured <i>Hydrogenophaga</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone TPB_GMAT_150_21	%94
14	-	
15	-	
16	<i>Porphyrobacter</i> sp. SLCR_2 partial 16S rRNA gene, isolate SLCR_2	%88
17	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> clone OPPB187	%100
18	Uncultured <i>Methyloversatilis</i> sp. clone R1b_G2	%97
19	-	
20	<i>Thermovum composti</i> partial 16S rRNA gene, isolate 16-2-VM-3	%92

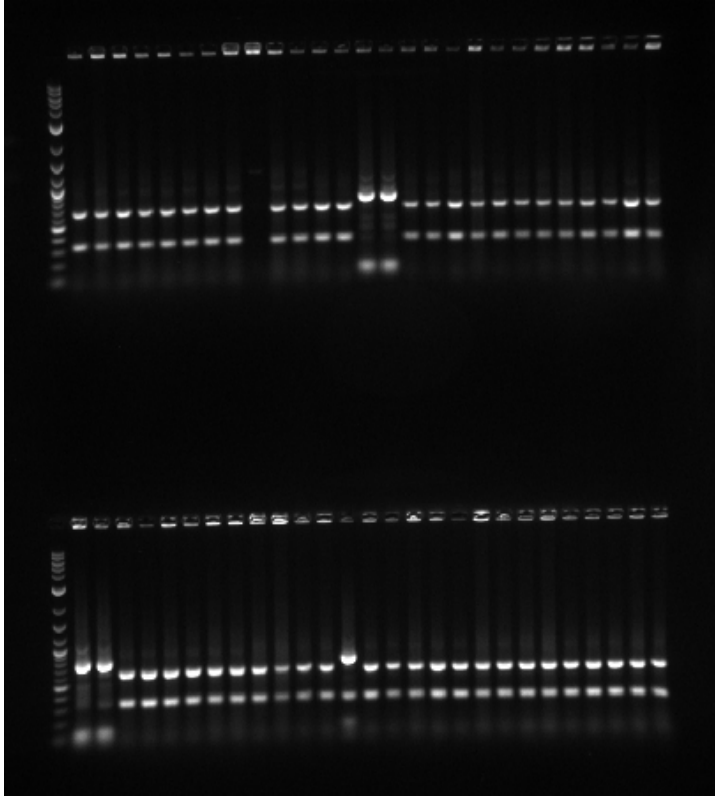
4.3.2.3. 16S Klonlama

Diğer bir kültürden bağımsız teknik olarak 16S klonlama PGEMT easy vektör sistemi kullanılarak yapılmıştır. 16S rRNA'nın nükleik asit ekstraksiyonu, DNA'nın, PCR reaksiyonu ile çoğaltması, ürünün saflaştırılması, uygun bir klonlama vektörüne (genelde plazmit) ligasyonu, konakçı bir bakteriye transformasyonu, plazmidin izolasyonu ve dizileme aşamalarından oluşan zaman alıcı, kantitatif olmayan ancak güvenilir bir yöntem olan 16S klonlama sayesinde elde edilen diziler, internetten erişimi mümkün olan bazı tarama sitelerindeki mevcut tür dizileri ile kıyaslanmaktadır (Madden et al., 1996). Klon kütüphanesi tekniği, çok hassas taksonomik çalışmalar yapmaya imkan vermektedir. Bu yöntemle, kültür edilmemiş ve henüz tanımlanmamış mikroorganizmaları tanımlamak da mümkündür (Sanz ve Kochling, 2007). Aynı zamanda DGGE yönteminin eksikliklerinden dolayı başka bir yöntem ile verilerin doğrulanması ve/veya daha fazla çeşitliliğe ulaşabilmek için 16S klonlama çalışması tez kapsamında Çitgöl ve Naşa Termal Kaplıcalarından alınan su örnekleri kullanılarak yapılmıştır. DNA, vektör konsantrasyonu 3:1 ve 2:1 olacak şekilde denemeler yapılmış ve 2:1 ile başarılı sonuç elde edilmiştir. Herbir su örneği için yaklaşık olarak 100 beyaz koloni seçilmiş ve kontrolü yapıldıktan sonra beyaz olarak kalan kolonilere koloni PCR uygulanmıştır.

i) Klonlara ait 16S rRNA geni amplifikasyonu ürünlerinin enzimatik kesimi (ARDRA)

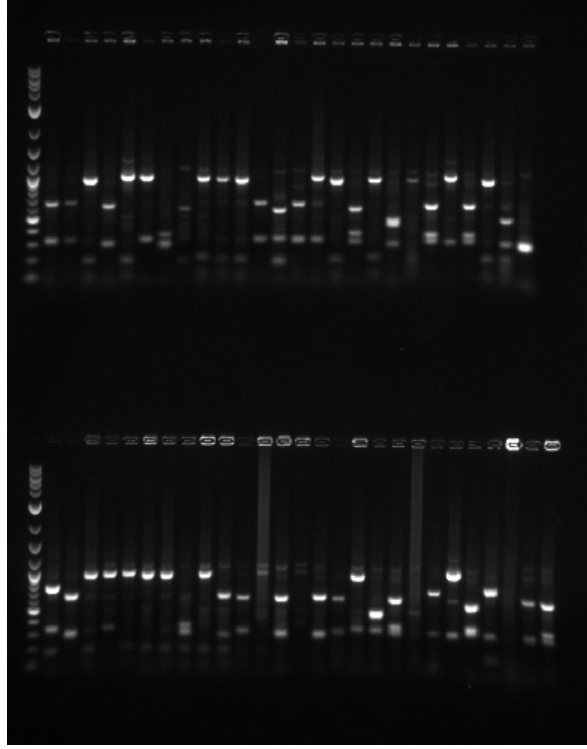
Klonlardaki 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için Hinf I enzimi kullanılmıştır. Restriksiyon kesimleri sonrası %2 lik agaroz jelle yüklenerek yürütülmüş olan jel görüntüleri Şekil 4.12-4.15'de verilmiştir.

Naşa Termal Kaplıcasın Mayıs 2011'de alınan su örneğinin 16S rRNA klonlama çalışması sonunda 54 klona yapılan ARDRA sonucunda 3 farklı kesim profili gözlemlenmiş (Şekil 4.12), temsili örnekler seçilerek plazmit izolasyonları yapılmış ve dizi analizine gönderilmiştir.

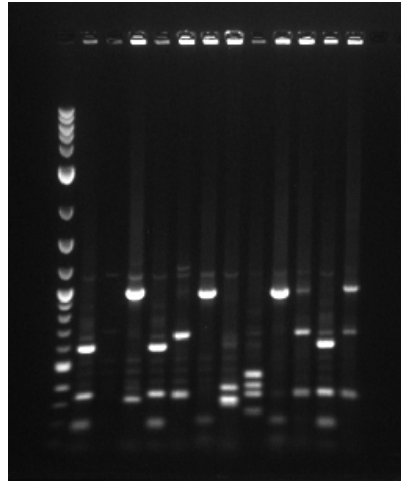


Şekil 4. 12 Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili (Üst sıra: marker, N1, N3, N4, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N16, N18, N36, N37, N38, N39, N41, N44, N46, N47, N48, N49, N50, N54, N55, N56, N57, N60, , alt sıra : marker, N61, N62, N63, N65, N66, N67, N69, N71, N72, N73, N74, N75, N78, N79, N80, N84, N85, N92, N93, N94, N97, N99, N100, N101, N102, N103, N104)

Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile 66 klona Hinf I enzimi ile yapılan restriksiyon analizi sonunda 13 farklı kesim profili gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



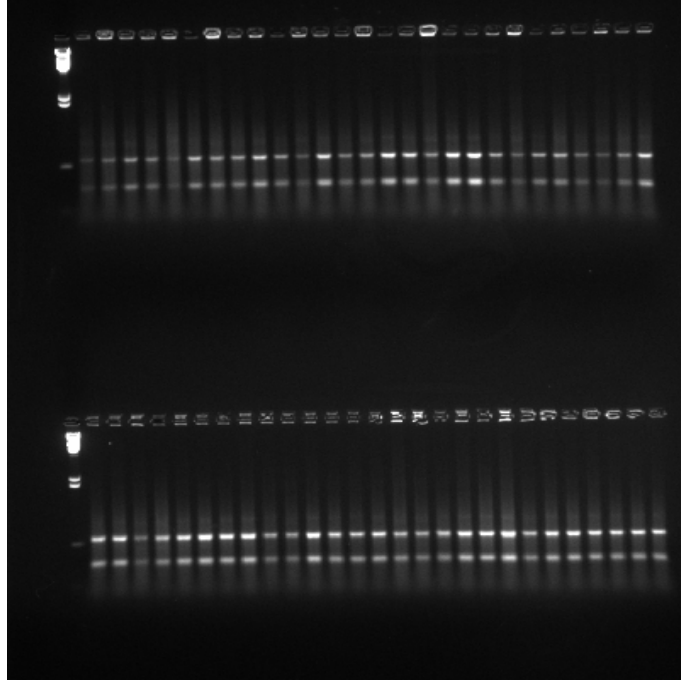
(a)



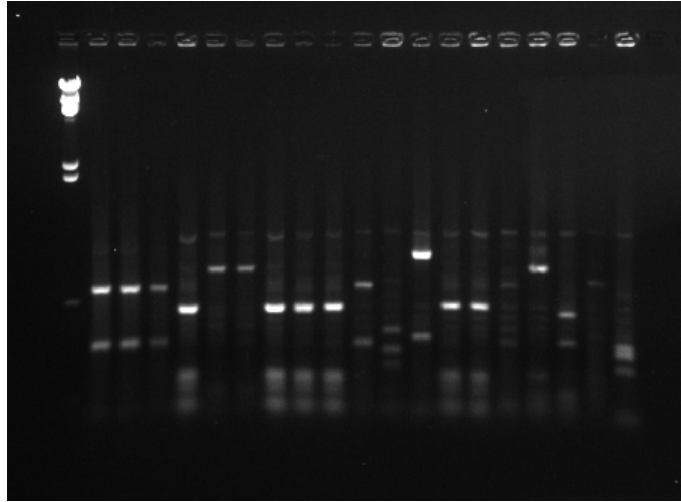
(b)

Şekil 4. 13 Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili (a) Üst sıra: Marker, N1, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N16, N17, N18, N19, N20, N22, N23, N24, N25, N26, N27, N28, N29, Alt sıra: Marker, N30, N31, N32, N33, N34, N35, N38, N39, N40, N41, N42, N43, N44, N45, N46, N47, N48, N49, N50, N51, N56, N57, N58, N59, N60, N61; (b) Marker, N62, N63, N64, N65, N66, N67, N68, N69, N70, N71, N72, N73)

Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011’de alınan su örneğinin 16S klonlama deney sonunda elde edilen 73 klona Hinf I restriksiyon enzimi ile ARDRA yapılmış ve 10 farklı kesim profili gözlemlenmiştir (Şekil 4.14)



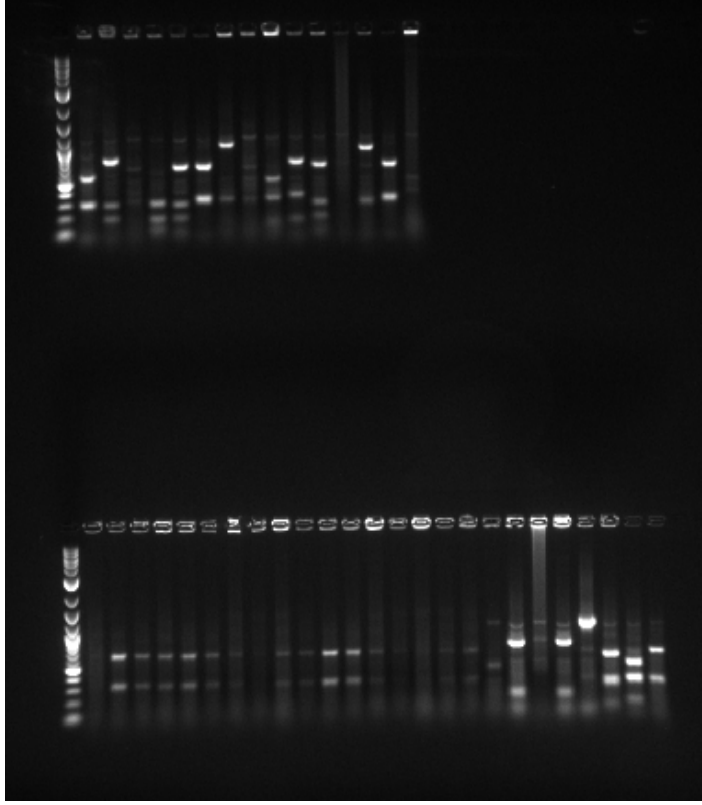
(a)



(b)

Şekil 4. 14 Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili (a) Üst sıra: marker, Ç1, Ç2, Ç3, Ç7, Ç8, Ç13, Ç14, Ç15, Ç16, Ç17, Ç18, Ç19, Ç20, Ç21, Ç23, Ç24, Ç25, Ç27, Ç28, Ç29, Ç31, Ç32, Ç33, Ç41, Ç43, Ç44, Ç47 Alt sıra: marker, Ç48, Ç49, Ç50, Ç51, Ç53, Ç54, Ç55, Ç56, Ç57, Ç58, Ç60, Ç61, Ç62, Ç63, Ç64, Ç65, Ç66, Ç68, Ç69, Ç71, Ç73, Ç75, Ç76, Ç78, Ç79, Ç80, Ç81 (b) Marker, Ç82, Ç84, Ç85, Ç4E, Ç7E, Ç9E, Ç10E, Ç19E, Ç28E, Ç29E, Ç31E, Ç32E, Ç37E, Ç38E, Ç39E, Ç47E, Ç53E, Ç69E, Ç73E)

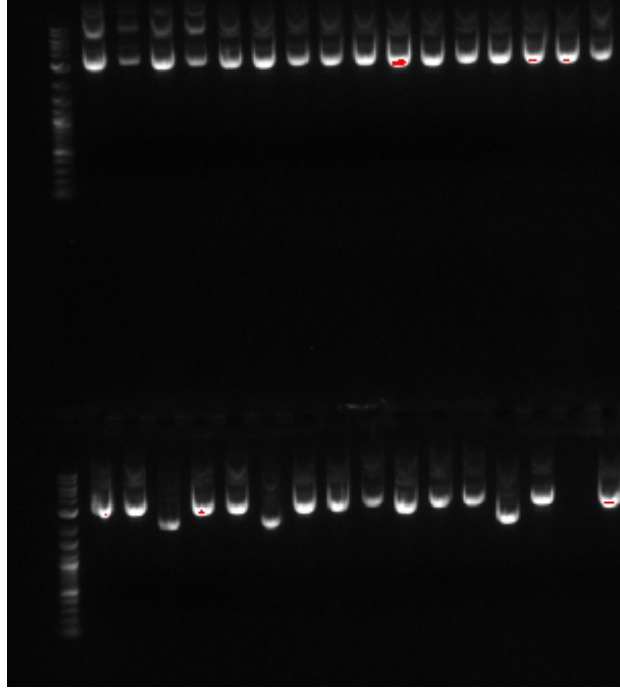
Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 su örneğinin 16S klonlama çalışması sonunda elde edilen 42 klona ARDRA yapılmış ve 9 farklı kesim profili belirlenmiştir.



Şekil 4. 15 Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012’de alınan su örneği bakteriyal çeşitliliğinin ARDRA profili (Üst sıra: marker, Ç2, Ç13, Ç17, Ç18, Ç20, Ç25, Ç26, Ç31, Ç36, Ç38, Ç41, Ç42, Ç47, Ç50, Ç55 Alt sıra: marker, Ç66, Ç68, Ç69, Ç70, Ç71, Ç72, Ç73, Ç74, Ç76, Ç77, Ç78, Ç79, Ç80, 82, Ç83, Ç85, Ç87, Ç19E, Ç19E, Ç23E, Ç26E, Ç32E, Ç51E, Ç57E, Ç77E)

ii) Klonlardan plazmit izolasyonu

Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarının bakteriyal çeşitliliğinin belirlenmesi için yapılan 16S klonlama çalışması sonrasında elde edilen ARDRA profillerine göre temsili örnekler seçilmiş ve plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit izolasyonu Fermantas Plazmit izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir. Ekstarksiyon sonrası ürünler %1'lik agoroz jelde gözlemlenmiştir (Şekil 4.16). plazmit örnekleri vektörün primerleri olan T7 ve SP6 ile dizi analizine gönderilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 16 Plazmit izolasyonu sonrası agoroz jel görüntüsü (Üst sıra: marker, Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011 klonları N1, N2,N3; Naşa Termal Kaplıcası Ekim 2012 klonları N3, N4, N5, N8, N9, N14, N15, N64, N22, N28, N8, N20, Çitgöl Termal Kaplıcası Mayıs 2011 klonları Ç29E, Ç4E, Alt sıra: marker, Ç31E, Ç32E, Ç39E, Ç47E, Ç53E, Ç69E, Ç74E, Çitgöl Termal Kaplıcası Ekim 2012 klonları,Ç2, Ç13, Ç17, Ç18, Ç25, Ç26, Ç23E, Ç32E,)

Çizelge 4. 6 Çevresel su örnekleri 16S klonların gen bankasındaki karşılıkları

KLON NO	TANIMLANAN TÜR	ACCESSION NUMBER	BENZERLİK
N1-39 (Naşa Mayıs 2011)	<i>Streptosporangium roseum</i> strain DSM 43021	gi 444304134 NR_074558.1	%99
N1-3 (Naşa Mayıs 2011)	<i>Streptosporangium nanhuense</i> strain NEAU-NH11	NR_125694.1	%99
N1-78 (Naşa Mayıs 2011)	<i>Micromonospora saelicesensis</i> strain Lupac 09	NR_042312.1	%99
N2-8 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium clone KL441HWDN22	DQ191822.1	%98
N2-15 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured bacterium clone Bms_MS223	HQ697764.1	%99
N2-3 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured bacterium clone P-8_B16	HQ910247.1	%94
N2-9 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured planctomycete partial 16S rRNA gene, isolate OTU36/APA	AM902622.1	%98
N2-22 (Naşa Ekim 2012)	<i>Fontimonas thermophila</i> strain HA-01	NR_109471.1	%91
N2-64 (Naşa Ekim 2012)	<i>Elioraea tepidiphila</i> strain TU-7	NR_044259.1	%99
N2-28 (Naşa Ekim 2012)	<i>Porphyrobacter cryptus</i> strain ALC-2	NR_025223.1	%99
N2-14 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured planctomycete partial 16S rRNA gene, isolate OTU36/APA	AM902622.1	%98
N2-6 (Naşa Ekim 2012)	<i>Thermovum composti</i> strain Nis3	NR_113183.1	%95
N2-4 (Naşa Ekim 2012)	<i>Nitratireductor sp. B10</i>	KM054703.1	%96

Çizelge 4. 6 devam Çevresel su örnekleri 16S klonların gen bankasındaki karşılıkları

N2-8 (Naşa Ekim 2012)	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> strain JAD2	NR_113009.1	%83
N2-20 (Naşa Ekim 2012)	Uncultured bacterium clone 7025P4B69	EF562095.1	%99
Ç1-53E (Çitgöl Mayıs 2011)	<i>Agromyces indicus</i> strain NIO-1018	NR_108908.1	%99
Ç1-69E (Çitgöl Mayıs 2011)	<i>Hydrogenobacter subterraneus</i> strain HGP1	NR_024729.1	%99
Ç1-31E (Çitgöl Mayıs 2011)	<i>Altererythrobacter dongtanensis</i> strain JM27	NR_108695.1	%99
Ç1-32E (Çitgöl Mayıs 2011)	<i>Thermus scotoductus</i> strain Se-1	NR_024867.1	%98
Ç1-4E (Çitgöl Mayıs 2011)	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. clone N-258	HM565055.1	%99
Ç2-2 (Çitgöl Ekim 2012)	Uncultured bacterium clone PZ1A10	KP636043.1	%91
Ç2-32E (Çitgöl Ekim 2012)	<i>Rhizobium rosettiformans</i> strain W3	NR_116445.1	%99
Ç2-18 (Çitgöl Ekim 2012)	<i>Solirubrobacter taibaiensis</i> strain GTJR-20	NR_134176.1	%97
Ç2-26 (Çitgöl Ekim 2012)	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> strain NBRC 102513	NR_114132.1	%97

Herbir su örneği için ARDRA profilleri incelenmiş farklı profil gösteren klonlardan temsili örnekler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Son olarak plazmitler vektörün primerleri olan T7 ve SP6 ile dizi analizine gönderilmiştir. Gelen dizi analizi sonuçları

incelendiğinde T7 primeri ile yapılan dizilemenin SP6'ya göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Şekil 4.12'de de görüldüğü gibi Naşa Termal Kaplıcası Mayıs 2011'de alınan su örneğinin klon kütüphanesinde 3 farklı profil elde edilmiştir. %99 benzerlik oranları ile *Streptosporangium roseum* strain DSM 43021, *Streptosporangium nanhuense* strain NEAU-NH11 ve *Micromonospora saelicesensis* strain Lupac 09 ile eşleşmiştir (Çizelde 4.6). Naşa'dan Ekim 2012 tarihinde alınan su örneğinde ise 13 farklı profil gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). N2-64 ve N2-28 kodlu klonlar blast analizi sonrası %99 benzerlik oranı ile sırasıyla termofilik olduğu bilinen *Eliaorea tepidiphila* strain TU-7 ve *Porphyrobacter cryptus* strain ALC-2 türleri ile eşleşmiştir (Çizelde 4.6). Şekil 4.14'te Çitgöl Termal kaplıcası Mayıs 2012 su örneğinin klon kütüphanesinin ARDRA profili verilmiştir. 10 farklı profil gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Ç1-53E kodlu klon *Agromyces indicus* strain NIO-1018 ile %99 benzerlik oranı ile eşleşmiş (Çizelde 4.6) ve bu türün literatürde 40 °C'de de yaşamını sürdürdüğü rapor edilmiştir (Dastager vd, 2012). Ç1-69E adlı klon ise termofil olan *Hydrogenobacter subterraneus* strain HGP1 ile %99 benzerlik sağlamıştır. Klon Ç1-32E ise %98 benzerlik oranı ile *Thermus scotoeductus* strain Se-1 ile eşleşmiştir (Çizelde 4.6). Çitgöl Ekim 2012 su örneği klonlarının ARDRA profili Şekil 4.15'te verilmiştir ve 9 farklı kesim profili gözlemlenmiştir. %97 benzerlik oranları ile Ç2-18, Ç2-26 kodlu klonlar sırasıyla *Solirubrobacter taibaiensis* strain GTJR-20 ve *Hydrogenophaga palleronii* strain NBRC 102513 eşleşmiştir. Ç2-32E klon numarasına sahip klon %99 benzerlik oranı ile *Rhizobium rosetiformans* strain W3 ile eşleşmiştir (Çizelde 4.6). Blastlama sonrası bazı klonlar gen bankasında kültüre edilemeyen klonlar ile eşleşme göstermiş ve izole edildikleri yerler göz önüne alındığında sıcak su kaynaklarından elde edilen klonlar olduğu görülmüştür. 16S klon kütüphanesi sonuçları ile kültüre edilebilen türler arasında bir benzerlik bulunmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin su örneklerinin alındığı zaman *Geobacillus* türlerinin spor durumunda olduğu kültüre edilme aşamasında uygun sıcaklık ve besin ile vejetatif hale geçtiği düşünülebilmektedir. Yine aynı sporlanma durumundan dolayı DNA ekstraksiyon aşamasında başarı sağlanamamış olabilir. Bakteriler için 27F-1387R primerleri kullanılmıştır bunlar yerine 27F-1492R gibi farklı primerlerde kullanılmış olsaydı çeşitliliğin daha fazla belirlenebileceği düşünülmüştür. Figuera (2007) sıcak su kaynağından alkalitermofilik mikroorganizmaların kültüre bağlı ve bağımsız yöntemler kullanarak mikrobiyal çeşitliliğini yüksek lisans tezi kapsamında çalışmıştır. Kültüre edebildiği türlerin *Geobacillus* genusuna ait olduğu ve T-RFLP ve 16S klonlama çalışmaları ile kültürden

bağımsız olarak farklı bir profil elde ettiğini bildirmiştir. Figuera'nın elde ettiği bu sonuçlar ise bizim sonuçlarımız ile örtüşmektedir ve aynı nedenler ileri sürülmüştür.

Aynı amaca hizmet eden birkaç yöntemin kullanılması sonuçları desteklemesi yanında bir yöntemde kaçırılan sonucun diğerinde çıkma şansını artıracak için önemlidir. Yapılan bu tez kapsamında da kültüre bağlı ve kültürden bağımsız olarak yapılan çalışmalar sonunda örtüşen sonuçların yanısıra örtüşmeyen sonuçlarda bulunmaktadır. Böylece çeşitliliğin belirlenmesinde doğru bir yöntem izlendiği düşünülmektedir. Farklı yöntemlerin kullanılmasının nedeni, elde edilecek verilerin birbiriyle karşılaştırılması sonucunda doğrulayıcı ve tamamlayıcı bilginin elde edilme potansiyelidir. Ribozomal RNA'ların evrimsel belirteç (marker) olarak kullanılmasının nedenleri; yeterli büyüklükte olması, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın olan moleküller olması ve tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleridir (Madigan ve Martinko 2010). Türkiye de sıcak su kaynaklarının mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmaları kültüre bağlı olarak yapılmaktadır (Çizelge 5.1). Sunulan bu tez her iki yönteminde kullanılması açısından önem taşımaktadır.

4.4 İzolatların PHB Üretim Yeteneklerinin Araştırılması

Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarından izole edilen ve izolatlardaki farklılığı belirlemek için yapılan ARDRA analizinden sonra farklı profil gösteren ve temsili olarak seçilen 10 adet izolatın PHB üretim yetenekleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7). % PHB üretim değeri üretilen PHB miktarının ($\mu\text{g/ml}$) kuru biyokütleyle oranıyla elde edilmiştir.

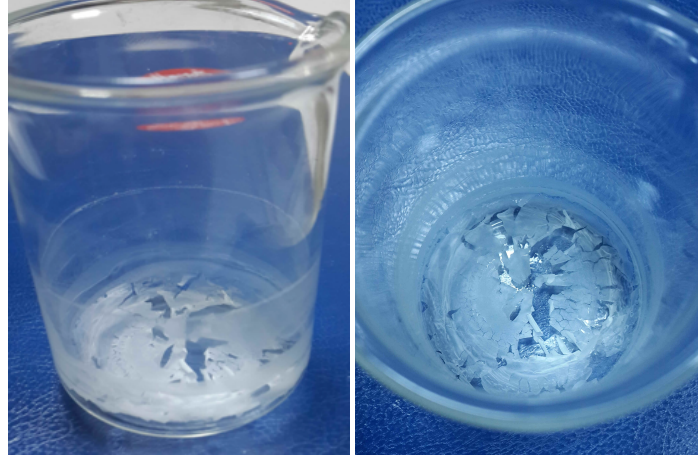
Çizelge 4. 7 İzolatların % PHB üretim miktarları

İzolat Adı	% PHB üretimi
Ç2-2	2,33
Ç3-3	1,63
Ç4-2	4,24
N4-5	0,62
N4-6	0,29
Ç2-1	1,40
Ç4-1	1,80
Ç2-3	0,75
Ç3-1	0,57
Ç2-5	0,68

Çizelge 4.7’de verildiği gibi % 4.24 PHB üretim verimi ile Ç4-2 kodlu izolat seçilmiştir. Üretim veriminin artırılması için optimizasyon çalışması Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

4.4.1 Seçilen izolat ile Box Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları

Yapılan tarama çalışması sonrası % 4,24 PHB üretim yeteneğine sahip Ç4-2 izolatı ile Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonunda elde edilen % PHB üretim verimi çizelge 4.8’de verilmiştir. Optimum koşullarda üretilen PHB’nin görüntüsü Şekil 4.18’de verilmiştir. Faktörler arası ikili etkileşimler Şekil 4.16’da verilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi ile önerilen deney seti, güven ve tahmin aralıkları Çizelge 4.9’da verilmiştir. Çizelge 4.10’da ise ANOVA analizi verilmiştir.



Şekil 4. 17 Üretilen PHB'nin görüntüsü

Çizelge 4. 8 Box -Behnken deney seti optimizasyon sonuçları

Std	Run	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
		A:Karbon kaynagi miktar (g/L)	B:inkübasyon sıcaklığı (°C)	C:inkübasyon suresi(gün)	
1	15	10	35	4	8,05
2	17	50	35	4	3,85
3	14	10	75	4	3,76
4	3	50	75	4	4,8
5	12	10	55	2	3,48
6	16	50	55	2	2,43
7	6	10	55	6	3,33
8	8	50	55	6	1,49
9	4	30	35	2	4,14
10	1	30	75	2	2,99
11	5	30	35	6	3,18
12	13	30	75	6	2,58
13	11	30	55	4	3,51
14	10	30	55	4	3,07
15	7	30	55	4	3,19
16	2	30	55	4	3,15
17	9	30	55	4	3,09

Deney tasarımı, belirlenmiş bir tasarım matrisine göre süreç üzerinde etkili olması muhtemel değişkenlerin, değerleri sistematik olarak değiştirilerek, bir deney veya bir takım sıralı deneylerin gerçekleştirilmesi yöntemidir. Özellikle araştırma geliştirme faaliyetlerinde kullanılan bir kalite tekniğidir. Bu yöntem deneylerin sayısını azaltmak ve deneylere etki eden faktörlerin tek başlarına ve diğer faktörlerle birlikte deney sonuçlarını

nasıl etkilediklerini ortaya koymak için geliştirilmiştir. Deney tasarımı yaklaşımı, söz konusu faktörlerin farklı seviyelerinin çıktı değerleri üzerinde oluşturdukları değişimleri ve bu değişimlerin altında yatan nedenleri araştırarak bunları optimize etmeyi ve sistemin güvenilirliğini artırmayı hedefler. Deney tasarımı teknikleri sadece istatistiksel bir yaklaşım değil, tüm araştırma-geliştirme faaliyetlerinde kullanılabilir, kaliteyi artıran, maliyetleri düşüren, sonuçların güvenilirliğini sağlamlaştıran tekniklerdir. Uygulamada getirdikleri üstünlükler; performans ve kalitenin artırılması, maliyetlerin düşürülmesi, araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin hızlandırılması ve prosesin kalite özelliklerini belirleyen değerlerin kontrol edilemeyen veya edilmesi zor faktörlere karşı daha az duyarlı olması şeklinde sıralanabilir (Kumar vd., 2008).

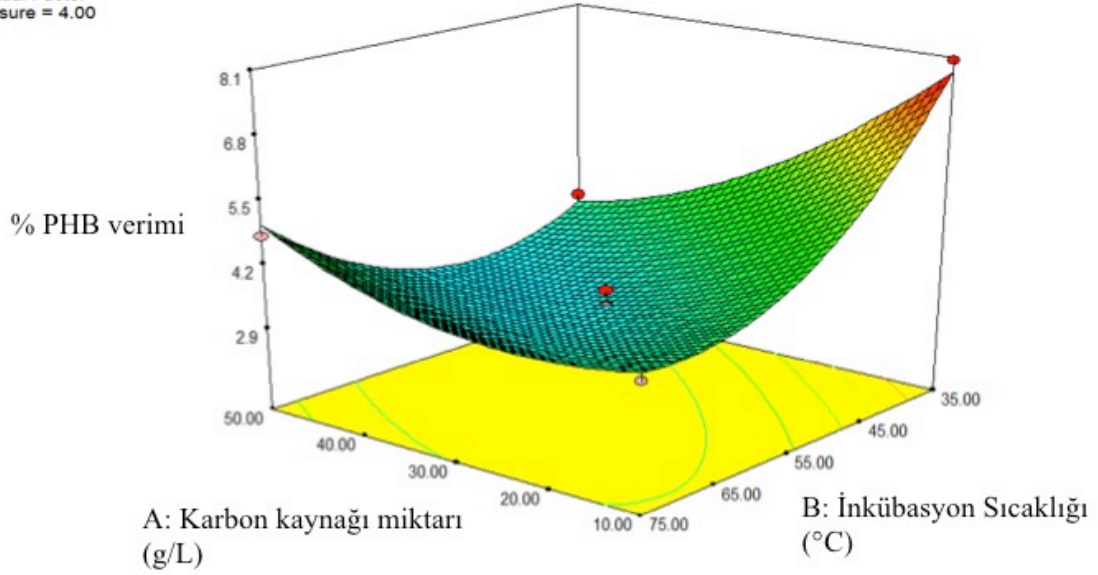
Ç4-2 izolatu ile PHB üretimi için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak karbon kaynağı (g/L), inkübasyon sıcaklığı (°C) ve inkübasyon süresi olmak üzere 3 faktörün 3 düzeyi çalışılmıştır (Çizelge 3.3). Karbon kaynağı miktarı olarak 10-30-50 g/L, inkübasyon sıcaklığı olarak 35-55-70 °C ve inkübasyon süresi olarak 2-4-6 gün çalışılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda 35 °C' de 10 g/L karbon kaynağı kullanılarak yaklaşık olarak 4 gün sonunda % 8,66 verime ulaşılacağı hesaplanmıştır ve yapılan doğrulama deneyi ile tahmin edilen PHB üretim verimine ulaşılmıştır (Çizelge 4.9). Şekil 4.18'de verilen ikili etkileşim grafiğinde 4 günlük inkübasyon süresi sabit tutulduğunda karbon kaynağı miktarının azaldığı ve sıcaklığında 35 °C' de olduğu durumda en yüksek PHB verimi elde edildiği görülmektedir.

Design-Expert® Software

Untitled

8.05

1.49

X1 = A: Karbon kaynagi miktar
X2 = B: sicaklikActual Factor
C: sure = 4.00

Şekil 4. 18 Karbon kaynağı ve inkübasyon sıcaklığı ikili etkileşim grafiği

Çizelge 4. 9 Box-Behnken deneysel tasarımı tarafından önerilen doğrulama deneyi ve güven/tahmin aralığı değerleri

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.	Coding
A	Karbon kaynagi miktarı	10,00000697	10	50	0	Actual
B	İnkübasyon sıcaklığı	35,00001292	35	75	0	Actual
C	İnkübasyon süresi	3,743568707	2	6	0	Actual

Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
Response	7,837096534	0,240210167	7,293703387	8,380489681	0,367206167	7,006418479	8,66777459

Çizelge 4. 10 ANOVA analiz çizelgesi

	Sum of		Mean	F	p-	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob >	
					F	
Model	29,27236853	7	4,181766933	54,21048807	<	significant
					0.0001	
A-Karbon kaynagi miktar	4,5753125	1	4,5753125	59,31223038	<	0.0001
B-sicaklik	3,2385125	1	3,2385125	41,98257485	0.0001	
C-sure	0,75645	1	0,75645	9,80626715	0.0121	
AB	6,8644	1	6,8644	88,98689963	<	0.0001
A^2	1,984346316	1	1,984346316	25,7241458	0.0007	
B^2	6,333904211	1	6,333904211	82,10979812	<	0.0001
C^2	6,123941053	1	6,123941053	79,38793307	<	0.0001
Residual	0,694255	9	0,077139444			
Lack of Fit	0,566575	5	0,113315	3,549968672	0.1217	not significant
Pure Error	0,12768	4	0,03192			
Cor Total	29,96662353	16				

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. %95 güven aralığından düşük ($p > 0,05$) olasılıkların istatistiksel açıdan model için önemli olmadığı göz önünde tutulmuştur. Bu deney serisi için yapılan varyans analizinde $p < 0,05$ olduğu için parametreler PHB üretimi için anlamlı farklılıklar göstermekte olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Tez kapsamında üretilen PHB'nin ekstraksiyon aşamasının çöktürme basamağında tamamen bir çökme gerçekleşmediği için kayıplar olduğu düşünülmektedir ve buda verimin düşük hesaplanmasına neden olmuştur. Tezden sonra yapılacak olan çalışmalarda PHB ekstraksiyonu ile ilgili bir modifikasyon yapılması düşünülmektedir. Pek çok bakteri tarafından hücrel büyüme sınırlandırıcı oksijen, fosfor, azot, kükürt gibi temel besin maddelerinin yokluğunda ve aşırı karbon kaynağının varlığında karbon ve enerji kaynağı olarak üretilmekte ve depo edildiği bilinmektedir. PHB üretiminde azot:fosfor:karbon oranının önemli bir faktör olduğu göz önünde bulundurulduğunda tez çalışması sonrasında yapılacak olan çalışmalarda bu oranın optimizasyonu ve atıkların karbon kaynağı olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar planlanmıştır. PHB üreticisi olarak seçilen Ç4-2 kodlu izolat *Geobacillus kaustophilus strain NBRC 102445* ile eşleşmiştir. Büyüme sıcaklığının 35-75 oarak geniş bir aralıkta

olmasının üstünlüğü yapılan optimizasyon sonuçlarında görülmektedir. Optimum PHB üretim veriminin 35 °C olarak bulunması endüstriyel süreçler için bir üstünlük sağlayabilmektedir. Termofil mikroorganizmaların kullanıldığı süreçlerde sterilizasyona gerek kalmadan üretimin yapılması bir avantaj olarak düşünülebileceği gibi aynı zamanda bazı süreçlerde ilave bir ısıtma sistemine ihtiyaç duyulması gibi bir durumun varlığında dezavantaj oluşturmaktadır. Sunulan tez kapsamında termofil bir mikroorganizmadan mezofil koşullarda PHB'nin üretilmesi sterilizasyona gerek duyulması gibi bir dezavantajı üretilen polimerin termal olarak kararlı olması nedeni ile avantaja çevirdiği düşünülmektedir. Aynı zamanda termofilik bir mikroorganizmadan mezofil koşullarda PHB üretimi endüstrinin hali hazırda kurulu sistemlerine daha hızlı bir şekilde adapte edileceği içinde avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Endüstriyel süreçlerde ilave bir ısıtma-soğutma sistemine gereksinim duyulmadan sabit koşullarda mezofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen PHB' den sıcaklığa karşı daha dayanıklı ve kararlı olan bir PHB üretilmektedir. Yapılan literatür taramasında termofil mikroorganizmaların PHB üretim yeteneklerinin belirlenmesi yerine son zamanlara kadar termofil mikroorganizmaların PHB depolimeraz enzimleri ve PHB'nin biyolojik olarak termofil mikroorganizmalar tarafından yıkımları çalışılmış olduğu görülmektedir (Calabia ve Tokowia, 2006; Papaneophytou vd. 2009; Takeda vd., 1998). Yine aynı şekilde PHA'nın biyosentezi mezofilik mikroorganizmalarda aydınlatılmış olmasına karşın termofilik mikroorganizmaların PHA biyosentez yol izleri çok az çalışılmış ve bilgi eksikliği bulunmaktadır. İlk kez Pantazaki vd. (2004) *Thermus thermophilus*'un sodyum glukonatı kullanarak üretilen PHA'nın biyosentez yol izini aydınlatmak üzere çalışmışlardır. Sodyum glukonat varlığında PHA sentaz, β ketotiyolaz, NADPH bağımlı redüktaz enzim aktivitelere rastlanmıştır ve yaklaşık olarak kuru biyokütlesinin %35-40'ı kadar PHB ürettiği rapor edilmiştir. Termofilik *Chelatococcus sp. Strain MW10* kullanılarak kesikli fermantasyon ile biyoplastik üretim verimi çalışılmış, 50 °C'de fermantasyonun ikinci döngüsü boyunca en yüksek PHB üretimi 16.8 \pm 4.2 g/L olduğu ve enerji tasarrufu sağlayan süreçler için termofilik mikroorganizmaların kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. (İbrahim vd., 2010). Bununla birlikte termofiller; mezofillerden daha hızlı büyüdüğü için termofilik PHA birikimini gerçekleştirmek için daha az zamana gereksinim olur. Örneğin *Cupriavidus necator* mezofilik bakteri 48-72 saatte 30 °C 'de glukonattan en yüksek PHB üretimi sağlanabilmiştir (Loosdre vd., 1997). Bir termofil olan *C. taiwanensis* 14 saatte 55 °C 'de aynı karbon kaynağını kullanarak kuru biyokütlesinin %71'i kadar PHB

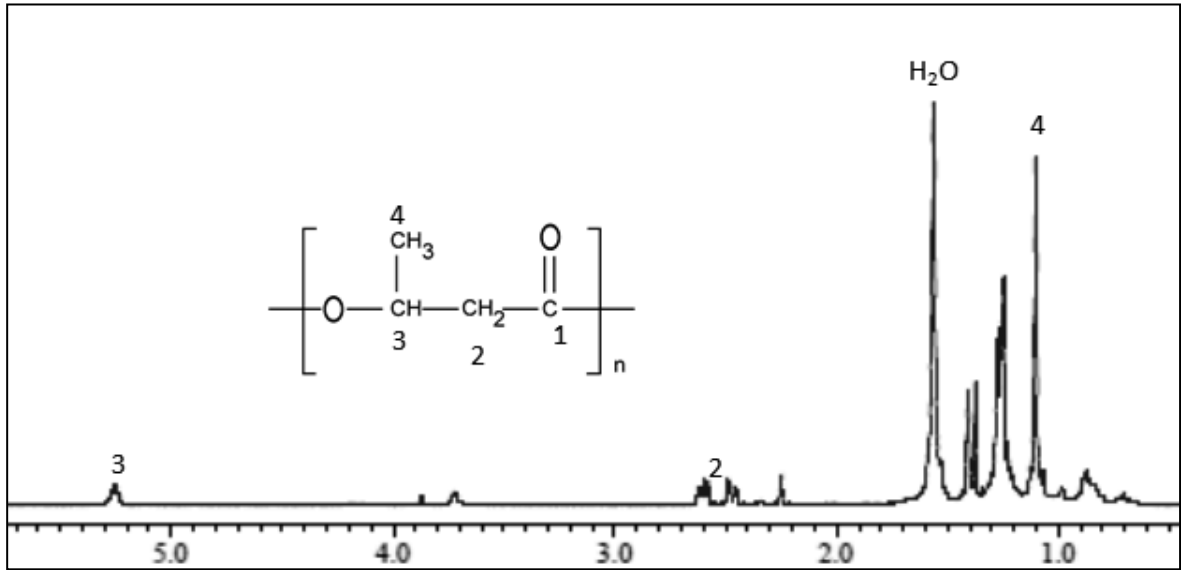
üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Sheu vd., 2009). Pantazaki vd. (2009) *Thermus thermophiles HB8*'den karbon kaynağı olarak peynir altı suyu kullanılarak azot azlığında PHA üretimi çalışmışlardır. 55 °C 'de 24 saat sonunda biyokütlesinin %35'i (w/w) kadar PHA üretildiği rapor edilmiştir. Başka bir sıcak su kaynağından izole edilen, 35-55 °C 'de yaşayabilen ve optimum büyüme sıcaklığı 50 °C olan, yıldız şekilde agregat oluşturan bir izolat ile PHB üretimi çalışılmış ve % 73 (w/w) oranında PHB üretildiği rapor edilmiştir (İbrahim vd, 2010). *Geobacillus sp.* AY846034 straini fosfor azlığında kuru biyokütlesinin % 68.9'i kadar PHB ürettiği Giedraityte ve Kalediene 'nin (2015) yaptığı çalışmada sunulmuştur. Termofil mikroorganizmaların PHB sentez yol izlerinin mezofillerden farklı olmadığını rapor etmişlerdir. Bunun için β ketotiyolaz, CoA redüktaz ve PHA sentaz enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir.

Sunulan tez çalışmasında kuru biyokütleyle oranla % 8,66 verime ulaşılmış ve literatüre göre verimin düşük olduğu görülsede yapılması planlanan çalışmalar ile verimin artırılacağı düşünülmektedir.

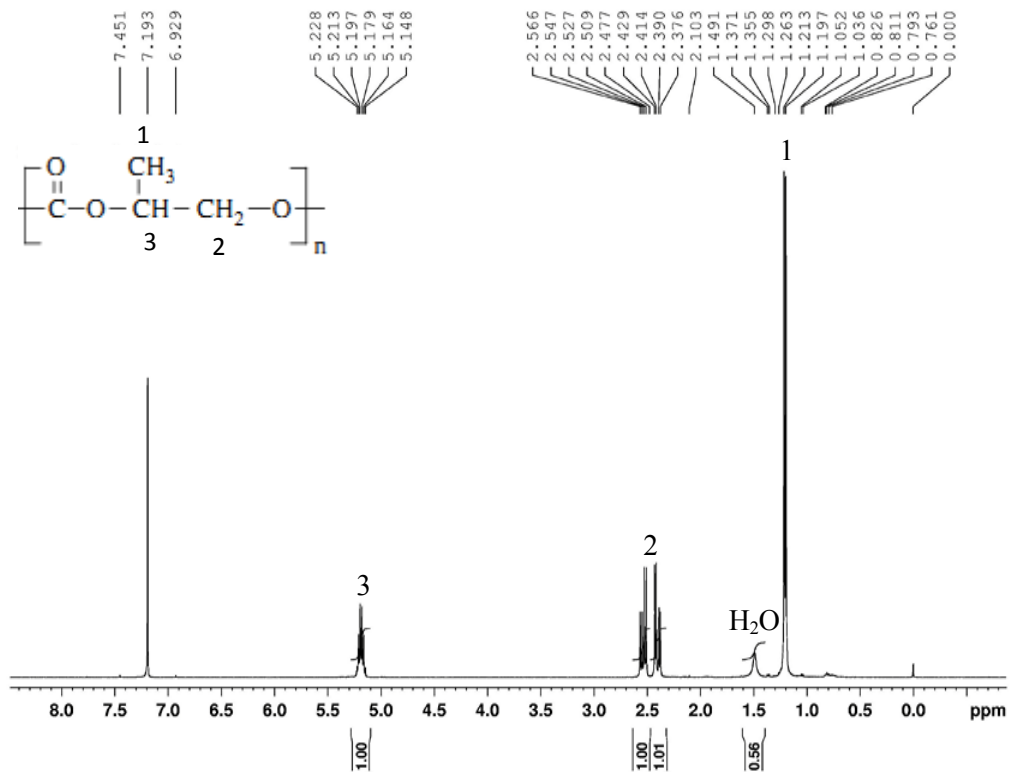
4.4.2 Elde edilen PHB'nin karakterizasyonu

i) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi

Optimizasyon sonunda Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi tarafından önerilen doğrulama deney seti sonunda elde edilen PHB'nin NMR analiz sonucu Şekil 4.19'da standart PHB'nin NMR analizi ise Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4. 19 Üretilen PHB'nin NMR analiz grafiği



Şekil 4. 20 Standart PHB'nin NMR analiz grafiği

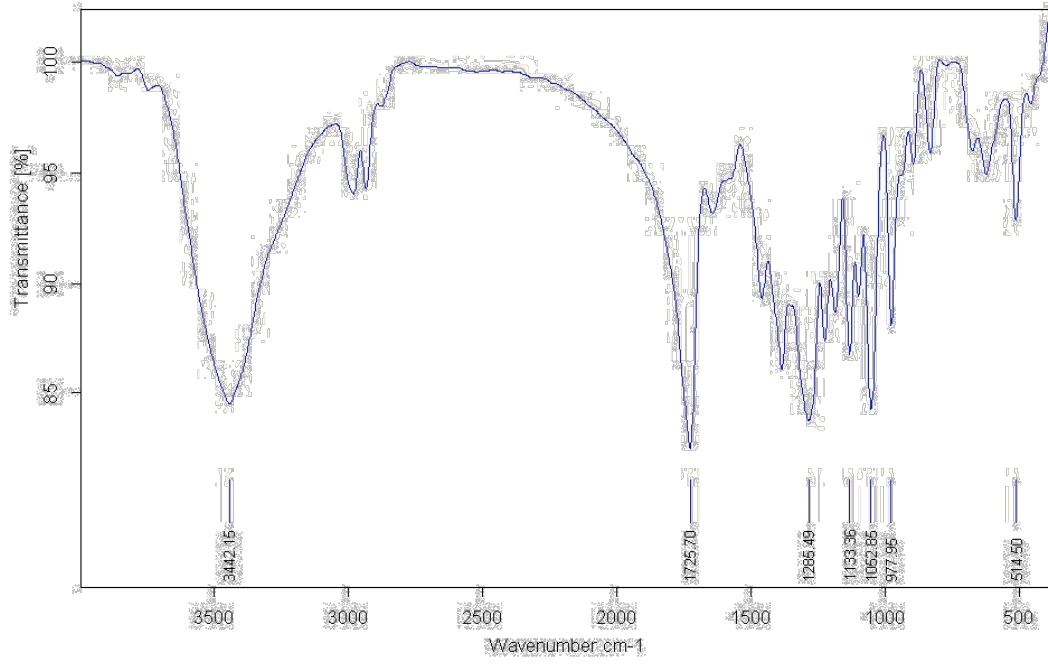
Tez kapsamında elde edilen PHB'nin karakterizasyonu için FTIR, NMR, TGA ve yoğunluk analizleri yapılmış ve ticari olarak satılan (Sigma) standart PHB ile üretilen yapıları karşılaştırılmıştır.

Standart PHB'nin proton NMR spektrumunda 1.2 ppm'de CH₃'e ait, 2.5 ppm'de CH₂'ye ait ve 5.2 ppm'de CH grubuna ait protonların pikleri görülmüştür (Şekil 4.20). Karbon kaynağı olarak sükröz, azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılarak üretilen PHB'nin proton NMR spektrumu incelendiğinde 1.102 ppm'de 3HB'e ait CH₃'lerin, 2,46-2,59 ppm'de CH₂'lere, 5.2 ppm'de CH'lara ait proton pikleri görülmüştür (Şekil 4.19). Elde edilen sonuçlara göre üretilen PHB'de de standart ile aynı bölge de piklerin mevcut olduğu NMR analizinde görülmüştür. Elde edilen NMR analizi literatür ile de benzerlik göstermektedir (Güngörmedi vd., 2015; Chung vd. 1997).

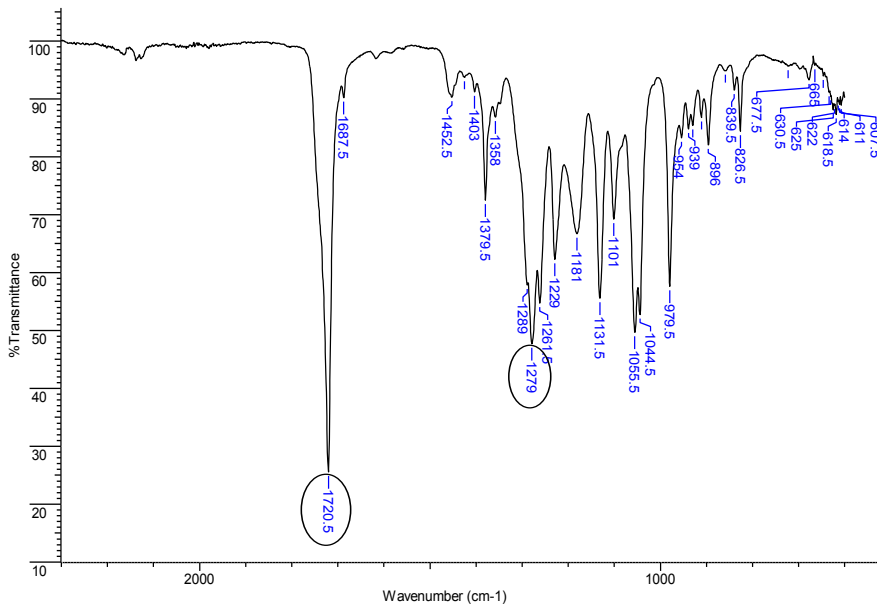
ii) Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) spektroskopisi analizi

Optimizasyon sonunda Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi tarafından önerilen doğrulama deney seti sonunda elde edilen PHB'nin FTIR analiz sonucu Şekil 4.21'de verilmiştir. Standart PHB'nin FTIR analizi ise Şekil 4.22'de bulunmaktadır.

Standart PHB'de ve literatürde verilen verilere göre PHB için karakteristik olan pikler; 1720 cm⁻¹ de bulunan karbonil grubu ve 1279-1055 cm⁻¹ de görünen karboksil gruplarındaki titreşimlerdir (Şekil 4.22) (Giedraityte ve Kalediene, 2015; Güngörmedi vd, 2015). Ç4-2 izolatu ile sunulan tez kapsamında üretilen PHB'nin FTIR grafiğinde bu pikler mevcuttur (Şekil 4.21). Literatür ve standart PHB ile elde edilen pikler üretilen PHB'nin pikleri ile benzerlik göstermektedir



Şekil 4. 21 Üretilen PHB'nin FTIR analiz grafiği



Şekil 4. 22 Standart PHB'nin FTIR analiz grafiği

iii) Vizkozite ve yoğunluk analizi

Optimizasyon sonunda Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi tarafından önerilen doğrulama deney seti sonunda elde edilen PHB'nin vizkozite ve yoğunluk analiz sonucu Çizelge 4.11'de verilmiştir. Standart PHB'nin vizkozite ve yoğunluk sonucu ise Çizelge 4.12 dedir.

Çizelge 4. 11 Üretilen PHB'nin vizkozite ve yoğunluk değerleri

Tekrar sayısı	Vizkozite (mPa.s)	Yoğunluk (g/cm ³)
1	0,6562	1,4652
2	0,6556	1,4652
3	0,6502	1,4652
4	0,6570	1,4652
Ortalama	0,6547	1,4652

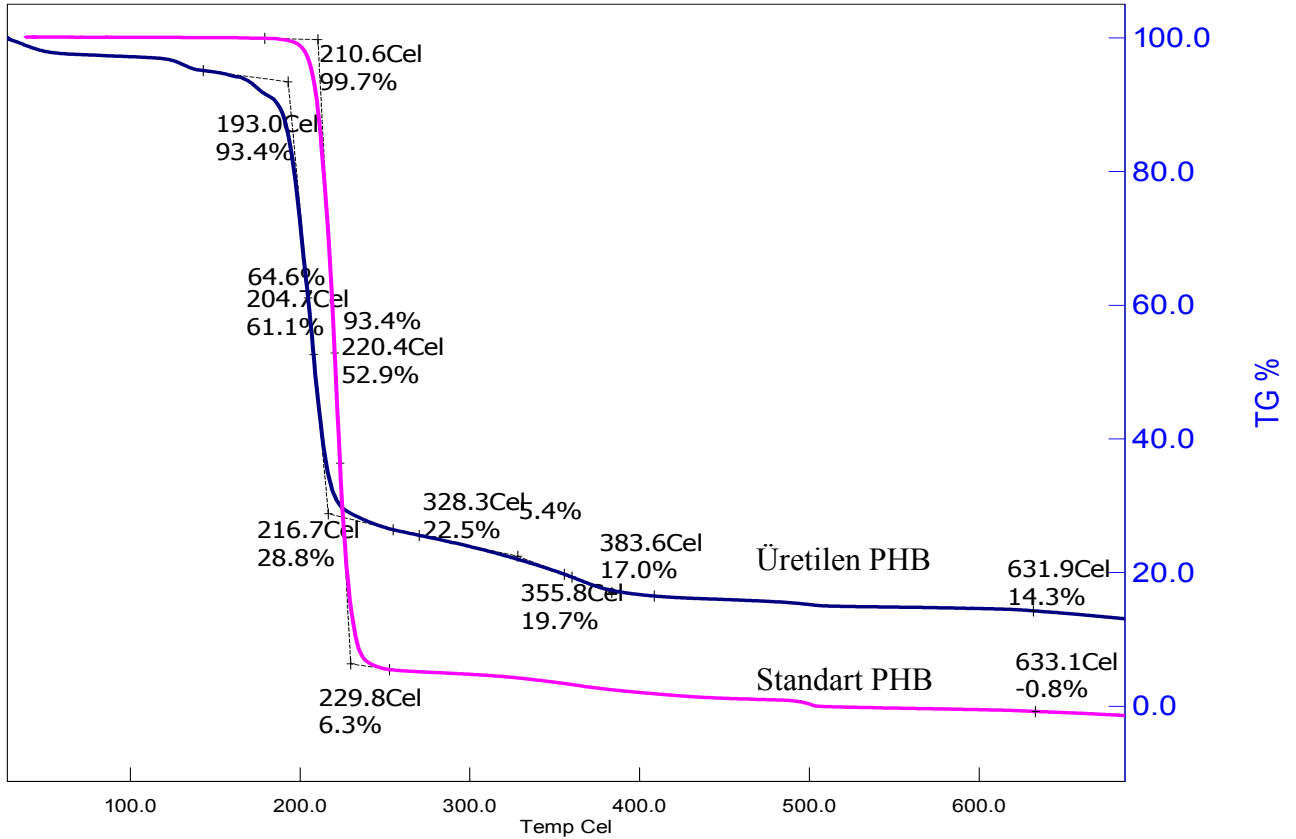
Çizelge 4. 12 Standart PHB'nin (Sigma) vizkozite ve yoğunluk değerleri

Tekrar sayısı	Vizkozite (mPa.s)	Yoğunluk (g/cm ³)
1	0,8112	1,46506
2	0,8088	1,46506
3	0,8074	1,46506
4	0,8187	1,46506
Ortalama	0,8116	1,46506

PHB'nin karakterizasyonu için yoğunluk ve vizkozite tayini de yapılmıştır. Çizelge 4.11 ve 4.12'de üretilen PHB ve standart PHB'nin yoğunluk ve vizkozite sonuçları verilmiştir. Üretilen PHB'nin vizkozitesi 0.6547 mPa.s olarak elde edilirken standart PHB'nin 0.8116 mPa.s olarak bulunmuştur. Yoğunlukları her iki polimer içinde 1.4650 g/cm³ olarak hesaplanmıştır. PHB'nin vizkozitesi ile moleküler ağırlığı arasında bir bağ olduğu bilinmektedir. Vizkozite arttıkça moleküler ağırlığında arttığı bildirilmiştir (Olkhove vd., 2014; Lundgren vd., 1965). Buna göre üretilen PHB'nin moleküler ağırlığının standart PHB'den daha düşük olduğu sonucuna varabiliriz. İlerde yapılacak olan çalışmalar ile üretilen PHB'nin moleküler ağırlığı belirlenecektir.

iv) Termogravimetrik analiz (TGA)

Optimizasyon sonunda Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi tarafından önerilen doğrulama deney seti sonunda elde edilen PHB'nin ve standart PHB'nin termal davranışı Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4. 23 Standart ve üretilen PHB'nin TG analiz sonucu

Üretilen ve standart PHB'nin TG/DTA Cihazı kullanılarak 600 °C'ye kadar olan termal davranışları incelenmiştir (Şekil 4.23). Standart PHB'nin 210 °C'de ortamda % 99'u bozunmadan dururken sıcaklık 229.8 °C'ye ulaştığında %6.3'ü bozunmadan kalmış ve sıcaklığın artması ile tamamen bozunmuştur. Ç4-2 izolatu ile üretilen PHB ise; 193 °C'de %93.4'ü bozunmadan kalırken sırasıyla 216 °C'de %28'i, 631 °C'de ise hala ortamda %14.3'ü bozunmadan kalabilmektedir. Yapılan inceleme sonucunda ticari PHB'nin erime sıcaklığını 174°C olarak saptanmıştır. Üretilen polimerin DTA grafiği incelendiğinde

birden fazla erime sıcaklığı (154,5; 157,8; 173,9 °C) olduğu görülmüştür. Birden fazla erime piki elde edilen polimerin molekül ağırlığı dağılımın fazla olduğu anlamına geldiği düşünülmektedir. Daha önce laboratuvarımızda yapılan *Bacillus megaterium*'dan süktroz varlığında üretilen PHB de de 3 farklı erime sıcaklığı (137.34, 160.84 ve 185.41 °C) elde edilmiştir. Yine aynı çalışmada melas karbon kaynağı olarak kullanılmış ve sentezlenen PHBV'nin DSC sonuçlarına göre 139.21, 157.44 ve 169.63 °C olmak üzere birden fazla erime noktası tespit edilmiştir (Güngörmedi, 2014). Mısırdan izole edilen *Bacillus sp*'den üretilen PHB'nin TGA analizinde ise polimerin bozulmasında 3 faz gözlemlendiği rapor edilmiştir. İlk olarak 134 °C'de %0.8 bozunduğu ikinci değer olarak 237 °C' de %1.6 bozunduğu ve 275 °C'de ise tamamen bozunduğu ifade edilmiştir (Hassan vd., 2016). *Geobacillus sp.* AY846034 straininin kullanıldığı bir çalışmada üretilen PHB'nin DSC analizi yapılmış erime sıcaklığı 168.80 °C olarak bulunmuştur. 260 °C'den sonra bozunmaya başladığı ve 280 °C' de hızla tamamen bozunduğu rapor edilmiştir (Giedraityte ve Kalediene, 2015). Sunulan tez kapsamında elde edilen TGA sonuçlarına göre mezofil şartlarda üretilen PHB'ye ve *Geobacillus sp.* AY846034'ten üretilen PHB'ye oranla sıcaklığa karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiş ve farklı kullanım alanlarına sahip olacağı düşünülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Türkiye jeolojik ve jeomorfolojik özellikleri nedeniyle debileri, sıcaklıkları, radyoaktiviteleri, eriyik mineral oranları ve ulaşılabilirlikleri bakımından birbirinden farklı çok sayıda termal kaynağa sahiptir (Özşahin ve Kaymak, 2013). 1300'den fazla termal su kaynağı bulunduğu düşünülmektedir. Öyle ki; jeotermal potansiyeli bakımından Avrupa kıtasının birinci ve Dünya'nın yedinci ülkesi konumundadır. İzmir, Manisa, Afyonkarahisar, Denizli, Aydın, Eskişehir ve Kütahya gibi bölge illeri termal kaynaklar yönünden öne çıkan şehirlerden bazılarıdır. Türkiye'de ki sıcak su kaynaklarının dağılışı ile fay hatları arasında bir uyum söz konusudur. En yaygın termal biyotoplar, nötr kaplıcalar, solfatarik alanlar ve denizaltı tuzlu su delikleri olarak bilinen hidrotermal sistemler gibi jeotermal ve volkanik alanlardır. Aynı zamanda termofiller biyolojik aktivite sonucu sıcaklığın arttığı kompost ve kömür yığınları gibi çevrelerde de bulunabilirler. Ek olarak evsel ve endüstriyel sıcak sularda ve yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel süreçlerin olduğu ortamlarda da (kağıt işleme makineleri ve gıda işleme tesisleri vb.) termofiller bulunabilmektedir (Gold, 1992). Dünya üzerindeki sıcak su kaynakları Batı Amerika, Orta Afrika, Yeni Zelanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika, Orta Afrika gibi ülkelerin bulunduğu geniş bir alanda bulunur (Akkaya ve Kıvanç, 2009). Ancak, kapsamlı çalışmalar uzun yıllar termal habitatlarda yaşayan mikroorganizmalar üzerine Yellow Stone Ulusal Parkında yapılmıştır. Ancak bu kaynakların mikrobiyolojik profillerini hem bakteriler hem de arkeler açısından belirleyen kapsamlı bir çalışma açısından eksikliklerin olduğu bilinmektedir. Yaşadığımız biyosferin önemli bir parçasını mikroorganizmalar oluşturur, bu canlıların, besin üretiminde kullanılanlar, insan, bitki ve hayvanlarda hastalık oluşturanlar dışında kalanlarının ise hala tanımlanamamış olduğu bildirilmektedir. Termal kaynaklı mikroorganizmaların biyosferin üzerinde çok önemli rollerinin bulunduğu tespit edilmiş, doğal ortamlarında bulunan bu canlıların çok azının mevcut mikrobiyolojik tekniklerle izole edilebildiği bildirilmiştir (Hugenholtz vd., 1998).

Termofilik mikroorganizmalar, aşırı sıcaklık değerlerinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri, enzim ve diğer proteinlerinin yüksek sıcaklık ve denatürant gibi çevresel ve kimyasal koşullara karşı dayanıklı olması hem mekanizmalarının araştırılması hem de endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının hedeflerinden biri; daha önce mikrobiyal çeşitlilik açısından çalışılmamış olan Naşa ve Çitgöl Termal kaplıcalarının hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız teknikler kullanılarak mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesidir. Diğer bir hedef ise; termofil mikroorganizmaların ürettiği enzim, polimer vb. ürünlerinin aşırı koşullarda kararlılığı göz önünde bulundurulduğunda yüksek sıcaklıklara dayanıklı PHB üretimi ve üretilen PHB'nin bu özelliğinin ortaya konmasıdır.

Türkiye’de 1300’den fazla sıcak su kaynağı bulunmaktadır ve bunların yaklaşık 600 tanesi hakkında bilgi bulunmaktadır. Bu 600 sıcak su kaynağından yaklaşık olarak 40 adet kaplıca ve 15 adet farklı bölgedeki sıcak su kaynaklarının mikrobiyal çeşitliliği çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen izolatların *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Geobacillus*, *Thermus*, *Anoxybacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Aneurinibacillus*, *Schlegelella*, *Chelatococcus*, *Meiothermus* genuslarına ait olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5. 1 Türkiye’deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler

Referans	Termal Kaynak	Sıcaklık °C	İzole Edilen Tür
Gedikli, 2016 (Bu tez çalışması)	Naşa termal kaplıcası	65 °C	<i>Geobacillus kaustophilus</i> <i>Geobacillus subterraneus</i>
	Çitgöl termal kaplıcası	80 °C	<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> <i>Geobacillus thermoleovarans</i> <i>Geobacillus</i> <i>thermoparaffinivorans</i> <i>Geobacillus sp</i> <i>Thermus thermophilus</i>
Erdönmez, 2015	Kütahya Eynal termal kaplıcası	55-60 °C	<i>Paenibacillus lactis</i> <i>Brevibacillus borstelensis</i> <i>Paenibacillus</i> <i>naphthalenovorans</i>
Bozoğlu, 2014	Ağrı Diyadin	55 °C	<i>Brevibacillus sp.</i>
Türker, 2014	Erzin Burnaz çayı	55 °C	<i>Bacillus sp.</i>

Çizelge 5.1 (devam) Türkiye’deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler

Referans	Termal Kaynak	Sıcaklık °C	İzole Edilen Tür
Doğanlı, 2013	Pamukkale Termal Bölge	40-50 °C	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
Akdaş, 2012	Afyonkarahisar, Denizli, Kütahya ve Manisa illerindeki bazı jeotermal kaynaklardan	55-95 °C	<i>Geobacillus sp.</i> <i>Geobacillus kaustophilus</i> <i>Geobacillus sp.</i> <i>thermoleovorans sp.</i> <i>Geobacillus lituanicus</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Thermus sp.</i> <i>Thermus thermophilus</i> <i>Anoxybacillus flavithermus</i> <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>
İnan, 2011	İzmir ve Aydın illerinde Karakoç Kaplıcası, Kaynarca Kaplıcası, Nebiler Kaplıcası, Alangüllü Kaplıcası, Çamköy Çamur Ilıcası Aydın Germencik Ömerbeyli Jeotermal sahasından	50-70 °C	<i>Anoxybacillus sp.</i> <i>A.kaynarcensis D1021T</i> <i>Brevibacillus spp.</i> <i>Geobacillus spp.</i> <i>Thermus sp.</i> <i>Aneurinibacillus sp.</i> <i>Pseudoxanthomonas sp.</i> <i>Schlegelella sp.</i> <i>Chelatococcus sp.</i>
Pirinçcioğlu, 2010	Mardin Dargeçit Şırnak Güçlükonak Şırnak Güçlükonak	30-65 °C 30-65 °C 35-65 °C	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> <i>Geobacillus</i> <i>Geobacillus kaue</i>

Çizelge 5.1 (devam) Türkiye’deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler

Referans	Termal Kaynak	Sıcaklık °C	İzole Edilen Tür
Acar, 2009	Van Erçiş Hasanabdal Köyü Termal	68 °C	<i>Geobacillus pallidus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Brevibacillus borstelensis</i>
Başbülül, 2009	Aydın ili Civarındaki kaplıcalardan izolasyon yapılmıştır.	Ort. 50 °C	<i>Geobacillus toebii</i>
Sarıgül, 2007	Ege bölgesindeki kaplıca ve jeotermal tesislerden izolasyon yapılmıştır.	55-95 °C	<i>Thermus oshimaii</i> <i>Thermus scotoeductus</i> <i>Thermus antranikianus</i> <i>Thermus thermophilus</i> <i>Thermus sp. Ege TB 34</i>
Adıgüzel, 2006	Ankara Haymana Ankara Kızılcahamam Afyon Sandıklı Eskişehir Hamamyolu Erzincan Ekşisu Erzurum Arzıtı Erzurum Akdağ Erzurum Hasankale Erzurum Ilıca Kütahya Yoncalı Nigde Çiftehan Rize İkizdere	44 °C 43 °C 70 °C 45 °C Veri yok Veri yok Veri yok Veri yok 39.4 °C 42 °C 44-53 °C 60-70 °C	<i>Bacillus thermocatenulatus</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Alicyclobacillus</i> <i>acidocaldarius</i> , <i>Bacillus</i> <i>pumilis GC subgroup B</i> , <i>Bacillus smithii</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus sphaericus-GC</i> <i>subgroup IV</i>

Çizelge 5.1 (devam) Türkiye’deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler

Referans	Termal Kaynak	Sıcaklık °C	İzole Edilen Tür
İnan, 2005	Çamköy Çamur	Veri yok	<i>Anoxybacillus camkoyensis</i>
	Dikili-Bergama	Veri yok	<i>Anoxybacillus voinovkiensis</i>
	Kaynarca		
	Dikili-Bergama	Veri yok	<i>Anoxybacillus sp.</i>
	Kaynarca		
	Hıdırlar Kaplıcası	Veri yok	<i>Anoxybacillus sp.</i>
Akkaya, 2005	Afyon Gazlıgöl	64 °C	<i>Geobacillus</i>
	Afyon Gecek	98 °C	<i>Stearothermophilus,</i>
	Afyon Ömerli	98 °C	<i>Geobacillus kaustophilus,</i>
	Denizli Kızılsu	58 °C	<i>Meiothermus taiwanensis,</i>
	Eskişehir Sarıcakaya	56 °C	<i>Thermus thermophilus,</i>
	Kütahya Gediz	65-98 °C	<i>Thermus aquaticus</i>
	Kütahya Simav	70-90 °C	
Dülger, 2003	Ağrı Diyadin	72-78 °C	<i>Anoxybacillus flavithermus,</i>
	Balıkesir Gönen	73 °C	<i>Bacillus licheniformis,</i>
	Çanakkale	73 °C	<i>Bacillus thermosphaericus,</i>
	Kestanbol		<i>Saccharococcus</i>
	Kaplıcaları		<i>caldoxylolyticus</i>
Başbülül, 2002	Boğazköy	67 °C	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
	Alangüllü		<i>Bacillus sp. 3, Bacillus sp. 4,</i>
	Kaplıcaları		
Öztürk, 2000	Adana	55 °C	<i>Streptomyces sp.</i>
	Samsun	55 °C	<i>Streptomyces sp.</i>
Son, 1999	Veri yok	Veri yok	Veri yok

Çizelge 5.1 (devam) Türkiye’deki çalışılan termal kaynaklar ve izole edilen türler

Referans	Termal Kaynak	Sıcaklık °C	İzole Edilen Tür
Balk, 1998	Afyon Yozgat Kastamonu Ankara Ayaş Ankara Kızılcahamam bölgelerindeki bazı sıcak su kaynakları	Veri yok Veri yok Veri yok	<i>Clostridium</i> , <i>Thermoanaerobium</i> <i>Thermoanaerobacter</i>
Dülger, 1997	Ayder Kaplıcası	57 °C	<i>Bacillus</i> türü bakteriler izole edilmiştir.

Yapılan mikrobiyal ekoloji çalışmalarına göre, mikrobiyal çeşitliliğin çok azı bilinmektedir. Son 10 yılda mikrobiyolojik teknikler ve moleküler tekniklerin kombinasyonu ile çalışmaların yapılması sonucunda her geçen gün tanımlanabilen tür sayısı artmaktadır. İki bin yılında tanımlanan tür sayısı 5000 civarında iken, 2012 yılına kadar tanımlanan prokaryotik çeşitlilik üyelerinin toplam sayısının 11.143 türe ulaştığı, Ağustos 2015 yılı itibari ile 14.800 tür olduğu bildirilmiştir. (online: <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>; erişim tarihi: 19/02/2012, online: <http://www.bacterio.cict.fr/number.html#total>, erişim tarihi: 19/02/2012; online: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>, erişim tarihi:20.09.2016.). rRNA yaklaşımı gibi kültürden bağımsız yöntemlerle karşılaştırıldığında kültüre bağlı yöntemlerle mikroorganizmaların küçük bir kısmı (<5%) belirlenebilmektedir. rRNA yaklaşımı biyoçeşitliliğin ortaya çıkarılmasında bir kilometre taşı olmuştur. Ancak canlı organizmaların metabolik özellikleri hakkındaki bilgiler bu yöntemle tam olarak belirlenememektedir. Bu nedenle organizmaların biyoteknolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalarda organizmanın kültürel olarak üretilmesi gerekli ve zorunludur (Satyanarayana ve ark., 2005). Son yıllarda ekstremofillerle yapılan çalışmalar daha çok bu mikroorganizmaların kendileri ya da ürünlerinin potansiyel biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni mikrobiyal suşların izolasyonu,

yeni bileşiklerin ve metabolik yol izlerinin tanımlanması, hücrenel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile olası potansiyel de giderek artmaktadır (Satyanarayana ve ark., 2005). Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar yüksek sıcaklıklarda hızlı ve verimli bir şekilde cereyan eden endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde önemli üstünlükler sağlamaktadır. Termofil ve hipertermofillerden elde edilen enzimler, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi gereken biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilir. Ayrıca mezofillerden elde edilen enzimlerden daha dayanıklıdır. Dolayısıyla bu tip enzim preparasyonlarının raf ömrü daha uzundur. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen ürünlerin termostabilitesinin yüksek olması bu ürünlerin dayanıklılık ve endüstriyel çevrelerde kullanım oranını artırmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında, termofil mikroorganizmaların çoğunlukla sahip oldukları enzim profillerinin araştırıldığı görülmektedir. Bununla birlikte aşırı ortamlardan izole edilen mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin kullanım alanlarının çeşitlendirilmesinin yanı sıra polimer üretimi gibi farklı uygulama alanlarında da çalışmalar son yıllarda dikkat çekmektedir.

Günümüzde plastik ve türevlerinin hayatımızda edindiği yer yadsınamayacak boyutlardadır. Ancak, kimya endüstrisine dayalı üretim yöntemlerinin gerek üretim süreçlerinde açığa çıkan çevre ve insan sağlığı açısından zararlı atıkları ve gerekse oluşan ürünlerin doğada uzun süre kalıcı olması, alternatif çözümler için zemin oluşturmuştur. Bu süreçte plastik üretiminde hammadde olarak kullanılabilen mikrobiyal orijinli biyoplastik üretimi için önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Ancak üretilen polimerlerin tüm gereksinimleri karşılayacak özelliklere sahip olmadığı bilinen bir durumdur. Bu gerekçe ile son yıllarda araştırmacılar alternatif biyopolimer üreticisi türleri belirlemek üzere çalışmalar yapmaktadırlar. Bu kapsamda özellikle termal alanlarda yaşayan mikroorganizmalar öne çıkmaktadır (Giedraityte ve Kalediene, 2015; Pantazaki vd., 2004; Ibrahim vd., 2010; Pantazaki vd., 2009). Yapılan çalışmalardan çeşitli termal kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların ürettikleri polimerlerin/enzimlerin farklı seviyelerde kararlılıklara sahip oldukları ve kullanım alanlarının da bu özelliğe göre değişebildiği bilinmektedir. Aynı zamanda termofil mikroorganizmalar yüksek sıcaklıkta işlev gören biyoteknolojik süreçlerde bazı üstünlüklere sahiptir. Örneğin yüksek sıcaklıkta PHB fermentasyon sürecinin gerçekleştirilmesi kontaminasyon riskini azaltır ve aynı zamanda fermentasyon ortamının sterilizasyonuna gerek duyulmayabilir. Bu da büyük ölçekli

üretimlerde maliyeti azaltır ve aynı zamanda istenilen saflıkta ürün elde edilmesi sağlanır. Biyoreaktör kullanılarak büyük ölçekli polihidroksialkonat (PHA) üretim süreçlerinde mezofilik mikroorganizmalar kullanıldığı zaman fermantasyon sürecinde ekzotermik reaksiyonların gerçekleşmesi ile sıcaklık artışı gerçekleşmektedir. Bu nedenle soğutma işlemi gerçekleştirilmekte ve bu da yüksek maliyet gerektirmektedir. Dolayısı ile ülkemiz gibi zengin termal alanlara sahip bir alandan alternatif polimer üreticilerinin elde edilebilme olasılığı yüksektir.

Sunulan tez çalışmasında kuru biyokütleyle oranla % 8,66 verime ulaşılmış ve literatüre göre verimin düşük olduğu görülsede yapılması planlanan çalışmalar ile verimin artırılabilceği düşünülmektedir. Tez kapsamında amaçlanan termal stabiliteye sahip polimer üretimi gerçekleştirilmiş olup yaklaşık 600 °C’de ortamda %14 oranında bozunmadan kalan bir polimer elde edilmiştir. Literatürde üretilen polimerlerin yaklaşık olarak 280 °C’ de tamamen bozunduğu ile ilgili bilgiler mevcuttur (Hassan vd., 2016; Giedraityte ve Kalediene, 2015) .

Özetle sunulan tez çalışması;

- 1) Ülkemizdeki sıcak su kaynaklarının mikrobiyal çeşitliliğini belirleyen bir çalışma olması açısından önemlidir. Naşa ve Çitgöl Termal Kaplıcalarının mikrobiyal çeşitliliği daha önce belirlenmemiş olduğu için bu alanların mikrobiyal biyoçeşitliliği için yapılan ilk çalışmadır.
- 2) Türkiye’de sıcak su kaynaklarının mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmaları genel olarak bugüne kadar kültüre bağlı olarak yapıldığı görülmektedir. Bu tez her iki yönteminde kullanılması açısından önem taşımaktadır.
- 3) Ç4-2 izolatu ile üretilen PHB’nin 600 °C sıcaklığında % 14 oranında bozunmadan kalması kullanım alanları açısından önem kazanmaktadır. Bu özellikteki bir PHB literatüre ilk kez sunulması açısından önem taşımaktadır.

İleride yapılması planlanan çalışmalar;

- 1) High Resolution Melting (HRM) analizi yapılarak çeşitliliğin kültürden bağımsız yöntemler ile belirlenmesi aşamasına bir yöntem daha eklenmesi,
- 2) Metagenomik çalışmaların yapılması,

- 3) Ç4-2 izolatu ile PHB üretim verimini artırmak amacı ile yeni çalışmaların yapılması,
- 4) PHB üretimi çalışmalarında karbon kaynağı olarak çeşitli endüstriyel atıkların değerlendirilmesi için çalışmaların yapılması,
- 5) Üretilen ve karakterizasyonu yapılan PHB'nin biyoteknolojik bir üründe kullanılması için denemelerin yapılması, şeklinde sıralanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdollahi, H., Shafaei, SZ., Noaparast, M., Manafi, Z., Niemelä, S.I., Tuovinen, O.H., 2014, Mesophilic and thermophilic bioleaching of copper from a chalcopyrite-containing molybdenite concentrate, *Int J Miner Process*, 128, 25–32.
- Acar, S., 2009, Hasanabdal Köyü termal tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006, Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora, Erzurum.
- Ahn, W.S., Park, S.J., Lee, S.Y., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3624-3627.
- Akdaş, H., 2012, Bazı jeotermal kaynaklardan termofilik bakterilerin izolasyonu ve endüstriyel öneme sahip enzimlerin belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora, Isparta.
- Akkaya, S.E., 2005, Sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri izolasyonu ve identifikasyonu, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora, Eskişehir.
- Akkaya, S.E., Kıvanç M., 2009, Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram Negatif Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, *Elektronik*
- Al-Maghrabi, I.M., Aqil, A.B., Islam, M., Chaalal, O., 1999, Use of thermophilic bacteria for bioremediation of petroleum contaminants. *Energy Sources*, Taylor & Francis, p. 17–29.
- Alakangas E, Valtanen J, Levlin J-E, 2006, CEN technical specification for solid biofuels – Fuel specification and classes, *Biomass Bioenergy*, 30, 908–14.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Alvarez-Macarie, E., Augier-Magro, V., Baratti, J., 1999, Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 1865-1870.
- Amann, R.l., Ludwig, W., ve Schleifer, K. H., 1995, Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Amann, R., Ludwig, W., 2000, Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 555-565.
- Anderson, A., Dawes, E., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 4, 450-472.
- Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L. and Giraffa, G. 1998, Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products, *Research in Microbiology*, 149, 631-643.
- Angelova, N., Hunkeler, D., 1999, Rationalizing the design of polymeric biomaterials, *Trends Biotechnol*, 17, 409-421.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., 1999, Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds, *Environmental Microbiology*, 1, 517-523.
- Aravind, L., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Walker, D.R., Koonin, E.V., 1998, Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles, *Trends Gene,t* 14, 442-444.
- Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R., Tokiwa, Y., 1999, Photosynthetic accumulation of poly(hydroxybutyrate) by cyanobacteria – the metabolism and potential for CO₂ recycling, *International Journal of Biologicals Macromolecul.*, 25, 37-42.
- Atomi, H., Matsumi, R., Imanaka, T., 2004, Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life, *J Bacteriol*, 186, 4829-4833.
- Balk, M., 1998, Bazı ekstrem bölgelerden anaerobik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve endüstride kullanım olanakları, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora, Ankara.
- Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., Dong, W., Yang, J., Chen, Y., Xue, Y., Xu, Y., Lai, X., Huang, L., Dong, X., Ma, Y., Ling, L., Tan, H., Chen, R., Wang, J., Yu, J., Yang, H., 2002, A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome, *Genome Res*, 12, 689-700.
- Barabote, R.D., Xie, G., Leu, D.H., Normand, P., Necșulea, A., vd., 2009, Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidotherrnus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L., Holmes, P.A., 1984, Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journals of Materials Science*, 19, 2781-2794.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Başbülbul, G., 2002, Aydın yöresi jeotermal sularındaki termofilik bakterilerin incelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Aydın.
- Başbülbul, G., 2009, Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora, Aydın.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., Goulet, J., 1995, Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, Applied and Environmental Microbiology, 61, 1, 165-169.
- Beeby, M., O'Connor, BD., Ryttersgaard, C., Boutz, DR., Perry, LJ., Yeates, TO., 2005, The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles, PLoS Biol 3, e309.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, EO., Goddard, V., Daae, FL., vd., Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern, 2002, Environ Microbiol, 4,6, 349-60.
- Benvegnu, T., Rethore, G., Brard, M., Richter, W., Plusquellec, D., 2005, Archaeosomes based on novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral delivery systems, Chem. Commun., 44, 5536–5538.
- Berger, JL., Lee, BH., Lacroix, C., 1995, Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species, Appl Microbiol Biotechnol, 44, 81–7.
- Berlanga, M., Montero, M.T., Fernandez-Borrell, J., Guerrero, R., 2006, Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats, International Microbiology, 9, 95–102.
- Bertoldo, C., Antranikian, G., 2002, Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, Curr Opin Chem Biol, 6, 151-160.
- Bertzina, T.S., Troitsky, V.I., Vakula, S., Riccio, A., De Rosa, M., Nicolini, C., 1997, Surface potential study of selective interaction of potassium ions with valinomycin in Langmuir–Blodgett films, Mater. Sci. Eng, C 5,1–6.
- Bertzina, T.S., Troitsky, V.I., Vakula, S., Riccio, A., Gambacorta, A., De Rosa, M., Gobbi, L., Rustichelli, F., Erokhin, V.V., Nicolini, C., 1995, Langmuir-Blodgett multilayers of native and synthetic glycerol-dialkylglycerol tetraether derivatives from archaea, Mater. Sci. Eng, C 3, 23–31.
- Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19, 2, 23-32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bezsudnova, EY., Boyko, KM., Polyakov, KM., Dorovatovskiy, PV., Stekhanova, TN., Gumerov, VM., Ravin, NV., Skryabin, KG., Kovalchuk, MV., Popov, VO., 2012, Structural insight into the molecular basis of polyextremophilicity of short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*, *Biochimie*, 94, 2628–2638.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, KM., Sani, RK., 2013, Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes, *Bioresour Technol*, 128, 751–9.
- Bhandiwad, A., Guseva, A., Lynd, L., 2013, Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* for increased n-Butanol production, *Adv Microbiol*, 3, 46–51.
- Bharali, P., Das, S., Konwar, B., Thakur, A., 2011, Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation, *Int Biodeter Biodegr*, 65, 682–90.
- Bilgehan, H., 1994, Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi, Barış yayınları, İzmir, s 180.
- Blaby, IK., Lyons, BJ., Wroclawska-Hughes, E., Phillips, GC., Pyle, TP., vd., 2012, Experimental evolution of a facultative thermophile from a mesophilic ancestor, *Appl Environ Microbiol*, 78, 144–155.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., Aragno, M., 1997, *Int J Syst Bacteriol*, 47, 1246–8.
- Blank, S., Schroder, C., Schirrmacher, G., Reisinger, C., Antranikian, G., 2014, Biochemical characterization of a recombinant xylanase from *Thermus brockianus*, suitable for biofuel production, *JSM Biotechnol Biomed Eng*, 2, 1027.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O., 1997, *Pyrolobus fumarii*, Gen. and sp. Nov, Represents A Novel Group of Archaea Extending The Upper Temperature Limit for Life to 113°C, *Extremophiles*, 1, 14–21.
- Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., Marchessault, R., 1986, Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate), *Macromolecules*, 19, 2865–2871.
- Blumer-Schuetz, SE., Ozdemir, I., Mistry, D., Lucas, S., Lapidus, A., vd., 2011, Complete genome sequences for the anaerobic, extremely thermophilic plant biomass-degrading bacteria *Caldicellulosiruptor hydrothermalis*, *Caldicellulosiruptor kristjanssonii*, *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*, *Caldicellulosiruptor owensensis*, and *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, *J Bacteriol*, 193, 1483–1484.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ., Savaşçı, S., Paşlı, N., Kaynaş, S., 2000, Ekoloji – 1, 2. Baskı, Ispartalılar Eğitim Kültür Sağlık Yardımlaşma ve Dayanışma Vakfı Yayınları No: 6, Ankara, 884s.
- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P. and Grappin, R. 2002, Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative Lactobacilli during Comte cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 27-38.
- Boutz, DR., Cascio, D., Whitelegge, J., Perry, LJ., Yeates, TO., 2007, Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains, *J Mol Biol*, 368, 1332–1344.
- Bozoğlu, C., 2014, Ağrı Diyadin kaplıcasından izole edilen termofilik *Brevibacillus sp.* (Z1) bakterisinden lakkaz enziminin saflaştırılıp, karakterize edilmesi ve endüstride kullanılabilirliğinin araştırılması, Atatürk Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Erzurum.
- Brard, M., Laine, C., Rethore, G., Laurent, I., Neveu, C., Lemiegre, L., Benvegna, T., 2007, Synthesis of archaeal bipolar lipid analogues: a way to versatile drug/gene delivery systems, *J. Org. Chem*, 72, 8267–8279.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.L., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.
- Brock, T.D., 1986, *Thermophiles*, Ed: Brock T.D. A Wiley-Interscience Publication, New York, 1-336.
- Brock, T.D. 1994, *Life at high temperatures*, Yellowstone Association for Natural Science, History and Education Inc. Yellowstone National Park, Wyoming 34pp.
- Browning, DF., Busby, SJ., 2004, The regulation of bacterial transcription initiation, *Nat Rev Microbiol*, 2, 57–65.
- Bruins, M., Janssen, A., Boom, R., 2001, Thermozyms and their applications, *Appl Biochem Biotechnol*, 90, 155-186.
- Buchanan, C.L., Connaris, H., Danson, M.J., Reeve, C.D., Hough, D.W., 1999, An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates, *Biochem J*, 343, 563-570.
- Burra, PV., Kalmar, L., Tompa, P., 2010, Reduction in structural disorder and functional complexity in the thermal adaptation of prokaryotes, *PLoS One*, 5, e12069.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burrows, W., Moulder, J.W., Lewert, R.M., 1963, Textbook of Microbiology, W.B. Saunders company, Philadelphia and London, Eighteen Edition, pp. 206-208.
- Cacciapuoti, G., Moretti, M.A., Forte, S., Brio, A., Camardella, L., Zappia, V., Porcelli, M., 2004, Methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. Mechanism of the reaction and assignment of disulfide bonds, *Eur J Biochem* 271, 4834–4844.
- Cai, L., Ye, L., Tong, A.H.Y., Lok, S., Zhang, T., 2013, Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets, *PLoS One*, 8, e53649.
- Calabia, B.P., Tokiwa, Y., 2006, A Novel PHB Depolymerase from a Thermophilic *Streptomyces* Sp., *Biotechnology Letters*, 28, 6, p 383–388.
- Canganella, F., Wiegel, J., 2014, Anaerobic thermophiles, *Life*, 4, 77–104.
- Chatterjee, S., Bhattacharjee, I., Chandra, G., 2010, Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*, *J Hazard Mater*, 175, 117–25.
- Chavan, S.B., Deshpande, M.V., 2013, Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential, *Biotechnol Prog*, 29, 833-846.
- Chen, G.Q., König, K.H., Lafferty, R.M., 1991, Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 84, 174-176.
- Chen, W.M., Chang, J.S., Chiu, C.H., Chang, S.C., Chen, W.C., Jiang, C.M., 2005, *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Syst Appl Microbiol*, 28, 415–420.
- Chen, J., Stites, W.E., 2004, Replacement of staphylococcal nuclease hydrophobic core residues with those from thermophilic homologues indicates packing is improved in some thermostable proteins, *J Mol Biol*, 344, 271–280.
- Chen, Y., Sun, D., Zhou, Y., Liu, L., Han, W., Zheng, B., Wang, Z., Zhang, Z., 2014, Cloning, expression and characterization of a novel thermophilic polygalacturonase from *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725, *Int J Mol Sci*, 15, 5717-5729.
- Chen, Z., Wen, B., Wang, Q., Tong, W., Guo, J., vd., 2013, Quantitative proteomics reveals the temperature-dependent proteins encoded by a series of cluster genes in thermoanaerobacter tengcongensis, *Mol Cell Proteomics*, 12, 2266–2277.
- Chernyh, N.A., Gavrillov, S.N., Sorokin, V.V., German, K.E., Sergeant, C., Simonoff, M., vd., 2007, Characterization of technetium (vII) reduction by cell suspensions of thermophilic bacteria and archaea, *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 467–72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chowdhury, B., John, M., 1998, Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate, *Thermochimica Acta*, 313, 43-53.
- Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T., Klimiuk, E., 2006, Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates- producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 190–9.
- Cifuentes A., Anton J., Benlloch S., Donnelly A., Herbert R.A. , Rodriguez-Valera F, 2000, Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1715–1719.
- Cooper, C.R., Daugherty, A.J., Tachdjian, S., Blum, P.H., Kelly, R.M., 2009, Role of vapBC toxin-antitoxin loci in the thermal stress response of *Sulfolobus solfataricus*, *Biochem Soc Trans* 37, 123–126.
- Costas, G., Amaya, M., Liu, Z., Tomsho, LP., Schuster, SC., Ward, DM., vd., 2012, Complete genome of Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the phylum acidobacteria, *Environ Microbiol*, 14, 177–90.
- Cramp, R.A., Cowan, D.A., 1999, Molecular characterisation of a novel thermophilic nitrile hydratase, *Biochim Biophys Acta*, 1431, 249-260.
- Croarkin, C., Tobias, P., 2015, Engineering Statistics e-Handbook. Erişim Adresi: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> Erişim Tarihi: 05.10.2015.
- Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., “Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate”, *Bioresource Technology*, 97, 641–647, 2006.
- Çömlekçi N., 2003, Deney tasarımı ilke ve teknikleri, Alfa yayınları, İstanbul.
- d'Hugues, P., Foucher, S., Galle-Cavalloni, P., Morin, D., 2002, Continuous bioleaching of chalcopyrite using a novel extremely thermophilic mixed culture, *Int J Miner Process*, 66, 107–19.
- Dante S., De Rosa M., Maccioni E., Morana A., Nicolini C., Rustichelli F., Troitsky V.I., Yang B., 1995, Thermal stability of bipolar lipid Langmuir Blodgett films by X-ray diffraction, *MCLC*, 262, 191–207.
- Dastager, S. G., Qiang, Z. L., Damare, S., Tang, S. K., Li, W. J., 2012, *Agromyces indicus* sp. nov., isolated from mangroves sediment in Chorao Island, Goa, India, *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 345-352.
- Das, S., Paul, S., Bag, S.K., Dutta, C., 2006, Analysis of Nanoarchaeum equitans genome and proteome composition: indications for hyperthermophilic and parasitic adaptation, *BMC Genomics*, 7, 186.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dave, H., Ramakrishna, C., Desai, J.D., 1996. Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp., IPCB-403. Indian Journal of Experimental Biology, 34, 216-219.
- De Montigny, C., Sygusch, J., 1996, Functional characterization of an extreme thermophilic class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase, Eur J Biochem, 241, 243-248.
- De Rosa, M., Morana, A., Riccio, A., Gambacorta, A., Trincone, A., Incani, O., 1994, Lipids of the archaea: a new tool for bioelectronics, Biosens. Bioelectron. 9, 669–675.
- Deive, F., Dominguez, A., Barrio, T., Moscoso, F., Moran, P., Longo, M., vd., 2010, Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). J Hazard Mater, 182, 735–42.
- Derringer, G., Suich, R., 1980, Simultaneous optimization of several response variables, Journal of Quality Technology, Vol. 12, pp. 214-219.
- Dias, J.M., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G., 2006, Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product, Macromolecular Bioscience, 6,885–906.
- Doğanlı, A.G., 2013, Termofilik kaynaklardan izole edilen bacillus cinsi bakterilerin hegzavalent krom indirgemesi ve ekzopolisakkarit üretim potansiyellerinin belirlenmesi, Pamukkale Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, Doktora, Denizli.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986, Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly (Beta- hydroxybutyrate) and a Copolester of Beta-Hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, Macromolecules, 19, 2860-2864.
- Donati, E.R., Sand, W., 2007, Microbial processing of metal sulfides, Springer.
- Drake, J.W., 2009, Avoiding dangerous missense: thermophiles display especially low mutation rates, Plos Genet, 5, e1000520.
- Du, G., Si, Y. and Yu, J., 2001, Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acid on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acid by *Ralsonia eutrophus*, Biotechnology Letters, 23, 1613-1617.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dutta, A., Chaudhuri, K., 2010, Analysis of tRNA composition and folding in psychrophilic, mesophilic and thermophilic genomes: indications for thermal adaptation, *FEMS Microbiol Lett*, 305, 100–108.
- Dülger, Ç.S., 2003, Gönen, Kestanbol ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora, Trabzon.
- Dülger, S., 1997, Ayder kaplıcasından termofilik bakteri izolasyonu ve teşhisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Trabzon.
- Egorova, K., Antranikian, G., 2005, Industrial relevance of thermophilic archaea, *Current opinion in microbiology*, 8, 649-655.
- Elleuche, S., Antranikian, G., 2013, Starch-hydrolyzing enzymes from thermophiles. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. Edited by Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y. Springer, 509-533.
- Elleuche, S., Schaifers, C., Blank, S., Schroder, C., Antranikian, G., 2015, Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes, *Current Opinion in Microbiology*, 25,113–119
- Erdönmez, O., 2015, Eynal Termal Kaplıcasının prokaryotik çeşitliliğinin belirlenmesi ve proteaz üretim yeteneklerinin değerlendirilmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Eskişehir.
- Farias, S.T., Bonato, M.C., 2003, Preferred amino acids and thermostability, *Genet Mol Res*, 2, 383–393.
- Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., vd., 2012, Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes, *Proc Natl Acad Sci*, 109, 21390–5.
- Figueroa, A.M.B., 2007, A Survey of the Alkalithermophilic Prokaryotic Diversity From the Hot Spring Waters in Coamo Puerto Rico, University of Puerto Rico, Yüksek lisans tezi.
- Findlay, R.H., White, D.C., 1983, Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1, 71-78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Giedraityte, G., Kalediene, L., 2015, Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain, *Chemija*, 26, 38-45.
- Fuhrhop, J.H., Wang, T., 2004, Bolaamphiphiles, *Chem. Rev.* 104, 2901–2938
- Gillian C. B., Shabarni G., Don A. C., Adrian R. S., 2001, Bacterial community analysis of Indonesian hot springs, *FEMS Microbiology Letters*, Indonesia, 103-109.
- Glass, E.M., Wilkening, J., Wilke, A., Antonopoulos, D., Meyer, F., 2010, Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes, *Cold Spring Harb Protoc*, 5, [pdb.prot5368].
- Gliozzi, A., Relini, A., Chong, P.L.-G., 2002, Structure and permeability properties of biomimetic membranes of bolaform archaeal tetraether lipids, *J. Membr. Sci.*, 206, 131–147.
- Gliozzi, A., Rolandi, R., De Rosa, M., Gambacorta, A., 1982, Artificial black membranes from bipolar lipids of thermophilic archaeobacteria, *Biophys. J.*, 37, 563–566.
- Gogliettino, M., Riccio, A., Cocca, E., Rossi, M., Palmieri, G., Balestrieri, M., 2014, A new pepstatin-insensitive thermopsin-like protease overproduced in peptide-rich cultures of *Sulfolobus solfataricus*, *Int J Mol Sci*, 15, 3204-3219.
- Goh, KM., Chua, YS., Abdul, RNZR., 2011, A comparison of conventional and miniprimer PCR to elucidate bacteria diversity in Malaysia Ulu Slim hot spring using 16S rDNA clone library, *Rom Biotechnol Lett*, 16, 6247–55.
- Gold, T., 1992, The deep, hot biosphere, *PNAS*, 89,6045-6049.
- Gorke, B., Stulke, J., 2008, Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients, *Nat Rev Microbiol*, 6, 613–24.
- Gouda, M. K., Swellam A. E., Omar, S. H., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiological Research*, 156, 3, 201-207.
- Graham, D., Pereira, R., Barfield, D., Cowan, D., 2000, Nitrile biotransformations using free and immobilized cells of a thermophilic *Bacillus* spp., *Enzyme Microb Technol*, 26, 368-373.
- Graham, JE., Clark, ME., Nadler, DC., Huffer, S., Chokhawala, HA., Rowland, SE., Blanch, HW., Clark, DS., Robb, FT., 2011, Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment, *Nat Commun*, 2, 375.
- Gu, J., Hilser, V.J., 2009, Sequence-based analysis of protein energy landscapes reveals nonuniform thermal adaptation within the proteome, *Mol Biol Evol*, 26, 2217–2227.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guerrero-Barajas, C., Ordaz, A., Garibay-Orijel, C., García-Solares, S.M., Bastida-González, F., Zárata-Segura, P.B., 2014, Enhanced sulfate reduction and trichloroethylene (TCE) biodegradation in a UASB reactor operated with a sludge developed from hydrothermal vents sediments: process and microbial ecology, *Int Biodeterior Biodegradation*, 94, 182–91.
- Guo, F., Ju, F., Cai, L., Zhang, T., 2013, Taxonomic precision of different hypervariable regions of 16S rRNA gene and annotation methods for functional bacterial groups in biological wastewater treatment, *PLoS One*, 8, e76185.
- Güngörmedi, G., Demirbilek, M., Mutlu, M.B., Denkbaz, E.M., Çabuk, A., 2014, Polyhydroxybutyrate and Hydroxyvalerate Production by *Bacillus megaterium* Strain A1 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil *J. Appl. Polym. Sci.*, 131, 40530.
- Hakulinen, N., Turunen, O., Janis, J., Leisola, M., Rouvinen, J., 2003, Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability, *Eur J Biochem*, 270, 1399–1412.
- Han, Y., Agarwal, V., Dodd, D., Kim, J., Bae, B., Mackie, R.I., vd., 2012, Biochemical and structural insights into xylan utilization by the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*, *J Biol Chem* 87, 34946–60.
- Hankermeyer, C.R., Tjeerdema, R.S., 1999, Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms, *Reviews Of Environmental Contamination and Toxicology*, 159, 1–24.
- Hassan M.A., Bakhiet E. K. , Ali S.G., Hussien R.H., 2016, Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (04), 046-051.
- Hawkes, FR., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, DL., 2007, Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress, *Int J Hydrog Energy*, 32, 172–84.
- Heinemann, J., Hamerly, T., Maaty, W.S., Movahed, N., Steffens, J.D., Reeves, B.D., Hilmer, J.K., Therien, J., Grieco, P.A., Peters, J.W., Bothner, B., 2013, Expanding the paradigm of thiol redox in the thermophilic root of life, *Biochim Biophys Acta*, 1840, 80–85.
- Hickey, D.A., Singer, G.A., 2004, Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome Biol*, 5, 117.
- Hjorleifsdottir, S., 2002, Diversity of thermostable DNA enzymes from Icelandic hot springs, *Fjölritunarstofa Daniels Halldorssonar*, Department of Biotechnology Lund University, Sweden, pp.2-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hocking, P.J., Marchessault, R.H., 1994, Chemistry and technology of biodegradable polymers. Blackie Academic & Professional, p. 48–96.
- Holmes, P. A., 1985, Applications of PHB – A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic, *Physics in Technology*, 16, 32- 36.
- Holmes, P.A., 1988, Biologically produced PHA polymer and copolymers, In *Developments in Crystalline Polymers*, 2, 1-65.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T., 2003, Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment, *FEMS Microbiol Lett*, 221, 299–304.
- Horikoshi, K., 1998, Allkalophiles. In: K. Horikoshi and W. Grant (ed.). *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. 1-24. Wiley-Liss, Inc. New York.
- http://www.itl.nist.gov/div_898/handbook/pri/selection/pri_3362.htm, erişim tarihi: 11.4.2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798135>, erişim tarihi: 11.4.2010
- <http://www.promea.com>, erişim tarihi: 11.4.2010
- <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>; erişim tarihi: 19.02.2012
- <http://www.bacterio.cict.fr/number.html#total>, erişim tarihi: 19.02.2012
- <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>, erişim tarihi:20.09.2016.
- Huber, R., and Stetter, K.O., 1992, The Thermotogales: hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria. In: Kristjansson, JK (ed) *Thermophilic bacteria*, CRC Pres, Boca Raton, Fla, pp. 185-194.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hersberger, K. ve Pace, N.R., 1998, Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376.
- Huson, D.H., Auch, A.F., Qi, J., Schuster, S.C., 2007, MEGAN analysis of metagenomic data, *Genome Res*, 17, 377–86.
- Ibrahim, M.H.A., Steinbüchel, A., 2010, High cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. Strain MW10, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7890-7895.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ikeda, M., Clark, D.S., 1998, Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng*, 57, 624-629.
- İnan, K., 2005, Türkiye'nin çeşitli kaplıcalarından *Anoxybacillus* türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Trabzon.
- İnan, K., 2011, İzmir ve Aydın illerindeki bazı kaplıcalardan izole edilen termofilik bakteri izolatlarının moleküler taksonomisi ve D1021 izolatının glukoz izomerazının karakterizasyonu, Karadeniz Teknik Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora, Trabzon.
- Inskeep, W.P., Jay, Z.J., Tringe, S.G., Herrgård, M.J., Rusch, D.B., Committee YMPS, vd., 2013, The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem, *Front Microbiol*, 4, 67–81.
- Inskeep, W.P., Rusch, D.B., Jay, Z.J., Herrgard, M.J., Kozubal, M.A., Richardson, T.H., vd., 2010, Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function, *PLoS One*, 5, e9773.
- Isenbarger, T.A., Finney, M., Ríos-Velázquez, C., Handelsman, J., Ruvkun, G., 2008, Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world, *Appl Environ Microbiol*, 74,840–9.
- Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiegre, L., Benvegna, T., 2009, Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications, *Biochimie*, 91, 711-717.
- Jaenicke, R., 2000, Stability and stabilization of globularproteins in solution, *J Biotechnol*, 79, 193–203.
- Jaenicke, R., Bohm, G., 1998, The stability of proteins in extreme environments, *Curr Opin Struct Biol*, 8, 738–48.
- Jiang, B., Liang, X., Chen, Y., Ma, T., Liu, L., Li, J., vd., 2012, Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome. *Sci Rep*, 2, 936.
- Jiang, L., Lin, M., Li, X., Cui, H., Xu, X., Li, S., Huang, H., 2013, Genome sequence of *Thermus thermophilus* ATCC 33923, a thermostable trehalose-producing strain, *Genome Announc*, 1, e00493–e00513.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiménez, D.J., Andreote, F.D., Chaves, D., Montaña, J.S., Osorio-Forero, C., Junca, H., vd., 2012, Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes, PLoS One, 7, e52069.
- Johnson, DB., Okibe, N., Wakeman, K., Yajie, L., 2008, Effect of temperature on the bioleaching of chalcopyrite concentrates containing different concentrations of silver, Hydrometallurgy, 94, 42–7.
- Johnson, M.R., Conners, S.B., Montero, C.I., Chou, C.J., Shockley, K.R., Kelly, R.M., 2006, The *Thermotoga maritima* phenotype is impacted by syntrophic interaction with *Methanococcus jannaschii* in hyperthermophilic coculture, Appl Environ Microbiol, 72, 811–818.
- Jones, E.J., Voytek, MA., Warwick, PD., Corum, MD., Cohn, A., Bunnell, JE., vd., 2008, Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples, Int J Coal Geol, 76, 138–50.
- Jorda, J., Yeates, T.O., 2011, Widespread disulfide bonding in proteins from thermophilic archaea, Archaea, 409156.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2008, Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions, Bioresour Technol, 99, 195–9.
- Kang, SK., Cho, KK., Ahn, JK., Bok, JD., Kang, SH., Woo, JH., 2005, Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus sp.* IB-21: cloning, expression, and enzyme characterization, J Biotechnol, 116, 337–46.
- Karaboz, İ., Umay, F.B., 1994, *Pseudomonas extorquens* den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz 1994 Edirne, 14-17.
- Kashefi, K., Lovley, D. R., 2003, Extending the upper temperature limit for life, Science. 301, 934. doi:10.1126/science.1086823.
- Kembel, S.W., Wu, M., Eisen, J.A., Green, J.L., 2012, Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance, PLoS Comput Biol, 8, e1002743.
- Khan, M., Nakkeeran, E., Umesh-Kumar, S., 2013, Potential application of pectinase in developing functional foods, Annu Rev Food Sci Technol, 4, 21-34.
- Khuri, A., Mukhopadhyay, S., 2010, Response surface methodology. WIREs Computational Statistics, Vol. 2, pp. 128-149.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Killens-Cade, R., Turner, R., MacInnes, C., Grunden, A., 2014, Characterization of a thermostable, recombinant carboxylesterase from the hyperthermophilic Archaeon *Metallosphaera sedula DSM5348*, *Adv Enzyme Res*, 2, 1-13.
- Kim, B. S., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 774-777.
- Kim, M.H., Kim, H.K., Lee, J.K., Park, S.Y., Oh, T.K., 2000, Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability, *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 280-286.
- Kim, Y.B., Lenz, R.W., 2001, Polyesters from microorganisms, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 71, 51-79.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004, Rev., Methods of studying soil microbial diversity, *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169-188.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, Jr., Quast, C., Horn, M., vd., 2012, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing- based diversity studies, *Nucleic Acids Res*, 41, e1.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B., 1999, Production of medium-chain-length poly(3- hydroxyalkanoates) from Gluconate by recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2, 540-548.
- Koga, Y., Tanaka, S., Sakudo, A., Tobiume, M., Aranishi, M., Hirata, A., Takano, K., Ikuta, K., Kanaya, S., 2014, Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 2113- 2120.
- Kongjan, P., Kotay, M., Min, B., 2010, Angelidaki I. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture, *Biotechnol Bioeng*, 105, 899-908.
- Kotelnikova, S., 2002, Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface, *Earth Sci Rev*, 58, 367-95.
- Kreil, D.P., Ouzounis, C.A., 2001, Identification of thermophilic species by the amino acid compositions deduced from their genomes, *Nucleic Acids Res*, 29, 1608-1615.
- Kristjonsson J. K. ve Stetter K.O., 1991, *Thermophilic Bacteria* Thermophilic Bacteria (Ed:Kristjonsson J.K) CRC Pres, Inc, London, 1-13.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011, Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Res*, Article ID: 280696.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuisiene, N., Raugalas, J., Chitavichius, D., 2004, *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1991–5.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y., Doi, Y., 1989, Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 569–7.
- Labuzek, S., Radecka, I., 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 353-357.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B., Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Lavana, M., Cheema, S., Sarma, P.M., Ganapathi, R., Lal, B., 2014, Methanogenic potential of a thermophilic consortium enriched from coal mine, *Int Biodeter Biodegr*, 93, 177–85.
- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P.H., 2001, Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 515-524.
- Lee, S.Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.
- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N., Chang, Y.K., 1994, Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 32, 203-211.
- Li, H., Ji, X., Zhou, Z., Wang, Y., Zhang, X., 2010, *Thermus thermophilus* proteins that are differentially expressed in response to growth temperature and their implication in thermoadaptation, *J Proteome Res*, 9, 855–864.
- Li, C., Du, M., Cheng, B., Wang, L., Liu, X., Ma, C., Yang, C., Xu, P., 2014, Close relationship of a novel Flavobacteriaceae alpha-amylase with archaeal alpha-amylases and good potentials for industrial applications, *Biotechnol Biofuels*, 7, 18.
- Li, C., Fang, H.H., 2007, Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures, *Crit Rev Environ Sci Technol*, 37, 1–39.
- Li, S., Zhong, H., Hu, Y., Zhao, J., He, Z., Gu, G., 2014, Bioleaching of a low-grade nickel-copper sulfide by mixture of four thermophiles. *Bioresour Technol*, 153, 300–6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, H.Y., Chuang, H.H., Lin, F.P., 2008, Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the non-necessity of its 100 C-terminal amino acid residues, *Extremophiles*, 12, 641-650.
- Lin, L., Xu, J., 2013, Dissecting and engineering metabolic and regulatory networks of thermophilic bacteria for biofuel production, *Biotechnol Adv*, 31, 827-37.
- Littlechild, J.A., Guy, J.E., Isupov, M.N., 2004, Hyperthermophilic dehydrogenase enzymes, *Biochem Soc Trans*, 32, 255-258.
- Liu, P.Y.F., Wu, W.L., 1997, Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex, *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 28, 19-28.
- Lobry, J.R., Necsulea, A., 2006, Synonymous codon usage and its potential link with optimal growth temperature in prokaryotes, *Gene*, 385, 128-136.
- Loosdrecht, M. C. M., Pot, M. A., Heijnen, J. J., 1997, Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, *Wat. Sci. Tec.*, 35, 1, 41-47.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., 2001, Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate, *Biomaterials*, 22, 2447-2452.
- Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval A., Naharro, G., Olivera E.R., 2003, Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 251-260.
- Lundgren, D.G., Alper, R., Schnaitman, C., Marchessault, R.H., 1965, Characterization of poly- β -hydroxybutyrate extracted from different bacteria, *Journal of Bacteriology*, 89, 245-251.
- Lynn, D.J., Singer, G.A., Hickey, D.A., 2002, Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria, *Nucleic Acids Res*, 30, 4272-4277.
- Ma, K., Adams, W.W., 1999, An unusual oxygen-sensitive, iron- and zinc containing alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, *J. Bacteriol*, 181, 1163-1179.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L., Zhang, J., 1996, Application of network BLAST server, *Methods Enzymol*, 266, 131-141.
- Madison, L.L., Huisman, G.W., 1999, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Madigan, M.T., Martinco, J.M., Parker, J., 2000, Prokaryotic diversity the Archaea. Brock Biology of Microorganisms, Ed: Corey, P.F., 546-571.
- Madigan, T. M., Martinko, J. M., Parker, J. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, (Çev. C. Çökmüş), Palme Yayıncılık, Ankara, Turkey, 992s.
- Mahale, K.N., Kempraj, V., Dasgupta, D., 2012, Does the growth temperature of a prokaryote influence the purine content of its mRNAs, *Gene*, 497, 83–89, 2012.
- Mallick, P., Boutz, DR., Eisenberg, D., Yeates, TO., 2002, Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9679–9684.
- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Ottolina, G., Carrea, G., Rossi, M., 1998, Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily, *Biochem J*, 332, 203-212.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001, Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments, *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 650–63.
- Matzke, J., Schwermann, B., Bakker, E.P., 1997, Acidostable and acidophilic proteins: the example of the alpha-amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 118, 475-479.
- Mccool, G.J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M.C., 1996, Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 138, 41-48.
- Mehta, D., Satyanarayana, T., 2014, Domain C of thermostable alpha- amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 4503-4519.
- Meng, B., Qian, Z., Wei, F., Wang, W., Zhou, C., Wang, Z., Wang, Q., Tong, W., Ma, Y., Xu, N., Liu, S., 2009, Proteomic analysis on the temperature-dependent complexes in *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Proteomics*, 9, 3189–3200.
- Meister, A., Blume, A., 2007, Self-assembly of bipolar amphiphiles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, 12, 138–147.
- Miyake, M., Miyamoto, C., Schnackenberg, J., Kuraane, R., Asada, Y., 2000, Phosphotransacetylase as a key facytor in biological production of polyhydroxybutyrate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 1039-1044.
- Mizobata, T., Kagawa, M., Murakoshi, N., Kusaka, E., Kameo, K., Kawata, Y., Nagai, J., 2000, Overproduction of Thermus sp. YS 8–13 manganese catalase in *Escherichia coli* production of soluble apoenzyme and in vitro formation of active holoenzyme, *Eur J Biochem* 267, 4264–4271.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S., 2011, Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria, *J Appl Microbiol*, 111, 525–36.
- Mnif, S., Sayadi, S., Chamkha M., 2014, Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. *Int Biodeter Biodegr*, 86:258–64.
- Mocali, S., Benedetti. A., 2010, Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology, *Res. Microbiol*, 161, 497–505.
- Montgomery, D.C., 1991. *Design and Analysis of Experiments*. 3. Baskı, Wiley, New York.
- Mori, H., Maruyama, F., Kurokawa, K., 2010, VITCOMIC: visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences, *BMC Bioinformatics*, 11, 332–40.
- Moter, A., Gobel, U.B., 2000, Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *J. Microbiol*, 41,2, 85–112.
- Muller, S., Pfannmoller, M., Teuscher, N., Heilmann, A., Rothe, U., 2006, New method for surface modification of nanoporous aluminum oxide membranes using tetraether lipid, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2, 16–22.
- Muller, J.E., Litsanov, B., Bortfeld-Miller, M., Trachsel, C., Grossmann, J., Brautaset, T., Vorholt, J.A., 2014, Proteomic analysis of the thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus* MGA3, *Proteomics*, 14, 725–737.
- Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez- Valin, F., Bernardi, G., 2005, The correlation between genomic G_C and optimal growth temperature of prokaryotes is robust: a reply to Marashi and Ghalanbor, *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 357–360.
- Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez- Valin, F., Bernardi, G., 2006, Genomic GC level, optimal growth temperature, and genome size in prokaryotes, *Biochem Biophys Res Commun*, 347, 1–3.
- Munoz, P. A., Flores, P. A., Boehmwald, F. A. and Blamey, J. M., 2011, Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island Antarctic *Science* 23(6), 549–555.
- Muyzer, G., 1999, DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ecosystems, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G., 1993, Profiling in complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 1995, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. New York: Wiley.
- Nakatsu, C.H., 2006, Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Soil Science Society of America Journal*, 71 (2), 562-571.
- Nakka, M., Iyer, R.B., Bachas, L.G., 2006, Intersubunit disulfide interactions play a critical role in maintaining the thermostability of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Protein J*, 25, 17-21.
- Namiki, T., Hachiya, T., Tanaka, H., Sakakibara, Y., 2012, MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads, *Nucleic Acids Res*, 40, e155.
- Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev, and M. V. Ivanov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:433-446.
- Nelson, KE., Clayton, RA., Gill, SR., Gwinn, ML., Dodson, RJ., Haft, DH., Hickey, EK., Peterson, JD., Nelson, WC., Ketchum, KA., McDonald, L., Utterback, TR., Malek, JA., Linher, KD., Garrett, MM., Stewart, AM., Cotton, MD., Pratt, MS., Phillips, CA., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, GG., Fleischmann, RD., Eisen, JA., White, O., Salzberg, SL., Smith, HO., Venter, JC., Fraser, CM., 1999, Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*, *Nature*, 399, 323-329.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., and Antranikian, G., 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 711-29.
- Niehaus, F., Peters, A., Groudieva, T., Antranikian, G., 2000, Cloning, expression and biochemical characterisation of a unique thermostable pullulan-hydrolysing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus aggregans*, *FEMS Microbiol Lett*, 190, 223-229.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nisha, M., Satyanarayana, T., 2013, Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 6279-6292.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abrham, W. R., Timmis, K.N., 1999, Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenylpolluted moorland soil, *Environmental Microbiology*, 1, 199-212.
- Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, KB., Johnson, DB., 2003, Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred tank bioleaching operation, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1936–1943.
- Ol'khov, A.A., Iordanskii, A.L., and Zaikov, G.E., 2014, Morphology and mechanical parameters of biocomposite based on LDPE-PHB, *J. Balkan Tribol. Assoc.*, 20, 101–110.
- Omelchenko, M.V., Wolf, Y.I., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M.J., Koonin, E.V., Makarova, K.S., 2005, Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance, *BMC Evol Biol*, 5, 57.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M., 2011, Interactive metagenomic visualization in a web browser, *BMC Bioinformatics*, 12, 385–93.
- Özler, C., 1997, Cevap Yüzeyi Yöntemlerinin Süreç İyileştirme Amacı İle Kullanılması Üzerine Bir Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Özşahin, E., Kaymaz, Ç.K., 2013, Türkiye'nin Termal Su Kaynaklarının Coğrafi Açıdan Değerlendirilmesi, Atatürk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Sosyal Bilimler Dergisi 50, 25-38
- Öztürk, E., 2000, Termofilik streptomyces'lerin izolasyonu ve nümerik taksonomisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, Samsun.
- Page, W.J., 1992, Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 117-121.
- Page, W.J., Sherburne, R., D'Elia, L., Graham, L.L., 1995, Poly(β -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 22-31.
- Pang, J., Allemann, R.K., 2007, Molecular dynamics simulation of thermal unfolding of *Thermatoga maritima* DHFR, *Phys Chem Chem Phys*, 9, 711–718.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pantazaki, AA., Tambaka, MG., Langlois, V., Guerin, P., Kyriakidis, DA., 2004, Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: purification and biochemical properties of PHA synthase, *Mol Cell Biochem*, 254,173–83.
- Pantazaki, A.A, Papanephytou, C.P., Pritsa, A.G., Kyriakides, M.L., Kyriakidis, D.A., 2009, Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8, *Process Biochemistry*, 44, 847-853.
- Papanephytou, C.P., Pantazaki, A.A., Kyriakidis, DA., 2009, An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 4, p 659–668.
- Parisutham, V., Kim, TH., Lee, SK., 2014, Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production, *Bioresour Technol* 161, 431–40.
- Park, S.H., Park, K.H., Oh, B.C., Alli, I., Lee, B.H., 2011, Expression and characterization of an extremely thermostable beta- glycosidase (mannosidase) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* DSM3638, *N Biotechnol*, 28, 639-648.
- Patel, G., Sprott, G., 1999, Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems, *Crit Rev Biotechnol*, 19, 317-357.
- Patel, G.B., Agnew, B.J., Deschatelets, L., Fleming, L.P., Sprott, G.D., 2000, In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems, *Int. J. Pharm*, 194, 39–49.
- Patel, G.B., Zhou, H., KuoLee, R., Chen, W., 2004, Archaeosomes as adjuvants for combination vaccines, *J. Liposome Res*, 14(3), 191-202.
- Pechkove E. and Riekal C., 2011, Synchiotion radiation and structural proteomics, Taylor & Francis Group.
- Pedone, E., Ren, B., Ladenstein, R., Rossi, M., Bartolucci, S., 2004, Functional properties of the protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: a member of a novel protein family related to protein disulfide-isomerase, *Eur J Biochem*, 271, 3437–3448.
- Peng, Y., Leung, H.C., Yiu, S.M., Chin, F.Y., 2011, Meta-IDBA: a de novo assembler for metagenomic data, *Bioinformatics*, 27, i94–i101.
- Peng, Y., Leung, H.C., Yiu, S.M., Chin, F.Y., 2012, IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth, *Bioinformatics*, 28, 1420–8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perugino, G., Valenti, A., D'Amaro, A., Rossi, M., Ciaramella, M., 2009, Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms, *Biochem Soc Trans*, 37, 69–73.
- Pham, V.H., Kim, J., 2012, Cultivation of unculturable soil bacteria, *Trends Biotechnol*, 30, 475–84.
- Piriçcioğlu, H., 2010, Dargeçit ve Güçlükonak sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri izolasyonu ve tanımlanması, Dicle Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Diyarbakır.
- Plumb, J.J., Haddad, C.M., Gibson, J.A., Franzmann, P.D., 2007, *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description, *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1418–23.
- Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 2, 131-155.
- Pysz, M.A., Ward, D.E., Shockley, K.R., Montero, C.I., Conners, S.B., Johnson, M.R., Kelly, R.M., 2004, Transcriptional analysis of dynamic heat-shock response by the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *Extremophiles*, 8, 209–217, 2004.
- Qin, W., Yang, C., Lai, S., Wang, J., Liu, K., Zhang, B., 2013, Bioleaching of chalcopyrite by moderately thermophilic microorganisms, *Bioresour Technol*, 129, 200–8.
- Qian, Z., Zhao, J., Bai, X., Tong, W., Chen, Z., Wei, H., Wang, Q., Liu, S., 2013, Thermal stability of glucokinases in *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Bio Med Res Intl*, 2013, 646539.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J. A., 1990, Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 7, 2093-2098.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., vd., 2010, Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains, *Bioresour Technol*, 101, 8798–806.
- Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., Sharp, R., 1992, Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, 263–7.
- Rawlings, D.E., 1997, *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*, Springer-Verlag, Berlin.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A., 2014, MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res*, 42, D503-D509.
- Rehm, B.H., 2003, Polyester synthases: natural catalysts for plastics, *Biochemical Journal*, 376, 15–33.
- Rosovitz, M., J., Voskuil, M.I., Chambliss, G.H., 1998, *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Oxford University Press, Ninth Edition, Volume 2, New York.
- Ryu, H.W., Yoo, S.K., Choi, J.M., Cho, K.S., Cha, D.K., 2009, Thermophilic biofiltration of H₂S and isolation of a thermophilic and heterotrophic H₂S-degrading bacterium, *Bacillus sp. TSO3*, *J Hazard Mater*, 168, 501–6.
- Running, W.E., Reilly, J.P., 2009, Ribosomal proteins of *Deinococcus radiodurans*: their solvent accessibility and reactivity, *J Proteome Res*, 8, 1228–1246.
- Sabath, N., Ferrada, E., Barve, A., Wagner, A., 2013, Growth temperature and genome size in bacteria are negatively correlated, suggesting genomic streamlining during thermal adaptation, *Genome Biol Evol*, 5, 966–977.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R. and Schippers, A., 1995, *Appl. Microbial, Biotechnol*, 43, 961-966.
- Sanz, J.L., Kochling, T.K., 2007, Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview”, *Process Biochemistry*, 42 119–133.
- Saunders, N.F., Thomas, T., Curmi, P.M., 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 Res*, 13, 1580–1588.
- Sar, P., Kazy, S.K., Paul, D., Sarkar, A., 2013, Metal bioremediation by thermophilic microorganisms. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, Springer, p. 171–201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarıgül, N., 2007, Ege bölgesindeki çeşitli sıcak su kaynaklarından thermus genusu bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve β -galaktosidaz aktivitesinin saptanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Doktora, İzmir.
- Satyanarayana, T., Chandralata, R., Shivaji, S., 2005, Extremophilic microbes: Diversity an perspectives, Current Science, 89, 10.
- Schmidt-Dannert, C., Rúa, M.L., Atomi, H., Scmid, R.D., 1996, Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. Biochim Biophys Acta, 1301, 105-114.
- Sharp, R. J., Riley, P.W. ve White, D., 1991, Heterortophic Thermophilic Bacilli, (Ed: Kristjonsson, J.K), CRC Press, London, 2, 19-50.
- Shockley, K.R., Ward, D.E., Chhabra, S.R., Connors, S.B., Montero, C.I., Kelly, R.M., 2003, Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, Appl Environ Microbiol, 69, 2365–2371.
- Schroder, C., Elleuche, S., Blank, S., Antranikian, G., 2014, Characterization of a heat-active archaeal beta-glucosidase from a hydrothermal spring metagenome, Enzyme Microb Technol, 57, 48-54.
- Schuster, B., Pum, D., Sleytr, U.B., 1998, Voltage clamp studies on S-layer-supported tetraether lipid membranes, Biochim. Biophys. Acta Biomembr, 1369, 51–60.
- Sen S.K, Raut S, Dora T.K, Mohapatra P.K.D., 2014, Contribution of hot spring bacterial consortium in cadmium and lead bioremediation through quadratic programming model, J Hazard Mater, 265, 47–60.
- Seshadri, R., Kravitz, S.A., Smarr, L., Gilna, P., Frazier, M., 2007, CAMERA: a community resource for metagenomics, PLoS Biol, 5, e75.
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003, Microbial hemicellulases, Curr Opin Microbiol, 6, 219-228.
- Shao, H., Xu, L., Yan, Y., 2014, Biochemical characterization of a carboxylesterase from the archaeon *Pyrobaculum sp.* 1860 and a rational explanation of its substrate specificity and thermostability, Int J Mol Sci, 15, 16885-16910.
- Sharafi, H., Abdoli, M., Hajfarajollah, H., Samie, N., Alidoust, L., Abbasi, H., vd., 2014, First report of a lipopeptide biosurfactant from thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 newly isolated from municipal landfill site, Appl Biochem Biotechnol, 173, 1236–49.
- Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M., 2013, Microbial pectinase: sources, characterization and applications, Rev Environ Sci Bio/Technol, 12, 45-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shcherbakov, D., Dontsova, M., Tribus, M., Garber, M., Piendl, W., 2006, Stability of the 'L12 stalk' in ribosomes from mesophilic and (hyper)thermophilic Archaea and Bacteria, *Nucleic Acids Res* 34, 5800–5814.
- Sheu, D. S., Chen W. M., Yang J. Y., Chang R. C., 2009, Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, 44 289–294
- Shi, H., Zhang, Y., Li, X., Huang, Y., Wang, L., Wang, Y., Ding, H., Wang, F., 2013, A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization, *Biotechnol Biofuels*, 6, 26.
- Shi, R., Li, Z., Ye, Q., Xu, J., Liu, Y., 2013, Heterologous expression and characterization of a novel thermo-halotolerant endoglucanase Cel5H from *Dictyoglomus thermophilum*, *Bioresour Technol*, 142, 338-344.
- Shih, T.W., Pan, T.M., 2011, Stress responses of thermophilic *Geobacillus* sp. NTU 03 caused by heat and heat-induced stress, *Microbiol Res*, 166, 346–359.
- Singer, G.A., Hickey, D.A., 2003, Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content, *Gene*, 317, 39–47.
- Skirnisdottir, S., 2000. Phylogenetic characterization of microbial mats and isolation of *Thermus* spp. and sulfur-oxidizing bacteria from Icelandic hot springs. Fjölrítunarstofa Daniels Halldorssonar, Department of Biotechnology Lund University, Sweden, pp. 3-6.
- Slater, S., Gallaher, T., Dennis, D., 1992. Production of polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1089-1094.
- Sleytr, U.B., Sara, M., 1997, Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications, *Trends Biotechnol*, 15(1), 20-26.
- Son, Ç.D., 1999, Isolation and optimization of growth conditions of thermophilic bacteria from Turkish soils and hot springs. Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Sprott, G.D., Tolson, D.L., Patel, G.B., 1997, Archaeosomes as novel antigen delivery systems, *FEMS Microbiol Lett*, 154(1), 17- 22.
- Stefanova, M.E., Schwerdtfeger, R., Antranikian, G., Scandurra, R., 1999, Heat-stable pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: characterization and refolding after guanidinium chloride-induced unfolding, *Extremophiles*, 3, 147-152.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Steinbüchel, A., Fuchtenbusch, B., 1998, Bacterial and other biological systems for polyester production, TIBTECH, 16, 419-427.
- Steinbüchel, A., Schlegel, H.G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, Molecular Microbiology, 5, 535-42.
- Steinbüchel, A., Valentin, H., 1995, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiology Letters, 128, 219-28.
- Stetter, K.O., 2001. In: Astrobiology-The quest for conditions of life (G. Horneck and Ch. Baumstark-Khan, eds.), Springer verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong, London, Milan, Paris, Tokyo, pp. 169-184.
- Stewart, E.J., 2012, Growing unculturable bacteria. J Bacteriol, 194, 4151-60.
- Stubbe, J., Tian, J., 2003, Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase, Natural Product Reports, 20, 445-57.
- Su, X., Han, Y., Dodd, D., Moon, Y.H., Yoshida, S., Mackie, R.I., vd., 2013, Reconstitution of a thermostable xylan-degrading enzyme mixture from the bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*, Appl Environ Microbiol, 79, 1481-90.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S., 2007, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants, Rev., Biotechnology Advances, 25, 148-175.
- Şanyılmaz M., 2006, Deney tasarımı ve kalite geliştirme faaliyetlerinde Taguchi yöntemi ile bir uygulama, Yüksek Lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi, 150 s.
- Tabak, H.H., Lens, P., van Hullebusch, E.D., Dejonghe, W., 2005, Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides-1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport, Rev Environ Sci Biotechnol, 4, 115-56.
- Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H., Doi, Y., 2001, Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system, FEMS Microbiology Letters, 198, 65-71.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G.J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., Uchiyama, I., 2004, Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*, Nucleic Acids Res, 32, 6292-6303.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takeda, M., Koizumi, J.I., Yabe, K., Adachi, K., 1998, Thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of a thermophilic strain of *Leptothrix* sp. isolated from a hot spring Journal of Fermentation and Bioengineering, 85-4, 375-380.
- Talluri, S., Raj, SM., Christopher, LP., 2013, Consolidated bioprocessing of untreated switchgrass to hydrogen by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903, Bioresour Technol, 139, 272–9.
- Tao, W., Shengxue, F., Duobin, M., Xuan, Y., Congcong, D., Xihua, W., 2013, Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution of racemic ketoprofen ethyl ester, J Mol Catal B Enz, 85–86, 23-30.
- Teh, B.S., Abdul Rahman, A.Y., Saito, J.A., Hou, S., Alam, M., 2012, Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Thermus* sp. strain CCB_ US3_UF1, J Bacteriol 194, 1240.
- Tekaia, F., Yeramian, E., Dujon, B., 2002, Amino acid composition of genomes, lifestyles of organisms, and evolutionary trends: a global picture with correspondence analysis, Gene, 297, 51–60.
- Thielemann, T., Cramer, B., Schippers, A., 2004, Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? Org Geochem 2004;35:1537–49.
- Thieman, W.J., Palladino, M.A., 2013, Biyoteknolojiye Giriş, (Çeviri M. Tekeoğlu), Ankara Palme Yayıncılık.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012, Metagenomics-a guide from sampling to data analysis, Microb Inform Exp, 2, 3.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, TL., Flynn, S.J., 1999, Opening the black box of soil microbial diversity, Appl Soil Ecol, 13, 109–22.
- Toplak, A., Wu, B., Fusetti, F., Quaedflieg, PJ., Janssen, DB., 2013, Proteolysin, a novel highly thermostable and cosolvent- compatible protease from the thermophilic bacterium *Coprothermobacter proteolyticus*, Appl Environ Microbiol, 79: 5625-5632.
- Treangen, T.J., Koren, S., Sommer, D.D., Liu, B., Astrovskaia, I., Ondoy, B., vd., 2013, MetAMOS: a modular and open source metagenomic assembly and analysis pipeline, Genome Biol, 14, R2.
- Trauger ,SA., Kalisak, E., Kalisiak, J., Morita, H., Weinberg, MV., Menon, AL., Poole, FL., 2nd Adams, MW., Siuzdak, G., 2008, Correlating the transcriptome, proteome, and metabolome in the environmental adaptation of a hyperthermophile, J Proteome Res, 7, 1027–1035.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsudome, M., Deguchi, S., Tsujii, K., Ito, S., Horikoshi, K., 2009, Versatile solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles, *Appl Environ Microbiol*, 75, 4616–9.
- Türker, C., 2014, A-amilaz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu, *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Osmaniye.*
- Urbietta M. S., Donati E. R., Chan K. G., Shahar S., Sin L. L., Goh K.M., 2015, Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications *Biotechnology Advances* 33, 633–647.
- Van den B., 2003, Extremophiles as a source for novel enzymes, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213–218.
- Van Noort, V., Bradatsch, B., Arumugam, M., Amlacher, S., Bange G, Creevey C, Falk S, Mende, DR., Sinning, I., Hurt, E., Bork, P., 2013, Consistent mutational paths predict eukaryotic thermostability, *BMC Evol Biol*, 13, 7.
- Vaneechoutte. M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K., 1992, Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA), *FEMS Microbiol Lett*, 15, 72(3), 227–233.
- Vartoukian, SR., Palmer, RM., Wade, WG., 2010, Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria, *FEMS Microbiol Lett*, 309, 1–7.
- Vettone, A., Perugino, G., Rossi, M., Valenti, A., Ciaramella, M., 2014, Genome stability: recent insights in the topoisomerase reverse gyrase and thermophilic DNA alkyltransferase, *Extremophiles*, 18, 895– 904.
- Vijayalaxmi, S., Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Mulimani, V.H., Sreeramulu, K., 2013, Production of extremely alkaliphilic, halotolerant, detergent, and thermostable mannanase by the free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* PPKS-2. Purification and characterization, *Appl Biochem Biotechnol*, 171, 382-395.
- Wang, J., Ma, T., Zhao, L., Lv, J., Li, G., Liang, F., Liu, R., 2008, PCR–DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir, *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 1981–1987 DOI 10.1007/s11274-008-9694-6.
- Wang, L., Cheng, G., Ren, Y., Dai, Z., Zhao, ZS., Liu, F., Li, S., Wei, Y., Xiong, J., Tang, XF., 2014, et al.: Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99.
- Wang, S., 2005, Copper leaching from chalcopyrite concentrates, *JOM*, 57, 48–51.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, Y., Leung, H.C., Yiu, S.M., Chin, F.Y., 2012, MetaCluster 5.0: a two-round binning approach for metagenomic data for low-abundance species in a noisy sample, *Bioinformatics*, 28, i356–62.
- Wang, J., Zhao, C., Meng, B., Xie, J., Zhou, C., Chen, X., Zhao, K., Shao, J., Xue, Y., Xu, N., Ma, Y., Liu, S., 2007, The proteomic alterations of *Thermoanaerobacter tengcongensis* cultured at different temperatures, *Proteomics*, 7, 1409–1419, 2007.
- Weber, C.J., 2000, Biobased Packaging Materials for the food Industry, The EU Directorate 12, Frederiksberg.
- Williams, R.A.D., ve Da Costa, M.S., 1994, The Genus *Thermus* and Related Microorganisms, *Prokaryotes*, (Ed:Ballows A., Türüper H.G., Dworkin M., Harder W., Shleifer K.-H.), New York: Springer-Verlag, New York, 3745-3750.
- Wilson, CM., Yang, S., Rodriguez, M Jr., Ma, Q., Johnson, CM., Dice, L., Xu, Y., Brown, SD., 2013, *Clostridium thermocellum* transcriptomic profiles after exposure to furfural or heat stres, *Biotechnol Biofuels*, 6, 133.
- Witholt, B., Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length polyhydroxyalkanoates, a versatile set of bacterial bioplastics, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 279-285.
- Woodward, J., Orr, M., Cordray, K., Greenbaum, E., 2000, Biotechnology: enzymatic production of biohydrogen, *Nature*, 405, 1014–5.
- Wu, H., Yu, X., Chen, L., Wu, G., 2014, Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27, *Protein Expr Purif*, 95, 22-27.
- Wu, Q., Huang, H.H., Hu, G.H., Chen, J.C., Ho, K.P., Chen, G.Q., 2001, Production of poly-3- hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 80, 111-118.
- Xie, Y., Wu, G., Tang, J., Luo, R., Patterson, J., Liu, S., vd., 2014, SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads, *Bioinformatics*, 30, 1660–6.
- Yangala, K., Suryanarayana, T., 2007, Studies on structural stability of thermophilic *Sulfolobus acidocaldarius* ribosomes, *Indian J Biochem Biophys*, 44, 19–25.
- Yılmaz, M., Beyatlı, Y., 2003. Biyoplastik: Poli-β-Hidroksibütirat (PHB), *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 09, 1-33.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yoon, S.H., Reiss, D.J., Bare, J.C., Tenenbaum, D., Pan, M., Slagel, J., Moritz, R.L., Lim, S., Hackett, M., Menon, A.L., Adams, M.W., Barnebey, A., Yannone, S.M., Leigh, J.A., Baliga, N.S., 2011, Parallel evolution of transcriptome architecture during genome reorganization, *Genome Res*, 21, 1892–1904.
- Yun, S.H., Choi, C.W., Kwon, S.O., Lee, Y.G., Chung, Y.H., Jung, H.J., Kim, Y.J., Lee, J.H., Choi, J.S., Kim, S., Kim, S.I., 2011, Enrichment and proteome analysis of a hyperthermostable protein set of archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1. *Extremophiles*, 15, 451–461.
- Zagar, J., 2000, The end of cheap conventional oil, *The Proceedings of Energy Efficiency Policy Synoposium*.
- Zeldovich, KB., Berezovsky, IN., Shakhnovich, EI., 2007, Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation, *PLoS Comput Biol*, 3, e5.
- Zhang, X-Z., Zhang, Y-P., 2013, Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, vol 1. Edited by Zhang X-Z. El-Enshasy HA, Thongchul N: John Wiley & Sons, Inc.; 2013:131-146.
- Zhang, XY., Fan, X., Qiu, YJ., Li, CY., Xing, S., Zheng, YT., Xu, JH., 2014, Newly identified thermostable esterase from *Sulfobacillus acidophilus*: properties and performance in phthalate ester degradation, *Appl Environ Microbiol*, 80, 6870-6878.
- Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., 2001, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkan *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 5–21.
- Zitouni, M., Fortin, M., Scheerle, RK., Letzel, T., Matteau, D., Rodrigue, S., Brzezinski, R., 2013, Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus sp.* 1794 newly isolated from compost, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 5801-5813.

ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

ADI SOYADI: Serap GEDİKLİ
DOĞUM TARİHİ: 19.01.1983
DOĞUM YERİ: ESKİŞEHİR
E-POSTA: serapedikli@gmail.com

2. EĞİTİM

2016 Doktora Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji/Mikrobiyoloji
2008 Yüksek Lisans Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji/Mikrobiyoloji
2006 Lisans Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

3. TAMAMLADIĞI TEZLER

2016 Doktora Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji/Mikrobiyoloji Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Poli- β -Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi
2008 Yüksek Lisans Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji/Mikrobiyoloji Cesitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği

4. GÖREVLER

2015- Devam Ediyor Uzman/Ulusal Projeler Koordinatörü Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi (ETTOM)

4. PROJELER

1- Çeşitli Makrofungus İzolatları ile Lakkaz Enzimi Üretimi ve Çevresel Kirleticilerin Biyoyıkımında Kullanılabilirliği. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK, 2008 -2010
2- Aşırı asidik ortamlarda mikrobiyal çeşitliliğin geleneksel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve biyodesülfürizasyonda kullanılabilirliği, Araştırmacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK, 2011-2013.

- 3- Asidik maden drenaj ortamlarında fungal çeşitliliğin geleneksel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi, Araştırmacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK, 2012-2013
- 4- Naşa Termal Kaplıcasının Mikrobiyal Çeşitliliğinin Klasik Mikrobiyolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK (A2), 2012- 2016.
- 5- Çitgöl termal kaplıcasının prokaryotik çeşitliliğinin klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi, izolatların biyopolimer üretim yeteneklerinin araştırılması, Araştırmacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK, 2013-devam ediyor.
- 6- Mikrobiyal gübre hazırlanmasında kullanılabilecek bakterilerin eldesi ve etkinliklerin laboratuvar ve sera ölçeğinde araştırılması, Araştırmacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK (Üniversite Sanayi İşbirliği), 2013- 2016.
- 7-Mikrobiyal Hyaluronik Asit Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Araştırmacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK, 2014-devam ediyor
- 8- Streptococcus equi'den üretilen hyaluronik asidin enzimatik yıkımı ve bazı fiziksel koşullardaki kararlılığı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK, 2014-2016.
- 9-Kültürden Bağımsız Analiz Yöntemiyle Alveolar Osteitis'in Dental Mikrobiyal Kompozisyonunun Belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK, 2016-devam ediyor.

5. MAKALELER

A-1 SCI-Expanded , SSCI, AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale

- 1- Cabuk A, Akar T, Tunali S and **Gedikli S**, “Biosorption of Pb(II) by industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on the biomatrix of cone biomass of *Pinus nigra*: Equilibrium and mechanism analysis”, Chemical Engineering Journal, 2007, 131, 293-300.
- 2- Ozel, Y.K., **Gedikli, S.**, Aytar, P., Unal, A., Yamac, M., Çabuk, A., Kolankaya N., “New fungal biomasses for cyanide biodegradation” Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(4), 431-435.
- 3- **Gedikli, S.**, Aytar, P., Ünal, A., Yamaç, M., Çabuk, A., Kolankaya, N., “Enhancement with inducers of laccase production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2,4,5-trichlorophenol” Electronic Journal of Biotechnology, 2010, 13(6).
- 4- Şaşmaz, S., **Gedikli, S.**, Aytar, P., Güngörmedi G., Çabuk, A., Ünal A., N. Kolankaya, “Decolorization potential of some reactive dyes with crude laccase and laccase mediated system” Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(3) 346-361.
- 5- Aytar, P., **Gedikli, S.**, Şam, M., Ünal, A., Çabuk, A., Kolankaya N., Yürüm, A., “Desulphurization of Some Low-rank Turkish Lignites with Crude Laccase Produced from *Trametes versicolor* ATCC 200801” Fuel Processing Technology, 2011, 92(1) 71-76.
- 6- Çabuk, A., Sıdır Y.G., Aytar P., **Gedikli, S.**, Sıdır, I. “Dechlorination of some chlorinated compounds by *Trametes versicolor* ATCC200801 crude laccase and quantitative structure–activity relationships analysis on toxicity”, Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2012, 47, 1938-1947.
- 7- Bireller, E.S., Aytar, P., **Gedikli, S.**, Cabuk, A., “Removal of some reactive dyes by untreated and pretreated *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol fermentation waste”, Journal of Scientific & Industrial Research (JSIR), 2012, 71, 632-639.
- 8- Aytar, P., **Gedikli, S.**, Sam M., Farizoglu B., Çabuk A., “Sequential treatment of olive oil mill waste water with adsorption, biological and photo-Fenton oxidation”, Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20, 3060-3067.

- 9- Çabuk, A., **Gedikli, S.**, Aytar, P., Çelikdemir, M., “Color removal of reactive textile dyes from aqueous solution by raw and modified fungal biosorbent”, Environmental Engineering and Management Journal, 2013, accepted.
- 10- Çabuk, A., Aytar P., **Gedikli S.**, Özel YK., Kocabiyik E., “Biosorption of acidic textile dyestuffs from aqueous solution by *Paecilomyces* sp. isolated from acidic mine drainage”, 2013, Environmental Science and Pollution Research, 20, 4540-4550.
- 11- Özçelik B., Aytar P. **Gedikli S.**, Yardımcı E., Çalışkan F., Çabuk A., “Production of an alkaline protease using *Bacillus pumilus* D3 without inactivation by SDS, Its Characterization and Purification”, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2013, DOI: 10.3109/14756366.2013.788503.
- 12- Aytar P., **Gedikli S.**, Buruk Y., Çabuk A., Burnak N., Lead and Nickel Biosorption with a Fungal Biomass Isolated from Metal Mine Drainage: Box-Behnken Experimental Design, International Journal of Environmental Science Technology, 2013, DOI 10.1007/s13762-013- 0354-5.
13. **Gedikli S.**, Aytar P., Buruk Y., Apohan E., Çabuk A., Yesilada O., Burnak N., Laccase production and dye decolorization by *Trametes versicolor*: Application of Taguchi and Box- Behnken Methodologies, Turkish Journal of Biochemistry, 2014, accepted.
14. Yalçın E., **Gedikli S.**, Çabuk A., Karahaliloğlu Z., Demirbilek M., Bayram C., Şam M., Sağlam N., Denkbaş EB., Silk fibroin/nylon-6 blend nanofilter matrix for copper removal from aqueous solution, Clean Technologies and Environmental Policy, 2014, accepted.

A-2 SCI-Expanded, SSCI ve AHCI dışındaki uluslararası indeksler tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale.

- 1- **Gedikli, S.**, Tabak, Ö., Tomsuk, Ö., Çabuk A., “Effect of Microwaves on Some Gram Negative and Gram Positive Bacteria” Journal of Applied Biological Sciences, 2008, 2 (1): 67-71.
- 2- Kutlu F., Aytar P., **Gedikli S.**, Çelikdemir M., Ardıç M., Çabuk A., “Enhanced production and stability of laccase using some fungi on different lignocellulosic materials”, Journal of Applied Biological Sciences, 2010, 4 (3) 69-78.
- 3- Demir A., Aytar P., **Gedikli S.**, Çabuk A., Arısoy M., “Laccase production with submerged and solid state fermentation: Benefit and cost analysis”, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 2011, 39(3) 305-313.
- 4- Aytar P., **Gedikli S.**, Çelikdemir M., Uzuner S., Farizoğlu B., Şam M., Çabuk A., Sağlam N., “Dephenolization of olive mill wastewater by growing cells of some white rot fungi without adaptation”, Turkish Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 2011, 39 (4) 379- 390.
- 5- Benli E., **Gedikli S.**, Aytar P., Güngörmedi G., Çabuk A., “Dehalogenation and Detoxification Of 2,4-Dichlorophenol with Induced Laccase”, IUFS Journal of Biology, 2011, 70(2) 25-34.
- 6- Akbulut M., Aytar P., **Gedikli S.**, Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., “*Trametes versicolor* ham lakkazı ile 2-klorofenolden uzaklaştırılması”, Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences, 2012, 30(1) 9-19.

A-4 Ulusal hakemli dergilerde yayınlanmış tam makale (Türk.e)

- 1-Tabak, Ö., **Gedikli, S.**, Aytar, P., Ünal A., Çabuk, A. ve N. Kolankaya, “*Trametes versicolor* Lakkazı ile Pentaklorofenol ve 2,6-Diklorofenol'den Klor Uzaklaştırılması”, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 2009, 7, 13-23.
- 2-Güngörmedi G., Şaşmaz S., Aytar P., **Gedikli S.**, Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., “*Trametes versicolor* biyokütlesi ile Reaktif Red 198 Boyarmaddesinin Biyosorpsiyonu”,

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2009, 22(2), 247-264.

3- **Gedikli S.**, Aytar P., Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., “Lakkaz enzimi ile kot boyarmaddesinin biyolojik yıkımı”, Anadolu University Journal of Science and Technology – C Life Sciences and Biotechnology, 2010, 1(1), 59-70.

4-Çelikdemir M., **Gedikli S.**, Aytar P., Güngörmedi G., Çabuk A., “Mikrodalgaın Maya Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi”, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2011,24(2), 1-9.

A-5 SCI-Expanded, SSCI, AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar

1-**Gedikli S.**, Şen C.,Mutlu MB., Çabuk A., Determination of microbial diversity of Nasa Thermal Spring with conventional and molecular methods, Volume 29, Supplement, Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology, 2012

2- Aytar P., **S. Gedikli**, Y. Buruk, A. Çabuk, N. Burnak, Lead and nickel biosorption with a dried fungal biomass isolated from lead mine drainage, Volume 29, Supplement, Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology, 2012

3-Aytar P., **S. Gedikli**, E. Kocabıyık, B. Yenice Gürsu, M.B. Mutlu, A. Çabuk, S. İlhan, Determining of fungal diversity with conventional and molecular methods at extreme acidic environments such as acidic mine drainage, Volme 29, Supplement, Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology, 2012

6-BİLDİRİLER

B-1 Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve tam metin olarak yayımlanan bildiri.

B-2 Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri.

1- Aytar P., Demir A., **Gedikli S.**, Çabuk A., Arisoy M., Laccase production with submerged and solid state fermentation: benefit and cost analysis, Oral presentation, 1st European Congress of Applied Biotechnology together with 29th DECHEMA's Biotechnology Annual Meeting, Berlin, 2011.

B-3 Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve poster olarak sergilenen bildiri.

1- Çabuk A., Sidir Y.G., Aytar P., **Gedikli S.**, Sidir İ., Dechlorination of chlorinated compounds by *Trametes versicolor* ATCC 200801 crude laccase and quantitative structureactivity relationship of toxicity, Poster presentation, 1st European Congress of Applied Biotechnology together with 29th DECHEMA's Biotechnology Annual Meeting, Berlin, 2011.

B-4 Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve tam metin olarak yayımlanan bildiri.

1- Şaşmaz S., **S. Gedikli**, P. Aytar, G. Güngörmedi, A. Çabuk, A. Ünal, N. Kolankaya, Lakkaz ve lakkaz aracılı sistemler kullanılarak bazı boyarmaddelerin dekolorizasyonu- Sözlü bildiri, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.

- 2- **Gedikli S.**, Aytar P., Çelikdemir M., Ünal A., Yamaç M., Çabuk A., Kolankaya N., Çeşitli makrofungus izolatlarının lakkaz üretim yetenekleri açısından değerlendirilmesi-Sözlü bildiri, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.
- 3- Aytar P., **Gedikli S.**, Çelikdemir M., Uzuner S., Farizoğlu B., Şam M., Çabuk A., Bazı beyaz .ürük.ül funguslarla zeytin karasuyundan fenol giderimi-Sözlü bildiri, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.

B-5 Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri.

- 1- Çabuk A., Tunalı S., Akar T., **Gedikli S.**, Şaşmaz S., Pinus nigra kozalaklarında immobilize *Saccharomyces cerevisiae* biyokütlesi ile Pb²⁺ giderimi- Sözlü bildiri., 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası, 2006.
- 2- Özel Y.K., Cin M., **Gedikli S.**, Aytar P., Çabuk A., Ünal A., Kolankaya N., Beyaz Çürükçül funguslar ile siyanür içeren atık suyun iyileştirilmesi-Sözlü bildiri, 9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 2009.
- 3- Kutlu F., **Gedikli S.**, Aytar P., Çelikdemir M., Çabuk A., Katı substrat fermentasyonu ile lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz üretimi-Sözlü bildiri, 9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 2009.
- 4- Tabak Ö., Aytar P., **Gedikli S.**, Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile bazı klorofenolik bileşiklerin deklorasyonu-Sözlü bildiri ,9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 2009.
- 5- Aytar P., **Gedikli S.**, Yıldırım S., Yardımcı E., Oduncu E., Farizoğlu B., Çabuk A., Zeytin kara suyunun fenol gideriminde ardışık montmorillonit ile adsorpsiyon ve biyolojik işlemin kullanılması, Sözlü sunum, X. Ekoloji ve Çevre Kongresi, Çanakkale, 2011.

B-6 Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve poster olarak sergilenen bildiri.

- 1- **S. Gedikli**, P. Aytar, G. Güngörmedi, E. Benli, A. Çabuk, Lakkaz enzimi ile kot boyar maddesinin biyolojik yıkımı-Poster bildiri, 9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 2009
- 2- P. Aytar, **S. Gedikli**, M. Çelikdemir, M. Şam, A. Ünal, A. Çabuk, N. Kolankaya, *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz ile düşük kaliteli linyit kömürlerinden kükürt uzaklaştırılması- Poster bildiri, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.
- 3- Y.K. Özel, **S. Gedikli**, P. Aytar, M. Çelikdemir, A. Ünal, A. Çabuk, N. Kolankaya, Çeşitli makrofungus izolatlarının siyanür yıkım yeteneklerinin araştırılması-Poster bildiri, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.
- 4- YK. Özel, **S. Gedikli**, P. Aytar, A. Çabuk, A. Ünal, N. Kolankaya, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Pleurotus sajorcaju* biyokütleleri ile kurşun, nikel ve çinko biyosorpsiyonu, Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.
- 5- G. Güngörmedi, S. Şaşmaz, P. Aytar, **S. Gedikli**, A. Ünal, A. Çabuk, N. Kolankaya, *Trametes versicolor* biyokütlesi ile Reaktif Red 198 boyarmaddesinin biyosorpsiyonu, Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.
- 6- M. Çelikdemir, **S. Gedikli**, P. Aytar, A. Ünal, A. Çabuk, N. Kolankaya, Mikrodalganın Maya ve Bakteri Hücrelerinin Canlılığı üzerine etkisi, Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.
- 7- M. Girgin, B. Özçelik, **S. Gedikli**, P. Aytar, A. Ünal, A. Çabuk, N. Kolankaya, İmmobilize *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Dylon Navy 17 biyosorpsiyonunda Kullanılabilirliği, Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.
- 8- **S. Gedikli**, P. Aytar, A. Ünal, M. Yamaç, A. Çabuk, N. Kolankaya, *Trametes versicolor*

lakkazı ile 4-klorofenol ve 2,4,5-triklorofenolden klor uzaklaştırılması, Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.

9- İ. Potođlu-Erkara, H. Özler, S. Pehlivan, S. Platin, **S. Gedikli**, M. Çelikdemir, A. Çabuk, M. Yamaç, Eskişehir ve çevresi ballarının palinokimyasal analizi ve antimikrobiyal aktivitesi-Poster bildiri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 2010.

10- **S. Gedikli**, P. Aytar, Y.K. Özel, M. Çelikdemir, G. Güngörmedi, A. Çabuk, Asidik maden drenajından izole edilen fungal biyokütle ile Blue 72, Orange 13 ve Violet 1 tekstil boyarmaddelerinin renk gideriminin araştırılması, Poster sunum, X. Ekoloji ve Çevre Kongresi, Çanakkale, 2011.

11. Çabuk A., **Gedikli S.**, Aytar P., Çelikdemir M., Kimyasal olarak modifiye edilmiş fungal biyosorbentle reaktif tekstil boyarmaddelerinden renk giderimi, Poster sunum, 21. Uluslararası katılımcı Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, (2012).

12. **Gedikli S.**, Aytar P., Buruk Y., Apohan E., Çabuk A., Yesilada O., Burnak N., *Trametes versicolor* ile lakkaz üretimi ve renk giderimi: Taguchi ve Box-Behnken Yöntemlerinin uygulaması, Poster Sunum, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, (2014).

13. Toptaş Y., Çelik PA., **Gedikli S.**, Güngörmedi G, Sudağıdan M, ..kmüş C., Çabuk A., Öktem HA, Sivas Kangal Bölgesi Linyitlerinin Biyolojik Olarak İyileştirilebilirliği, Poster sunum, 18. Biyoteknoloji Kongresi, Konya (2015).

14. Güngörmedi G., **Gedikli S.**, Toptaş Y., Çelik PA, Çabuk A., Öktem HA, Mezofilik ve Termofilik Bakterilerden elde edilen Proteazın Deterjan Uygulamalarındaki Kullanılabilirliği, Poster sunum, 18. Biyoteknoloji Kongresi, Konya (2015).

15- **Gedikli S.**, Toptaş Y., Çelik PA., Güngörmedi G., Çabuk A., Öktem HA., Mikrobiyal Gübre Potansiyeli Olan Bakterilerin Eldesi, Poster sunum, 18. Biyoteknoloji Kongresi, Konya (2015).

DIĐER ETKİNLİKLER

1- 14. Biyoteknoloji Kongresinin düzenlenmesinde görevli (31 Ağustos- 2 Eylül 2005).

2- TS EN ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Sertifika Programı, Eskişehir, Aralık 2008.

3- TS EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri (HACCP) Sertifika Programı, Eskişehir, Aralık 2008.

4- Proteomistanbul, Uluslar arası katılımlı Proteomik Çalıştay, İstanbul, Temmuz 2010.

5-Enzim Saflaştırmasında Temel Yöntemler Uygulamalı Eğitimi, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 11-15 Temmuz 2011.

6-Gıdalarda Pestisit Kalıntısı Analizleri, Ant Teknik Pestisit MS Çalıştay, Bilecik, Mayıs, 2013.

7-Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi, Moleküler Markör Uygulamaları Ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi, 24-28 Haziran 2013.

8- 22. Ulusal Biyoloji Kongresinin düzenlenmesinde görevli (23-27 Haziran 2014).

9- 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde verilen “DNA ve RNA tabanlı moleküler yöntemler” başlıklı uygulamalı eğitimlerin düzenleme kurulunda görevli.

10. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “Zaman Yönetimi”, 16.02.2015.

11. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “Sunum Teknikleri”, 16.02.2015.

12. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “Araştırmalarda Rapor hazırlama ve yazma”, 18.02.2015.

13. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “Program Yönetimi (Çoklu Proje Yönetimi)”, 19.02.2015.

14. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “Projelerdeki Riskler ve Alınması Gerekli Önlemler”, 19.02.2015.
15. Gazi Üniversitesi TTO Eğitimleri, “TÜBİTAK Projeleri” 19.02.2015.
16. Tübitak, Editör ve Yazar Eğitim Seminerleri, 04.03.2015.
17. EBİLTEM, TEYDEB 1501/1507 Proje Yazım Atölyesi, 5-6 Mayıs 2015
18. EBİLTEM, TEYDEB 1505 Proje Yazım Atölyesi, 2-3 Haziran 2015
19. British Council-BEBKA, Yaratıcı girişimcilik eğitimi, 20-24 Mayıs 2015
20. AB Akademi, Proje D.ngüsü Eğitimi, 27-28 Haziran 2015

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER

- 1- Biyologlar Derneği