

Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Seda ERCAN AKKAYA¹ ve Merih KIVANÇ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji. Böl., Eskişehir
e-posta: sedaercanakkaya@gmail.com, mkivanc@anadolu.edu.tr

Özet

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile su sıcaklığının kaynama noktasına ulaştığı değerlerde bile mikrobiyal yaşamın var olduğu ve bu yüksek sıcaklık değerlerinde sadece ekstrem canlıların varlığını sürdürdüğü saptanmıştır. Bu da bizim termal çevrelerdeki canlıların yaşam çeşitliliğini ve bu canlıların sahip olduğu büyük biyoteknolojik öneme sahip termofilik enzimleri merak etmemizi sağlamıştır. Ancak, günümüzde yapılan çalışmalar ile ekstrem şartlarda yaşayan bu canlıların sadece %1'lik kısmı kültüre alınabilmiştir. Termofilik mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonlarının yapılması diğer mikroorganizma gruplarından oldukça farklıdır ve çok hassas uygulamalar gerektirmektedir. Bu çalışmada, ülkemizde yeterli araştırmanın yapılmadığı termal kaynaklarda varlığını sürdürebilen Gr(+) termofilik bakterilerin, genel özellikleri ve yaşama ortamları gözden geçirilerek biyoteknolojik önemi ortaya konmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gr(+) termofiller, *Bacillus*, *Geobacillus*, Termal kaynaklar

Isolation and Identification Methods of Gr(+) Bacils Living In Hot Springs

Abstract

Studies conducted in recent years have shown us that microbial life even in temperatures reaching the boiling point of water, while concluding that only extreme life forms could survive at such temperatures. This led us to the temperation of various life forms in thermal environments and their thermophilic enzymes that are highly crucial for biotechnology. However, studies conducted today utilize only 1% of these extreme life forms into culture. The isolation and identification of thermophilic microorganisms is significantly different than that of other groups of microorganisms and requires highly sensitive applications. The aim of this study is to examine the general characteristics of Gr (+) thermophilic bacteria, on which there is insufficient research in this country, in order to demonstrate their biotechnological importance.

Key Words: Gr (+) thermophiles, *Bacillus*, *Geobacillus*, Hot springs.

1. Giriş

Gezeganimiz üzerindeki mikrobiyal hayat, yüksek yapılı organizmaların var olmasından yaklaşık olarak 3–3,7 milyar yıl önce oluşmuştur. Mikroorganizmalar biyosferin yaygın ve önemli bir kısmını oluşturmalarına rağmen, besin üretiminde kullanılanlar ve hastalık yapanların dışında büyük bir çoğunluğu tanımlanamamıştır. Mikrobiyal hayat yalnızca bizim gördüğümüz hava, toprak, ve göllerde değil, kutuplardaki buzulların arasından,

kaynayan yanardağ bacalarına, tuz göllerinden sodalı sulara ve yüksek asit ortamlara kadar yayılmış durumdadır. Su sıcaklığının kaynama noktasına ulaştığı değerlerde bile mikrobiyal yaşam varlığını sürdürmektedir. 65 C°'nin üzerinde yalnızca prokaryotik yaşam formları bulunmasına rağmen, daha yüksek sıcaklıklarda sadece *Bacteria* ve *Archaea*'nın bazı grupları varlığını sürdürebilmektedir. [1].

Son yıllarda derin deniz termalleri gibi farklı anaerobik habitatların bulunması, biyoteknolojik potansiyele sahip anaerobik

mikroorganizmaların izolasyonunu mümkün kılmıştır. Modern moleküler yöntemler keşfedildiğinde, mikroorganizmaların araştırılması daha da ilerlemiş ve canlıların *Bakteria*, *Archaea* ve *Eucarya* olarak üç domaine ayrılması önerilmiştir. Bu ayırım, 16S rRNA dizilişleri başta olmak üzere, hücre duvarı, lipitler, RNA polimeraz ve protein sentezi özelliklerine göre yapılmıştır [2, 3, 1]. Yapılan filogenetik incelemeler sonucu *Archaea*'lar ile *Eukaryotlar*'ın atalarının yakın akraba oldukları saptanmış, *Archaea* ve *Bacteria*'nın ise prokaryotlara dahil olmasına rağmen, filogenetik olarak birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir [2].

Dünyamız'da solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır [4]. Yapılan çalışmalarda, sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermiştir. Yüksek

sıcaklık farklı mikroorganizmalar tarafından farklı derecelerde tolere edilmektedir. Pek çok ökaryotik canlı kısa bir süre bile olsa 50 °C sıcaklığa dayanamazken, termofil canlıların yüksek sıcaklıklarda kolayca gelişebildikleri bildirilmiştir [5]. Yapılan araştırmalarda termofillerin yüksek sıcaklıkta büyüyen organizmalar olduğu, güneş ile, jeotermal olarak, yada biyolojik olarak ısıtılmış çevrelerin tipik üyeleri olarak. üç farklı sıcaklık aralığında rasgele yayıldıkları, (termofiller 35-70°C, ekstrem termofiller 55-85°C, hipertermofiller 75-113 °C) saptanmıştır [4]

Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. İller bankasının 2001 yılında yayınlamış olduğu listeye göre ülkemizdeki jeotermal kaynaklar ve kuyu başı sıcaklıkları çizelge 1.1 de verilmiştir. Bu çizelgeye sıcaklığı kırk derecenin altında olan kaynaklar yazılmamıştır [6].

Tablo 1. Türkiye'deki resmi kayıtlara alınmış 133 adet jeotermal sahanın isimleri ve kuyubası sıcaklıkları

Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C
Afyon		Aksaray		Bingöl		Çanakkale	
Ömer-Gecek	98	Ziga	53	Kös	47	Tuzla	174
Arapderesi	75	Aydın		Hscıköy	62	Kestenbul	75
Heybeli	79	Germencik	232	Harur	52	Hıdırlar	81
Gazlıgöl	74	Çamköy	90	Hozavit	48	Kumilcası	69
Hüdai	71	Salavatlı	171	Bitlis		Ozancık	65
Ağrı		Aydın şehir içi	103	Nemrut	66	Kırkeçit	52
Diyadin	71	Gümüşköy	41	Ilıcaköy	44	Kara	48
Amasya		Davutlar	65	Bolu		Çan	46
Hamamözü	42	Ortakçı	50	Merkez	44	Küçükçetmi	41
Gözlek	40	Balıkesir		Sarıot	43	Çankırı	
Ankara		Gönen	82	Kesenözü	73	Çavundur	54
Kızılcahamam	86	Hisaralan	100	Efteni	42	Denizli	
Haymana	45	Hisarköy	93	Bursa		Kızıldere	212
Seyhamamı	43	Pamukçu	60	Çekirge	47	Tekkehamamı	100
Dutluca	51	Kepekler	60	Kayarca	83	Gölemesli	55
Ayaş-çoban	50	Havran	60	Armutlu	75	Karahayit	56
Erzurum		Dağlıcası	64	Kemalpaşa	51	Kamarayenice	56
Pasinler	43	Güre	58	Oylat	40	Diyarbakır	
Kığıhazman	56	Kızılköy	51	Orhaneli	68	Çermik	51
Meman	45	Yıldız	47	Kütahya		Elazığ	
Eskişehir		Şamıdağ	62	Eynal	163	Kolan	42
Sakarılıca	56	K.Maraş		Naşa	52	Mardin	
Merkez	45	Süleymanlı	43	Çitgöl	97	Germilab	61
İzmir		Kayseri		Gediz	78	Muğla	
Balçova	124	Tekgöz	40	Yoncalı	42	Sultaniye	41
Seferhisar	153	Bayramhacı	40	Kızıışlın	44	Nevşehir	
Doğanbey	64	Kırşehir		Emet	47	Kozaklı	93
Dikil Kaynarca	130	Terme	56	Yeniceköy	49	Acıgöl	200
Bademli	70	Meahmutlu	70	Dereli	41	(tahmini)	
Çeşme	61	Karakut	55	Samrık	46	Yozgat	
Şifne	57	Bulamaçlı	44	Muratdağı	42	Köhne	78
Nebir	57	Konya		Hamaköy	51	Cavlak	46
						Sarıkaya	45

Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C	Jeotermal kaynak	°C
Paşa	43	İlgın	42	Manisa		Yerköy	47
Aliğa	58	Sivas		Salihli	98	Karadikmen	40
Bayındır	45	Sıcakçermik	56	Urganlı	83	Karamağra	68
Tokat		Akçaağıl	43	Sart	54	Sakarya	
Sulusaray	54	Samsun		Saraycık	51	Kuzuluk	84
Reşadiye	48	Havza	54	Menteşe	63	Rize	
Van		Siirt		Şehitler-Kula	55	Ayder	55
Hasanabdal	90	Hıtaçermiği	67	Niğde		Urfa	
Zereni	55	Ordu		Narköy	63	Banaz	61
		Fatsa	49	Çiftehan	53	Eşme	40

1.2. Termal Çevreler

Termofil mikroorganizmalar optimum 45 °C'de, hipertermofiller optimum 80 °C'de gelişmektedirler. Bu yüksek sıcaklık değerleri doğada sınırlı alanlarda bulunur. Örneğin güneş enerjisi ile ısınan topraklar gün ortasında yaklaşık 50 °C'ye bazen de 70 °C'ye, kompostlar ve silolarda ise, 50-65 °C'ye ulaşmaktadır. Bunun yanında son derece yüksek ısıya sahip volkanik alanlar da doğada yer almaktadır [7]. Derin deniz çukurlarının bulunduğu çevrelerde obligat anaerobik pek çok tür bulunmasına rağmen son zamanlarda bu alanlarda yaşayan fakültatif aerobik türlere de rastlanmıştır. Diğer taraftan pek çok zorunlu aerobik bakteri Orta Atlantik sınırı ve Guaymas havzasında bulunan derin deniz hidrotermal çukurlarından izole edilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak termofilik, obligat ya da fakültatif aerobik popülasyonların, hidrotermal çukurların oksidatif mikrohabitatlarında yer aldıkları bildirilmiştir [8].

Pek çok kaynak kaynama noktasına yakın sıcaklıklara sahiptir. Ayrıca bazı termal çukurlardan 150-500 °C civarında buhar fişkirir. Deniz dibindeki hidrotermal çukurlar 350 °C ya da daha yüksek sıcaklıklara sahiptir. Dünya üzerindeki sıcak su kaynakları Batı Amerika, Orta Afrika, Yeni Zellanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika, Orta Afrika gibi ülkelerin yer aldığı geniş bir alanda bulunur. Bunların yanında Yellow Stone Ulusal parkı oldukça farklı sıcak su kaynağını bir arada bulduran büyük bir alandır. Bu sıcak sular çeşitli kimyasal bileşiklere ve çeşitli pH değerlerine sahip olmakla birlikte, kemoorganotrof mikroorganizmalar için yeterli düzeyde besin maddesine sahiptir [1, 9].

Son on yıldır ekstrem mikroorganizmalar araştırmacıların dikkatini çekmekte, sıcaklık, basınç, pH ve iyonik ortamlarda gelişebilen ekstremofillerin izolasyonları için çeşitli modifikasyonlar gerektiren kültür metotlarının

geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Buna rağmen, hidrotermal kaynaklardaki *Archaea* varlığını saptamak için klasik mikrobiyal metodları kullanarak yapılan çalışmalar, yeterince verimli değildir. Endonezya sıcak sularının termofilik bakteriyel komünitesinin incelenmesi üzerine yapılan bir çalışmada sıcaklığı 82 ve 90 °C, pH'2 olan, Domas ve Cibuni alanları incelenmiş, *Proteobacteria*, *Bacillus* ve *Flavobacterium* üyelerini içeren bir mikrobiyal komünitenin var olduğu bildirilmiştir [4]. Bu konuda son yıllarda yapılmış bir başka çalışmada ise kültüre alınamayan *Archaea*'nın özellikleri, 16S rDNA primerleri ve propları kullanılarak araştırılmıştır [10]. Bu canlıların yaşam özelliklerinin tespitinde önceden kullanılan izolasyon tekniklerindeki gibi basit yapı genlerin tespiti ve kataloglanmasının yerine günümüzde kullanılan tekniklerde, ekolojik çevreden büyük miktarda DNA izolasyonu yapılarak [11], termofilik canlıların fizyolojik potansiyellerinin belirlenmeye çalışıldığı ve bunun günümüzde oldukça yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir [10, 12, 13, 14].

1.3. Termofilik basiller

Termofilik basiller genellikle sıcak su kaynakları, solfatarlar ve jeotermal olarak ısınmış topraklardan izole edilirler. Termofil olmalarına rağmen mezofil çevrelerde de bulunabilirler. Bu çevrelerin yanı sıra topraktan, gübreden, lağım arıtma sistemlerinden, nehir ve göllerden, hava kontaminantlarından, ve konservelelerden de izole edilebilirler [15].

Kuzey İrlanda'da, Eyjafjordur bölgesindeki deniz tabanında bulunan büyük deniz dibi sıcak su konik kaynaklarının keşfedilmesi ve tanımlanması üzerine yapılan bir çalışmada 72 °C'de pH'sı 10 olan su incelemiş, bu termal kaynaktan Gr (+) bakteriler, *Archaea* ve *Desulfurococcus mobilis* üyeleri izole edilmiştir. Bu izolatlara 16S rRNA analizi uygulanmış, izole

edilen 45 izolatin 41'inin *Aquificales* ordosuna, 10 tanesinin *Korarchaeota*'ya ait dizilim gösterdiği tespit edilmiştir. Fizyolojik özelliklerinin tamamıyla kaynak suyu habitatının indikatörü olduğu saptanmış olan bu canlıların yeraltından taşınabileceğinin mümkün olduğu bildirilmiştir [16].

Yellowstone Ulusal Parkında yapılan bir çalışmada da sıcaklığı 35-60 °C, pH 7-9 olan 5 farklı sıcak su kaynağından alınan örneklerde yeni klorofilli sülfürsüz bakteri türleri izole edilmiş ve bazı alanların türe spesifik olduğu gösterilmiştir [17].

Beldüz ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada ise *Archaea* ve *Eubacteria* türlerinin dünyamızın ilk dönemlerinden bu yana var olduğu ve pek çok farklı cinsi içerdiği bildirilmiş, Türkiye'nin kuzey-doğu bölgesi sıcak sularında bulunan termofilik *Bacillus flavothermus* türlerinin karakterizasyonu yapılmıştır [18].

Genellikle jeotermal alanlarda yayılma gösteren mikroorganizmaların büyük kısmı H, Fe, S bileşiklerini indirgeyerek yaşamını sürdüren litotroflardır [19]. Organik atıkların aerobik şartlarda parçalanmasıyla ısınmış (65-80°C) kompostlar içinde ise *Bacillus* ve *Thermus* türlerine rastlandığı bildirilmiştir [4].

Doğal habitatları tercihen, termofilik çevreler, sıcak kaynaklar, solfatarlar ve jeotermal ısınmış sularda bulunan *Bacillus*'lar ; endospor oluşturmaları, çubuk şeklinde ve aerobik olmaları ile pek çok *Eubacteria* cinsinden ayrılmaktadırlar [20]

İlk termofilik *Bacillus*'un 1888'de Miquel tarafından 70 °C de, Paris Seine nehrinden izole edildiği bildirilmiş, sonraki 30-40 yıl içinde ise toprak, lağım ve besinlerden yaklaşık 60 °C'de yaşayabilen basil izole edilmiş ve geçen 20 yıl içinde çok sayıda yeni termofilik basil türü tanımlanmıştır [21] (Tablo 2).

Yapılan araştırmalar sonucu termofilik basillere ait yağ asidi analizlerine göre izo 15:0 ve iso 17:0 yağ asitlerinin yüksek oranlarda bulunduğu saptanmıştır. 12 farklı türe ait Gr (+)

basil için yağ asiti özellikleri tablo 3'de verilmiştir [22].

Sınıflandırma

Bacillus stearothermophilus

Bacillus stearothermophilus orijinal suşu 1920'de Donk tarafından tanımlanmıştır. İlk defa tanımlanan bu suş kaybolmasına rağmen Gordon ve Smith bu suşu daha sonra yaptıkları çalışmalarda, obligat termofilik suşlara referans olarak kabul etmişlerdir. *B. stearothermophilus*'un en önemli özellikleri ise, 45-76 °C'de gelişebilme, anaerobik büyüme, nişastayı ve jelatini hidroliz edebilme, sitratı kullanamama ve % 3 NaCl'a tolerans gösterebilme olarak tanımlanmıştır (Tablo 2), Yapılan pek çok karakteristik özellik araştırmasından sonra da, *B. stearothermophilus*'un, Bergeys Manuel sekizinci baskısında yerini aldığı bildirilmiştir [21].

Bacillus thermoglucosidasius

Bu mikroorganizmanın tanımlanması tip suş, *B. stearothermophilus*'a göre yapılmış, *B. stearothermophilus*' dan daha dar bir gelişme sıcaklığına sahip olduğu (42-69 °C) ancak, nişasta besi ortamında optimum gelişmenin 72 °C'ye çıktığı, maksimum bölünme süresinin havalandırılmalı ortamda 61-63 °C'de 21-29 dakikada, pepton-yest extract besi ortamında gerçekleştiği, % G+C oranının 45-46 olduğu tip suş *B. stearothermophilus*'a % 31 DNA homolojisi gösterdiği bildirilmiştir (Tablo 2) [23].

Bacillus pallidus ve *Bacillus thermocloaceae*

Termofilik aerobiktir, 50-60 °C'de yaşamakta, kanalizasyon balçığına karışmış bira ve maya atıklarında yaygın olarak bulunmaktadır. % 7 NaCl toleransı göstermektedir (Tablo 2) [24].

Tablo 2. Gr(+) Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri (+):Pozitif, (-): Negatif, W: zayıf üreme (21)

	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B.thermoglucosidasius</i>	<i>B.pallidus</i>	<i>B. thermocloaceae</i>	<i>B. thermoleovarans</i>	<i>B.caldotenax</i>	<i>B.caldovelox</i>	<i>B. caldolyticus</i>	<i>B.caustophilus</i>	<i>B.thermocatenulatus</i>	<i>B.thermodenitrificans</i>	<i>B. thermoruber</i>	<i>B.flavothermus</i>
Hareket		+	+		-					+			+
°C min.	45	42	30	37	54					35	37-45	34	30
°C opt.	50	61-63	60-65	55	55-65					55-70		45-48	65
°C max	76	67-69	70	70	70					78	70-72	58	70
%3 NaCl	+	-	+	+		+	-	-	-	+	+		-
%5 NaCl	-	-	+	w						-	+	-	
%7 NaCl	-	-	+	-						-			
%10 NaCl	-	-	+	-	-								
PH		7,3-8,7	8-9	8-9	6,2,7,5								5,5-9
MR	-	w						w	-	-	-		
Acetoin	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+
Katalaz	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Oksidaz	-	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+
İndol	-	-	-	-		-	-	-	+	-	-	-	-
Nişasta	+	+	w	-	+a	R	R	+	+	-	+	+	+
Kazein	W	+	-	-	+a	+	+	+	+	+	-	+	
Jelatin	+	-	-	-		+	+	+	+	-	-	+	-
Tribitryn			+	-							+		
Aesculin	-	+	d	-						-			
Üre		+										+	-
Sitrat	-	+/-	-			+	+	+	+	+	-	-	
NO ₃ -NO ₂	+	+	-	-		+	+	+	+	+	-	-	
NO ₃ .N ₂	-	-	-	-		-	-	-	-	+	+		
H ₂ S		+				-	-	-	-	-	-	-	-
Na NO ₃ B.	-	-				-	-	-	-	+	-	+	-
Anarb. B.	+		-	-		w	w	w	w	+	+		+
Asit Ürt.													
Glikoz	+	+	+	-	+a	+	+	+	w	+	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	-	+a	+	w	w	+	+	+	+	
Sakkaroz	+	+	+	-	+a	+	+	+	-	+	+		+
Maltoz	+	+	d	-	+a	+	+	w	w	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	-	-	+a	-	+	+	w	+	+	+	
Rhamnoz	-	+	-	-	+a	-	-	-	-		+/-		+
Laktoz	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		
Cellobioz		+	-	-	+a					+			
Galaktoz	W	-	-	-	+a	-	-	-	-	+	-	+	
Arabinoz	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		w
Mannoz	+	+	-	-		+	+	+	w	w	-		+
Riboz			-	-	+a						+	+	
Ksiloz	-	-	-	-		-	-	-	+	-		+	
Dekstrin	+	+				+	+	+	+	+	w		
Gliserol	+	+				+	+	w	-	+	w	+	
Salisin	-	+				-	-	-	w	w	-		
Adonitol	-	-				-	-	-	-	-	-		
Mannitol	-	+			+a	w	+	w	-	+	+	+	
Dulsitol	-	-				-	-	-	-	-	-		
Erithritol	-	-				-	-	-	-	-	-		
Glikojen	+	-				-	-	+	-				
Sorbitol	-	+				-	-	-	-	-	-		+
Rafinoz	+					w	w	-	-	-	+		
Nişasta	+	+				-	-	+	w	-	+		
İnositol	-	-				-	-	-	-	-		+	
İnulin	-	-				-	-	-	-	-	-		

Bacillus thertmoleovarans

İlk olarak, nehir ağzı çamurundan izole edilmiş olan bu tür, balçık içinde minimum tuz

konsantrasyonunda, 60 °C'de n-heptodekan kullanılarak geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. % G+C oranı 52-58 olan, termofilik

mikroorganizma *Thermoleophilum* ile DNA/DNA homolojisi göstermezken, *B. stearothermophilus*' ile %56-61 homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Tablo 2) [24].

Bacillus caldotenax, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus caldolyticus*
86 °C sıcaklık ve pH 8,2 de izole edilen bu bakteriler G r(-), sporsuz termofillerle beraber bulunur, 70-75 °C' de optimum gelişip (Tablo 2), 80 °C'de sadece pirüvatu kullanabilirler ve Brain Heart Infusion ilavesi yapılmazsa bazal besi ortamında büyüme gösteremezler. Bu üç tür de farklı sıcaklıklarda, farklı hücre duvarı, farklı membran yapıları ve farklı spor oluşumu ile ayrılabilir. Son derece termofilik olduklarından düşük sıcaklıkta aktif olmadıkları bildirilmektedir [21].

Bacillus caustophilus

Pastörize süttten izole edilen bu tür toplu iğne başı büyüklüğünde koloniler oluşturmaktadır. 37 °C'de 2-3 haftada büyüeyebilen, optimum 60-65°C, maksimum 75 °C'de yaşadığı saptanmış olan *B.caustophilus*'un (Tablo 2). *B. caldotenax* ve *B. caldolyticus*'a yakın akraba olduğu bildirilmektedir [22].

Bacillus thermocatenulatus

Termal kaynaklardan izole edilen ve 55-70 °C'de optimum gelişme gösterebilen (Tablo 2), bu türün bireyleri, sarımsı koloniler oluşturan anaerobik bakteridir. G+C oranı % 69 'dır ve bu oran termofiller içinde şimdiye kadar tanımlanmış en yüksek orandır [22, 21].

Bacillus thermodenitrificans

Maksimum 75°C'de büyüme gösterebilen (Tablo 2) ve *Bacillus stearothermophilus*'dan morfolojik ve fizyolojik olarak fark gösteren bu tür ilk önce *Denitrobacterium thermophilum* olarak

tanımlanmış, daha sonra yeniden adlandırıldığı bildirilmiştir [25].

Bacillus thermoruber

Gr (+), hareketli tek yada koloniler oluşturan bu bakteri, terminal ya da subterminal oval sporlar ve katı besiyerinde kırmızı, yuvarlak, düzgün kenarlı, müsilaçlı koloniler oluşturur, sıcaklık limiti 58 °C'dir (Tablo 2), G+C oranı % 57 olarak saptanmıştır [15].

Bacillus flavothermus

Kirli sarı koloniler oluşturan bu bakteri *B. coagulansa* benzer görünümündedir. 30-70 °C'de gelişebilir, kompleks besi ortamında anaerobik büyür (Tablo 2) ve G+C oranının % 61 olduğu bildirilmiştir [20].

Bacillus coagulans ve *Bacillus smithi*

B. coagulans süt ve karbonhidratlı besinlerden izole edilebilir. pH 4,5'de ve 65 °C'de gelişme gösterebilir (Tablo 2). G+C oranı % 41-55'dir. *B. smithi* peynirden izole edilmiştir, 25-60 °C'de pH 5,7'de büyür, % 3 NaCl' de gelişemediği saptanmıştır [21].

Bacillus acidocaldarius

Asit topraklar, havuzlar ve jeotermal kaynaklardan izole edilebilen bu tür, 45-70°C'de pH 2-6 aralığında gelişir (Tablo 2). Terminal ya da subterminal spor oluşturur. G+C oranı % 62,2 olarak saptanmıştır [15].

Bacillus acidoterrestris ve *Bacillus cycloheptanicus*

% G+C oranı *B. acidoterrestris* için 51-53 *B. cycloheptanicus* için 54-57'dir. Karbon kaynaklarını kullanımı, tuzluluk toleransı ve pH aralığının ise *B. acidocaldarius*' a benzerlik gösterdiği bildirilmiştir [15].

Tablo 3. Gr(+) Basiller İçin Yağ Asidi Özellikleri (22)

	<i>B.thermodenitrificans</i> 466	<i>B.thermoleovarans</i> I55366 ^t	<i>B.thermocatenulatus</i> B1259	<i>B.stearothermophilus</i>	<i>B.caldotenus</i> DSM406	<i>B.caldovelox</i> DSM411	<i>B.caldolyticus</i> DSM 405	<i>B.thermoglucoisidarius</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>B.smithi</i> DSM 459	<i>B.thermosphaericus</i> P11 ^r	<i>Aneurinibacillus thermocacrophilus</i> DSM 10154 ^t
10:0		2,7										
a13:0				5,1								
i14:0	0,4	1,0	1,3	0,1					0,5			0,2
14:0	1,8	1,4	0,6	1,5				06				0,2
i15:0	33,6	22,6	25,5	39,8	29,8	27,0	22,0	22,0	38,0	190	130	543
a15:0	1,8	1,3	0,6	6,4	2,0	1,0	1,0	1,6	30,4	12,0		0,6
15:0	2,3	2,1	1,3	0,5	3,0	2,0	1,0			6,0	3,0	0,6
i16:0	9,5	21,6	31,8	6,2	31,0	26,0	37,0	10,4	2,0	8,0	61,0	2,3
16:0	11,0	11,2	3,0	9,2	3,0	3,0	5,0	11,6	2,0	13,0	6,0	3,5
i17:0	26,6	18,5	21,0	7,1	21,0	27,0	22,0	30,3	10,0	42,0	11,0	32,8
a17:0	7,3	4,6	3,1	13,3	7,0	11,0	8,0	16,6	10,2		1,0	0,8
17:0	2,9	1,3	2,3		2,0	1,0	1,0	0,8			1,0	0,2
i18:0	0,2	0,9	1,3		1,0		2,0				1,0	
18:1	1,3	1,2	0,7									
18:0	1,3	3,4	2,2					0,5				0,3
UN.St.C16		6,6							1,7		3,0	
Diğer		0,2		0,8	1,0	2,0	1,0	5,6	5,2			4,2
Toplam	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Beslenme ve Büyüme

Heterotrofik, termofilik *Bacillus* türlerinin hepsinin nutrient agar ve tripton soya agar üzerinde heterotrofik olarak büyüdükleri bildirilmektedir. *Bacillus* türlerinin büyüme gereksinimleri üzerine yapılan bir çalışmada, *Bacillus stearothermophilus* kullanılmış ve karbon kaynağı olarak glikoz ya da sakkaroz ihtiyacı duyduğu, tiamin, biotin, nikotik asit, arjinin, histidin ve izolösinin ise büyümeyi arttırdığı bildirilmiştir. 68 termofilik basil üzerinde yapılan bir çalışmada termofil basillerin vitamin ve kofaktörlere ihtiyacı gösterdiği saptanmıştır. *B. coagulans*'ın 26 suşu üzerinde yapılan bir çalışmada ise bu türün üyelerinin metionin ve glutamik asit için oksotrofik olduğu tespit edilmiştir [15, 26].

Termofilik *Bacillus* türlerinin karbonhidrat, şeker, alkol, organik asitler, polisakkaritler, protein ve protein hidrolizatları ve lipitleri büyümek için kaynak olarak kullandıkları saptanmıştır. İzole edilen suşların alkoller, metanol, etanol, ksilol, fenol, ve kresolü hidrolize ettiği ve bu özelliklerin sınıflandırmada kullanıldığı bildirilmiştir [21, 27]

Gr (+) Termofilik Basillerde Enzimler

Termofilik basiller proteinlerinin sıcaklığa dirençli olması nedeni ile pek çok çalışmada model olarak kullanılmışlardır. *B. subtilis* ve zorunlu termofil olan bir *Bacillus* türünden izole edilen malat dehidrojenaz enziminin 65 °C'de 120 dakikalık bir süre boyunca dirençliliği araştırılmış, termofilik enzim bozulmadan

kalırken *B. subtilis* enziminin hızla bozulmaya uğradığı tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada da *B. stearothermophilus* ve *B. cereus*'dan izole edilen 11 enzim karşılaştırılmış, enzimlerin 9 tanesinin *B. cereus* enzimlerinden daha stabil olduğu buna rağmen, piruvat kinaz, glutamat, oxaloasetat transaminaz'ın ise, mezofiller ile benzer sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir [15].

B. stearothermophilus ve *B. caldotenax* ile yapılmış bir çalışmada da DNA polimeraz elde edilmiş, saflaştırılmış ve optimum çalışma şartları araştırılmıştır. İzole edilen enzimin, optimum aktivite için Mg^{+2} (10-30mM) ya da Mn^{+2} (0.4mM) ihtiyaç duyduğu tespit edilmiş, optimum reaksiyon sıcaklığı ise *B. stearothermophilus* için 60-65 °C, *B. caldotenax* ve *B. caldoveolx* için 65-70 °C olarak bildirilmiştir [28].

Enzimler normalde termal şartlara dirençli değildir, mikroorganizma büyürken membran, kofaktörler ya da hücre bütünü tarafından oluşturulan şartlarla stabilize olabilir. Bu konuda yapılmış bir çalışmada *B. stearothermophilus*'tan izole edilen alkalın fosfataz enziminin hücreden ayrıldığında sabit kalamadığı, bu stabilliği hücre membranı enzimlerinin verdiği, başka bir araştırma da ise glutamin sentetaz enziminin substrat ve metal iyonlarına bağlanması ile dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir [21, 29].

Gr (+) Termofilik basillerdeki bakteriyofajlar

Termofilleri enfekte edebilen bakteriyofajların varlığı ilk olarak 1926'da Koser tarafından tanımlanmıştır. Kompost, toprak, balçık ve çürümüş samandan izole edilen 24 farklı bakteriyofaj tanımlanmış bu fajların geniş bir konukçu grubunu enfekte edebildiği bildirilmiştir. JS013 ve JS026 gibi bazı fajların ise konukçusuna özel olduğu bildirilmiş, fajların çoğunun 50 °C'de 4-5 saat stabil kaldığı gözlenirken, 70 °C'de 2 saatten sonra yaşayabilme yeteneklerini önemli ölçüde kaybettikleri saptanmıştır (15).

Gr (+) Termofilik basillerde bakteriosinler

Yapılan araştırmalar sonucunda termofilik basillerin de bakteriosin üretebildikleri

saptanmıştır. Moleküler ağırlığı 13.500, yarılanma ömrü 75 °C'de 80 dakika optimum pH 7.0 olan Bakteriosin 93, Sharp ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bakteriosin 93'ün termofillerde çok aktif olmasına karşın mezofillerde etkili olmadığı bildirilmiştir [21].

2. Sonuç

Yüksek sıcaklıkta yaşayan ekstrem termofiller termostabil biyokatalizörlerinden dolayı çok ilgi çekmektedir. Bir çok ekstremofil mikroorganizma, *Archaea* grubu içinde yer almaktadır. Bunların bir alt grubunun ise optimum 75° C'de yaşayan ekstrem termofiller olduğu bildirilmiştir [1].

Termofillerin iyon adsorpsiyonu ile ilgili yapılmış bir çalışmada, termofilik *Geobacillus stearothermophilus* ve *G. thermocatenulatus* türlerinin metal iyonlarını absorbe edebildiği ve $CdCl_2$ (400- 3,200 μM) iyonlarının toksisitesine yüksek oranda tolerans gösterdiği tespit edilmiştir [30].

Japonyada maden ocaklarından alınmış jeotermal su örnekleri ile yapılmış bir başka çalışmada da, sulfat indirgeyen termofilik bakterilerin varlığı tespit edilmiş, izole edilen suşların *Desulfotomaculum*, *Thermanaeromonas*, *Thermincola*, *Thermovenabulum*, *Moorella*, "*Natronoanaerobium*," ve *Clostridium* cinlerine ait olduğu tespit edilirken, RL50JIII ve RL80JIV olarak adlandırılan iki yeni suşun ise *Desulfotomaculum* ve *Thermanaeromonas*, cinslerine ait olduğu bildirilmiştir [31].

Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. (6). Ülkemiz termal kaynaklar bakımından oldukça zengin olmasına rağmen, bu kaynakların mikrobiyal özellikleri ve biyoteknolojik öneme sahip termofilik mikroorganizma profilleri açısından çok az çalışma bulunmaktadır.

Günümüzde termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklara direnç gösterebilen enzim özelliklerinden dolayı büyük önem taşımaktadırlar. Bu nedenle de termal kaynakların mikrobiyal özelliklerinin ortaya konması ve termofil basillerin özelliklerinin incelenmesi endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

1. Madigan, M.T., Martinco, J.M. ve Parker, J. Prokaryotic diversity the Archaea. Brock Biology of Microorganisms, (Ed: Corey, P.F.) 546-571. (2000).
2. Gupta, R.S. Protei Phlogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62., 1435-1491. (1998).
3. Wosse, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya. *Poc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4576-4579 (1990).
4. Baker. G.C., Gaffer. S., Cowan. A.D. ve Suharto. A.R. Bacterial Community Analysis of Indonesian Hot Springs, *Fems Microbiology Letters*, 200, 103-109. (2001).
5. Williams, R.A.D., Simith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J., ve Sharp, R.J. DNA relatednes of *Thermus* sp., description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori), *IJSB.*, 45, 495-499. (1995).
6. ANONİM. Kaplıcaya Sahip Balediyeler Birliği (2001).
7. Baross, J.A. ve Deming J. Growth at high temperatures: isolations and taxonomy, physiology, and ecology. The microbiology of deep-sea hydrothermal vents. (Ed: Karl, D.M.) CRC Pres, London, 169-208. (1995)
8. Sako, Y., Nakagava. S., Takai. K. ve Horikosi. K. *Marinithermus hydrothermalis* gen nov., sp. nov., a strictly aerobic thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *IJSEM.*, 53, 59-65, (2003).
9. Brock, T.D. *Thermophiles*, (Ed: Brock T.D.) A Willey-Interscience Publication, New York, 1-336, (1986).
10. Moussard, H., Henneke, G., Moreira, D., Jouffe, V., López-García, P., ve Jeanthon C., Thermophilic lifestyle for an uncultured Archaeon from hydrothermal vents: Evidence from environment genomics *Applied and Environmental Microbiology*, 72 2268-2271,(2006).
11. Nercessian, O., A. L. Reysenbach, D. Prieur, ve C. Jeanthon. Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N). *Environ. Microbiol.* 5:492-502, (2003).
12. Allen, E. E., ve J. F. Banfield. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:489-498, (2005).
13. Delong, E. F. Microbial community genomics in the ocean. *Nat. Rev.* 3:459-469, (2005).
14. Campbell, B. J., Stein, J. L. ve Cary. S. C. Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5070-5078, (2003).
15. Kristjónsson, J. K. ve Stetter K.O. *Thermophilic Bacteria* (Ed:Kristjónsson J.K) CRC Pres, Inc. London, 1-13 ,(1991).
16. Martensson, V.T., Birrien, J.L., Raguene, G., Da Costa, M. ve Prieur, D. Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gt1211 from deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles*, 3, 247-251 ,(1999).
17. Boomer, S.M., Lodge, D.P., Dutton, B.E. ve Pierson, B. Molecular Characterization of Novel Red Green Nonsulfur Bacteria from Five Distinct Hot Spring Communities in Yellowstone National Park, *Applied and Environmental Microbiology*, 68. 346-335 ,(2002).
18. Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hersberger, K. ve Pace, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376 ,(1998).
19. Beldüz. A.O., Dülger. S., Demirbağ. Z. *Anoxibacillus gonensis* sp. nov., thermophilic, xylose-utilising, endospore-forming bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1315-1320, (2003).
20. Sharp, R. J., Riley, P.W. ve White, D. *Heterotrophic Thermophilic Bacilli*, (Ed: Kristjónsson, J.K), CRC Press, London, 2, 19-50, (1991).
21. Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova ,A.E., Lysenko, A.M., Petrunkaya, V.V., Opisov, G.A., Belyaev, S.S. ve Ivanov, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Geobacillus subterraneus* gen. Nov., sp. nov. and *G. Uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *B.thermocatenulatus*, *B.thermoleovarans*, *B.kkaustophilus*, *B. thermoglukosidasius* and *B. thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovarans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglukosidasius* and *G. Thermodenitrificans*. *IJSEM.*, 51, 433-446, (2001).
22. Suzuki, Y., Kishiiami, T., Inoue, K., Mizoguchi, Y., Eto, N., Tagagi, M., ve Abe, S., *Bacillus thermoglukosidasius* sp. nov., a new species of obligately thermophilic Bacill. *Syst. App. Microbiol.*, 4, 487, (1983).

23. Markosian, S., Becker, P., Markl, H. ve Antranikian, G. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic hot spring, *Extremophiles*, 4, 365-371, (2000).
24. Takao, M., Akiyama, K., ve Sakai. Purification and characterization of thermostable endo-1,5- α -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*, *AEM.*, 68, 1639-1649, (2002).
25. Sneath, P.H.A. Endospore-forming gram positive rods and cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Ed: Noel, R.K.) 1104-1135, (1984).
26. Edwards, C. Thermophiles, Microbiology of Extreme Environments (Ed: Edwards C.), Open University Press, England, 1, 1-33, (1990).
27. Sellmann, E, Schroder, K.L., Knoblich, I. M., ve Westermann, P. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species. *J. Bacteriol.*, 174, 4350-4355, (1992).
28. Colacino, F. ve Crichton R.R. Enzyme thermostabilization the state of the art. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 14, 211-271, (1997).
29. Hetzer, A., Daughney, C. J., ve Morgan, H. W. Cadmium Ion Biosorption by the Thermophilic Bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. Thermocatenulatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4020-4027, (2006).
30. Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Robertson, W. J., Spring, S., Schumann, P., Franzmann, P. D., ve Puhakka, J. A. Novel Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria from a Geothermally Active Underground Mine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3759-3762, (2006).