

T.C.
BİLECİK ŐEHY EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE KOMPOST KARIŞIMLARINDA ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAADET GİZEM ERTEKİN

TEZ DANIŐMANI

DOÇ.DR. LEVENT DEĞİRMENCİ

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DR.ÖĞR.ÜYESİ FADİME ÖZDEMİR KOÇAK

BİLECİK, 2020

10369927

T.C.
BİLECİK ŐEHY EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE KOMPOST KARIŞIMLARINDA ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAADET GİZEM ERTEKİN

TEZ DANIŐMANI

DOÇ.DR. LEVENT DEĞİRMENCİ

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DR.ÖĞR.ÜYESİ FADİME ÖZDEMİR KOÇAK

BİLECİK, 2020

10369927

BEYAN

“Termofilik Aktinomisetlerin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Kompost Karışımlarında Etkilerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tez projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu tez çalışmasında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) “Kompost Karışımlarında Hızlandırıcı Olarak Kullanılacak Termofilik Aktinomisetlerin Seçimine Farklı Parametrelerin Etkisi” adlı projeden destek alınmıştır.			
DESTEK ALINMIŞTIR	<input checked="" type="checkbox"/>	DESTEK ALINMAMIŞTIR	<input type="checkbox"/>
Destek alındı ise;			
Destekleyen Kurum: Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	<input checked="" type="checkbox"/>	2019-02. BŞEÜ. 01-01	
2- TÜBİTAK	<input type="checkbox"/>		
Diğer.....	<input type="checkbox"/>		

Saadet Gizem ERTEKİN

ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez konumun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar değerli görüş ve önerilerini sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoğun çalışmaları sırasında sabır gösterdikleri için Doç. Dr. Levent DEĞİRMENCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Fadime ÖZDEMİR KOÇAK'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan Özge KAYGUSUZ ve Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve laboratuvar çalışmalarımda yanımda olup maddi manevi destek veren ve yalnız bırakmayan Ayten KUMAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok kıymetli babam Edip ERTEKİN, çok kıymetli annem Ülay ERTEKİN, canım abilerim Turgut ve Aykut ERTEKİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Yoğun tempolu bu süreçte desteklerini esirgemeyen, beni hiç yalnız bırakmayan, zor anlarımı paylaştığım, maddi ve manevi yanımda olan Hazel KARADAĞ, Şule Aybüke YAVUZ, Sevinç KARAÇAM ve Serhat TANIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Saadet Gizem ERTEKİN

ÖZET

TERMOFİLİK AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE KOMPOST KARIŞIMLARINDA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

“Termofilik Aktinomisetlerin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Kompost Karışımlarında Etkilerinin Belirlenmesi” konulu tez çalışması kapsamında kompost karışımlarında kullanılmak üzere *Streptomyces* sp. cinsi mikroorganizmaların seçimi enzim temelli ve parametre temelli prosedürlerin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında ilk aşama Aktinobakterilerin kompost karışımlarından izolasyonudur. Mikroorganizma kaynağı olarak toprak ve aktif çamurun kullanıldığı kompostlardan farklı sıcaklıkta alınan numuneler ile izolasyon dilüsyon plaka yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. İzolasyon, yoğun ekim, tek koloni ve saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen 84 izolata ilk olarak enzim testleri uygulanmış ve enzim sonuçları ile morfolojik özellikleri benzer olan izolatlar ayırt edilerek, toplam incelenen mikroorganizma sayısı 21’e düşürülmüştür. 21 izolat ile ilk olarak detaylı morfolojik analizler izolatların farklı besiyerlerinde üreme davranışlarının gözlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. 21 adet izolattan 15 adeti 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Enzim temelli seçim kriteri uygulanan izolatlardan üç tanesi kompost karışımlarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Parametre temelli seçim kriterinde ilk olarak izolatların farklı sıcaklık ve pH değerlerinde üremeleri incelenmiş, farklı karbon kaynaklarında üremeleri ile üre hidroliz yetenekleri kıyaslanmıştır. Tez kapsamında kompost karışımlarında kullanılacak mikroorganizmaların seçimi için tercih edilen enzim testleri selüloz, nişasta ve ksilan degradasyonudur. Enzim temelli seçim kriteri sonunda mikroorganizma çalışmalarında sırasıyla N3C07, T4A05 ve N4A13, kompost denemelerinde A, B ve C kodlarıyla verilen mikroorganizmalar kompost karışımlarında kullanılmışlardır. Kompost denemeleri sonucunda özellikle tekli mikroorganizma kullanımında yüksek organik madde kayıpları belirlenmiştir. Mikroorganizmaların ikili kullanıldıkları sistemlerde organik madde kaybı kontrolle hemen hemen aynıdır. Üçlü sistemde ise organik madde kaybı kontrolün oldukça gerisinde kalmıştır. Kompost olgunluğunun belirlenmesinde kullanılan Çimlenme İndeks (GI %) verileri kompostların tekli sistemlerde salatalık bitkisi ile uyumsuz olduğunu göstermiştir. Buna karşılık denemelerde kullanılan ikinci bitki olan buğdayın performansı yüksektir. Sonuçlar seçilen mikroorganizmaların kontrole kıyasla daha etkin olduklarını ve kompost verimini arttırdıklarını göstermiştir

Anahtar kelimeler: Kompost, *Streptomyces* sp., Organik Madde, Enzim Testi, Çimlenme İndeksi

ABSTRACT

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THERMOPHILIC ACTINOMYCETES AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS IN COMPOST MIXTURES

Postgraduate thesis about “Isolation and Molecular Characterization of Thermophilic Actinomycetes and Investigation of their Effects in Compost Mixtures” investigated enzyme and parameter based *Streptomyces* sp. selection criteria for use in compost mixtures. Isolation of Actinobacteria from compost mixtures was the first step in the present study. Soil and activated sludge, were utilized as microorganism source and microorganisms sampled at different temperatures were isolated via dilution plate technique. 84 isolates were obtained after consecutive isolation, incubation, single colony reducing, and purification steps and these were initially tested for their enzymatic activity. Enzyme tests and morphological analyses were interpreted in accordance to reduce total number of microorganisms to 21. Detailed morphological analyses were utilized in comparing microorganism production in the presence of various medium. 15 isolates were further analyzed via 16S rRNA sequencing and three isolates were selected following the results of enzyme tests. Parameter based selection tests were composed of microorganism development in the presence of various temperature and pH values, growth on different carbon sources and urea hydrolyses of microorganisms were also determined in the course of studies. Cellulose, starch and xylan degradation were preferred for enzyme tests and microorganisms coded as N3C07 (A), T4A05 (B) and N4A13 (C) were utilized in compost experiments. Highest organic matter degradation was obtained in the presence of single microorganism utilization. Binary systems indicated organic matter degradation close to control system. Organic matter degradation in the presence of triple system was lower than control. Germination Index utilized for determination of compost maturity revealed low GI % values for cucumber while high performance was obtained with wheat. Results indicated that microorganisms had been more effective than control. The increase in composting efficiency via microorganism utilization as the highlight of thesis study

Key Words: Compost, *Streptomyces* sp., Organic Matter, Enzyme Test, Germination Index

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Termofilik Aktinobakterilerin Genel Özellikleri.....	6
2.3. <i>Streptomyces</i> Cinsi Sistematığı ve Genel Özellikleri.....	7
2.4. Mikroorganizmalara Uygulanan Enzim Testleri.....	10
2.5. Kompostlaşma ve Etki Eden Parametreler.....	18
2.6. Prokaryotik Taksonomi.....	30
2.7. 16S rRNA Gen Bölgesi.....	31
2.8. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni.....	32
3. MATERYAL-METOD.....	35
3.1. Aktinobakteri ve <i>Streptomyces</i> Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları.....	35
3.2. Aktinobakteri ve <i>Streptomyces</i> İzolasyonu.....	37
3.2.1. Dilüsyon Plaka Yöntemi.....	37
3.2.2. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması.....	38
3.2.3. İzolatların Stoklanması.....	38
3.3. İzolatlara Degredasyon ve Enzim Aktivite Testlerinin Uygulanması.....	39
3.3.1. Ksilan Degredasyon Testi.....	39
3.3.2. Nişasta Degredasyon Testi.....	40
3.3.3. Selülaz Degredasyon Testi.....	40

3.4. Seçilen İzolatlara Morfolojik Testlerin Uygulanması	40
3.5. 16S rRNA Analizleri için DNA İzolasyonu, Dizileme Analizlerinin ve Filogenetik Analizlerin Yapılması	41
3.5.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Kontrolü.....	41
3.5.2. DNA İzolasyon Kontrolü.....	42
3.5.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR İşlemi.....	43
3.6. Kompostlaşma İçin Seçilen Aktinobakterileri İzolatlarının Çoğaltılması, Liyofilize Edilmesi.....	44
3.7. Termofilik Aktinobakterilerin Seçimine Farklı Parametrelerin Etkisi.....	45
3.7.1. Sıcaklık Tolerans Testi.....	46
3.7.2. pH Tolerans Testi	46
3.7.3. Karbon Kaynaklarının Kullanımı	46
3.7.4. Üre Hidroliz Testi	47
3.7.5. Antagonistik Etki.....	47
3.8. Kompost Denemeleri	47
4.BULGULAR	51
4.1. Kompost Karışımlarından Aktinobakteri ve <i>Streptomyces</i> sp. İzolasyonu	51
4.2. İzolatların Seçimi	52
4.3. İzolatların Tek Koloni Ekimi.....	52
4.4. İzolatlara Degredasyon ve Enzim Aktivite Testlerinin Uygulanması.....	53
4.5. Selülaz Enzim Degredasyonu	53
4.6. Nişasta Enzim Degredasyonu.....	54
4.7. Ksilan Enzim Degredasyonu	55
4.8. Seçilen İzolatlara Morfolojik Testlerin Uygulanması	57
4.9. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların Görüntülenmesi.....	61
4.10. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu.....	62

4.11. 16S rRNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi Ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması.....	63
4.12. Kompostlaşma İçin Seçilen Aktinobakteri İzolatlarının Çoğaltılması, Liyofilize Edilmesi.....	71
4.13. Sıcaklık Toleransı.....	72
4.14. pH Toleransı.....	73
4.15 Üre Hidroliz Testi	75
4.16. Karbon Kaynaklarının Kullanımı.....	76
4.17. Antagonistik Etki	77
4.18. Kompost Denemeleri	81
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ.....	96
KAYNAKÇA	98
EKLER.....	113
EK-1: Besiyeri Ortamları ve Hazırlanışı	113
EK 2: Çözeltilerin İçerikleri ve Hazırlanışı.....	123
EK-3: Toprak Ve Aktif Çamur İzolasyonu ile Elde Edilen İzolatların Dilüsyon Görüntüleri.....	127
EK 4: İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması Petri Görüntüleri.....	128
EK 5: Seçilen izolatların Tek Koloni Seyreltme Plak Ekimleri.....	129
EK 6: Enzim Testi Yapılan İzolatların Görüntüleri.....	130
EK 7: Morfoloji Testi Yapılan İzolatların Görüntüleri	131
EK 8: Sıcaklık Tolerans Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri	132
EK 9: pH Tolerans Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri	133
EK 10: Antagonistik Etki Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri.....	134
EK 11: Karbon Kaynakları Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri	135
ÖZGEÇMİŞ.....	136

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Aktinobakteri İzolasyonu İçin Hazırlanan Kompost Karışımları	35
Tablo 3.2. İzolatların Eldesinde Kullanılan Toprak ve Aktif Çamur Sıcaklıkları.....	36
Tablo 3.3. Birleştirilen Toprak ve Aktif Çamur Sıcaklıkları.....	36
Tablo 3.4. Aktinobakteri ve <i>Streptomyces</i> Türlerinin Selektif İzolasyonunda Kullanılan Ortamlar	38
Tablo 3.5. İzolasyon Sonucu Elde Edilen Tüm İzolatların Listesi.....	39
Tablo 3.6. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltımı İçin PCR Reaksiyon Şartları	43
Tablo 3.7. 16S rRNA Gen Bölgesi Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.....	43
Tablo 3.8. 16S rRNA Gen Bölgesinin Dizilemesi İçin Kullanılan Dizileme Primerleri.....	44
Tablo 3.9. Kompost Sistemlerinde Gerçekleştirilen Ölçüm ve Analizler	50
Tablo 4.1. Aktinomiset ve <i>Streptomyces</i> İzolatlarına Uygulanan Enzim Testleri ve Sonuçları	57
Tablo 4.2. Aktinomiset İzolatlarının 10 Farklı Besiyerinde Gelişim Ve Pigment Özellikleri	59
Tablo 4.3. 16S rRNA Analizi Yapılan Mikroorganizmaların Benzerlik ve Nükleotit Farklılıkları.....	71
Tablo 4.4. Seçilen İzolatların 4 °C- 60 °C Sıcaklık Tolerans Test Sonuçları	73
Tablo 4.5. Seçilen İzolatların pH 4-9 Tolerans Test Sonuçları	74
Tablo 4.6. İzolatların Üre Hidroliz Test Sonuçları	75
Tablo 4.7. İzolatların karbon Kaynakları Kullanım Test Sonuçları	77
Tablo 4.8. T4A06 izolatının antogonistik etki sonuçları	79
Tablo 4.9. N3C07 İzolatının Antogonistik Etki Sonuçları	79
Tablo 4.10. T4A05 İzolatının Antogonistik Etki Sonuçları	80
Tablo 4.11. N4A13 İzolatının Antogonistik Etki Sonuçları	80
Tablo 4.12. Tez Çalışması Kapsamında Hazırlanan Sistemlerin 15 Günlük Sıcaklık Performansları	81
Tablo 4.13. Tez Çalışması Kapsamında Hazırlanan Sistemlerin pH ve Nem (%) Performansları	82
Tablo 4.14. Buğday ve Salatalık Bitkileriyle Elde Edilen Çimlenme İndeks Değerlerinin Sistemlere Göre Değişimi	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kompostlama İşlemi (Rynk, 1992: 6).....	22
Şekil 2.2. Aerobik Kompostlama İşlemi (Bayer, 2008: 13).....	23
Şekil 4.1. Aktinobakteri ve <i>Streptomyces</i> İzolasyon Plaklarından Bazı Örnekler.....	51
Şekil 4.2. İzolasyon Plaklarından Seçilen <i>Streptomyces</i> sp. Benzeri İzolatların Dörtlü Ekimleri	52
Şekil 4.3. Seçilen İzolatların Tek Koloni Örnekleri.....	53
Şekil 4.4. Seçilen izolatların selülaz enzim test sonuçlarının örnek petri görüntüleri	54
Şekil 4.5. Seçilen İzolatların Nişasta Enzim Test Sonuçlarının Örnek Petri Görüntüleri	55
Şekil 4.6. Seçilen İzolatların Ksilan Enzim Test Sonuçlarının Örnek Petri Görüntüleri.....	56
Şekil 4.7. N4A13 İzolatının Morfolojik Tanımlanmasında Kullanılan ISP2, ISP4, NA, CDA, TSA, Bennett's ve Oat meal Agar Görüntüleri. N4A13 izolatu ISP 5, ISP 6 ve ISP 7'de üreme göstermemiştir.....	58
Şekil 4.8. T2A04 İzolatının Morfolojik Tanımlanmasında Kullanılan ISP5, TSA, NA, CDA, Bennett's ve Oat meal Agar Görüntüleri. T2A04 İzolatı ISP2, ISP4, ISP6 ve ISP 7'de üreme göstermemiştir.....	59
Şekil 4.9. DNA İzolasyonu Yapılan İzolatların Elüsyonlarının %1'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü	61
Şekil 4.10. DNA İzolasyonu Yapılan İzolatların Elüsyonlarının %1'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü	61
Şekil 4.11. DNA İzolasyonu Yapılan Bazı İzolatların %1'lik Agaroz Jeldeki 16S rRNA Görüntüsü	62
Şekil 4.12. DNA İzolasyonu Yapılan Bazı İzolatların %1'lik Agaroz Jeldeki 16S rRNA Görüntüsü	62
Şekil 4.13. <i>Streptomyces</i> cinsine ait T6A14 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipnensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	64
Şekil 4.14. <i>Streptomyces</i> cinsine ait N4A29, S1A15, S6A03, T2A04, T4A08 ve T6A12 izolatları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipnensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	65

Şekil 4.15. <i>Streptomyces</i> cinsine ait FG59 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipponensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	66
Şekil 4.16. <i>Streptomyces</i> cinsine ait FG71 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipponensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	67
Şekil 4.17. <i>Streptomyces</i> cinsine ait N3C07, N4A13, S4B18, T4A05, S5B20 ve T4A06 izolatları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipponensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.	68
Şekil 4.18. <i>Streptomyces</i> cinsine ait S4B18 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipponensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	69
Şekil 4.19. <i>Streptomyces</i> cinsine ait N3C07 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak <i>K. nipponensis</i> DSM 0315 ^T (AY442263) kullanılmıştır.....	70
Şekil 4.20. Sıcaklık Tolerans Testi Petri Görüntüleri	72
Şekil 4.21. Seçilen İzolatların 4-9 pH Tolerans Test Sonuçlarının Petri Görüntüleri	74
Şekil 4.22. İzolatların Üre Hidroliz Testi Petri Görüntüleri	75
Şekil 4.23. İzolatların Karbon Kaynakları Kullanım Testi Petri Görüntüleri.....	76
Şekil 4.24. İzolatların Antagonistik Etki Testi Petri Görüntüleri	78
Şekil 4.25. a) Sistem Kontrol b) Sistem A c) Sistem B ve d) Sistem C için Organik madde ve % değişim oranları.....	83
Şekil 4.26. a) Sistem AB b) Sistem AC c) Sistem BC ve d) Sistem ABC için Organik Madde ve % Değişim oranları.....	84
Şekil 4.27. Kök Uzunluklarında Kompost ve İnoküle Salatalık Bitkisinde Meydana Gelen Değişimler. Üst soldan sağa: Kontrol, Sistem A, Sistem B, Sistem C; Alt soldan sağa: Sistem AB, Sistem AC, Sistem BC ve Sistem ABC.....	85

Şekil 4.28. Kök Uzunluklarında Kompost ve İnoküle Buğday Bitkisinde Meydana Gelen Değişimler. Üst soldan sağa: Kontrol, Sistem A, Sistem B, Sistem C; Alt soldan sağa: Sistem AB, Sistem AC, Sistem BC ve Sistem ABC..... **86**



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

bç: Baz çifti

DDH₂O: Double distile su

EDTA: Etilendiamintetra asetat

ISP: International Streptomyces Project

PCR: Polymerase chain reaction

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

ml: Mililitre

°C: Santigrat

dk: Dakika

kg: Kilogram

g: Gram

L: Litre

cm: Santimetre

M: Molarite

rRNA: Ribozomal RNA

TBE: Tris Borik Asit Edta

TE: Tris Edta

%: Yüzde

°: Derece

1. GİRİŞ

Aktinobakteriler morfolojik, fizyolojik ve metabolik yetenekleri bakımından farklı mikroorganizmaları barındıran ve bakteri üst alemi içindeki tanımlanmış olan en büyük taksonomik birimdir (Ludwig vd., 2012: 2). Actinobacteria şubesinde Rubrobacteria, Thermoleophilia, Coriobacteriia, Acidimicrobiia, Nitrospirales ve Actinobacteria'yı içeren 6 sınıf, 5 alt sınıf, 6 takım ve 14 alttakım vardır (Barka vd., 2016: 3). Termofilik Aktinobakterilerin tanımlanmasında nümerik taksonomi, yağ asidi kompozisyon analizi (kemotaksonomi), ribozomal protein analizi ve 16S rRNA gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Song vd., 2001: 97). Bu yöntemler arasında, 16S rRNA dizi analizi, mikroorganizmaların filogenetik araştırmalarında güçlü bir teknik olarak belirlenmiştir (Woese, 1987: 257). Termofilik Aktinobakteriler içindeki çeşitli cins üyelerine örnek olarak *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermobifida* ve *Thermomonospora* verilebilir (Song vd., 2001: 97).

Streptomycetaceae familyasına ait olan *Streptomyces* cinsi ilk defa 1943'te Waksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır (Williams vd., 1983: 1743). *Streptomycetaceae* familyası, Actinobacteria şubesi, Actinomycetales takımı ve Actinobacteria sınıfı içindedir. *Streptomyces* cinsi *Streptomycetaceae* familyasının tek üyesidir ve tanımlanan türlerin çeşitliliği bakımından Aktinobakterilerin bilinen en geniş taksonomik birimidir (Anderson ve Wellington 2001: 797). *Streptomyces*'ler, tıbbi ve endüstriyel öneme sahiptirler ve ayrıca günümüzde antibiyotik, anti kanser, immünoşüpresif ve antifungal ajanlar gibi diğer birçok doğal ürünün üreticisidir. Doğal polimer üzerinde büyüyen saprofitik bakteriler olduklarından dolayı endüstriyel enzim kaynağıdır (Baltz, 2007: 127; Hopwood, 2007: 2183; Olano vd., 2009: 211).

Modern biyoteknolojik çalışmalar endüstriyel enzim üretiminde hızlı ve ekonomik çözümler ortaya koymaktadır. Enzim teknolojilerindeki gelişmeler, kullanılan kimyasal işleme tekniklerin yerini biyolojik ve ekonomik olmasından dolayı enzimatik işlemlere bırakmıştır (Waldron vd., 2010: 2). Uygun koşullar sağlandığında etkilerini doğal ortamları dışında da gösterebilme yeteneklerinden ve maliyet fiyatlarında azalmayı sağlamasından dolayı bir çok alanda yararlanabilme imkanı vardır (Beilen ve Li, 2002: 338). Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında kullanılan tüm enzimler içerisinde alkali proteazların %25, diğer proteazların %21, amilazların %18, lipazın %3 ve diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin (selülaz ve ksilanaz gibi) %10 oranında kullanıldığı görülmektedir (Rao vd., 1998: 599; Kıran vd., 2005: 99; Fukara, 2007: 1).

Amilazlar bilinen en önemli ve eski endüstriyel enzimlerdir. Amilazlar hidrolazlar grubuna giren, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize ederek glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşmasını sağlayan ekstraselüler enzimlerdir. Selülazlar, selülozik biyopolimerleri enzimatik bir şekilde hidrolizleyip, monomerik fermente edilebilir şekerlerin salınmasında kilit rol oynayan enzim grubudur. Selülaz enzimleri selüloz kompleksini parçalamak ve fermente edilebilir bir enerji kaynağı (glikoz) üretmek için görev yapmaktadırlar. Ksilanazlar, hemiselülozların ksilan omurgasında mevcut olan β -1,4 bağlarının kopması ile ksiloz ünitelerine dönüşmesi reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir. Ksilanaz enzimi sanayi endüstrisinde kullanılan bitkisel veya bitkisel kaynaklı olmayan atıkların enzimatik olarak hidrolizini sağlar (Sargın vd., 2003: 146).

Yukarıda anlatılan amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimleri aynı zamanda tarımsal atıkların degrade edilmesinde de önemli rol oynamaktadır. Ülkemizde tarımsal atıkların değerlendirilmesi çok farklı şekillerde olabilmektedir. Kompostlama, biriktirme, yakma, biyogaz vb. yöntemlerle atıklar berteraf edilirken bunlar içerisinde kompostlama bir atık giderim yöntemi olmasına rağmen, sonuç ürünün gübre olarak kullanım olanağı nedeniyle avantajlıdır (Külcü, 2002: 4). Katı atıklarda organik bileşenlerin değerlendirilmesinde en etkili ve sürdürülebilir nitelikteki çözüm, kompostlama işlemidir. Kompostlama, katı atıklardaki organik maddelerin, mikroorganizmalar tarafından biyokimyasal reaksiyonlar sonucu basit maddelere ayrıştırılması ve bitkiler için gerekli besin maddelerine dönüştürülmesidir. Kompostlama işleminin katı atıkların geri dönüştürülmesindeki önemi, çevre dostu bir geri dönüşüm yöntemi olmasının yanı sıra tarımsal açıdan faydalı bir ürünün kazanılmış olmasıdır (Diaz vd., 2003: 233).

Tez çalışması termofilik Aktinobakteriler varlığında kompostlama işleminin incelenmesini içermektedir. Tezin araştırma hipotezi termofilik Aktinobakterilerin kompost karışımında kullanılmaları durumunda kompostlaşma hızını, işlem sonucunda ayrılan organik maddenin miktarını arttırıp arttırmadığının, en önemlisi de kompost olgunluğuna etkilerinin olup olmadığının belirlenmesidir. Bu kapsamda ilk aşamada Aktinobakteri grubuna ait üyeler ve spesifik tür olarak *Streptomyces* sp. izolasyonları ve tanımlama analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen termofilik mikroorganizmalar kompostta kullanılmadan önce bir dizi teste tabi tutularak kompost ayrıştırması için gerekli özelliklere sahip olup olmadıkları belirlenmiştir.

Tez çalışmasını oluşturan izolasyon, tanımlama, test ve kompostlama çalışmaları farklı dönemlerde yürütölen TÜBİTAK ve Bilimsel Araştırma Projeleri ile finanse edilmiştir. Mikroorganizmalara uygulanan seçim kriterleri ve kompost işleminin sonucu elde edilen bulgular tezin ilerleyen bölümlerinde detaylandırılmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri

Aktinomiset kelimesi Yunanca “aktis” (ışın) ve “mykes” (mantar) kelimelerinden türetilmiştir (Das vd., 2008: 166). Aktinobakteriler ipliksi gram pozitif bakterilerdir; aerobik, anaerobik ve fakültatif anaerobiktirler. DNA’larında G+C içeriği %70’ten fazladır (Segaran vd., 2017: 153). Aktinobakteriler serbest yaşayan, filamentli bir yapıya sahip ve saprofitik bakterilerdir. Saprofitik özellikte olmaları sebebiyle çeşitli organik bileşikleri parçalayarak ayrıştırmakta ve besin döngüsüne yardımcı olmaktadırlar. Aktinobakterilerin genom boyutu, dairesel veya doğrusal bir form olarak mevcut 0.93 Mb (Bentley vd., 2003: 142) ve 12.7 Mb (Baranasic vd., 2013: 1) arasında değişmektedir. Aktinobakteriler üreme ya miselin parçalanması yoluyla vejetatif mod ya da aseksüel mod ile gerçekleşir. Hava veya substrat miselyum üzerinde tek bir spor (monosporik), bir çift spor (bisporik) veya birçok spor (oligosporik) üretirler (Koch, 2003: 167; Battistuzzi ve Hedges, 2009: 335). Hava miselleri çoğunlukla substrat misellerinden kalın, pamuksu, kadife veya toz halinde olup olmaması gibi farklı yapısal özellikleri *Streptomyces* cinsinin sınıflandırılmasında çok önemli bir özelliktir (Anandan vd., 2016: 7). Ayrıca hava miselleri besin yetersizliği gibi stres koşullarında spor zincirleri oluşturmaktadır (Flärth ve Buttner, 2009: 38).

Substrat miselleri beyaz, sarı, turuncu, kırmızı, kahverengi ve siyah gibi farklı renklerde olabilmektedirler. Bazı hifler suda ve yağda çözünen pigmentleri üretebilir. Suda çözünen pigment kültür ortamına karışabilir ve ortam rengine benzer bir renk oluşturur. Suda çözünmeyen, yağda çözünebilen pigmentler ise koloni rengi ile benzer renk oluşturur. Substrat miselinin rengi ve suda çözünen pigmentlerin bulunup bulunmaması yeni türlerin belirlenmesinde önemli bir kriterdir (Li vd., 2016: 67).

Aktinobakteriler, küre (*Micrococcus*), çubuk-küre (*Arthrobacter*), parçalı hif (*Nocardia*) ve farklılaşmış dallı misel yapısı (*Streptomyces*, *Frankia*) vb. farklı morfolojik yapılar da gösterebilir. Bu morfolojik farklılıklar mikroorganizmaların karakterizasyonu için önemlidir (Gao ve Gupta, 2005: 2401). Ayrıca, kültür durumuna bağlı olarak hücre morfolojisi farklılaşabilmektedirler.

Aktinobakterilerin kırmızı, sarı, turuncu, pembe, kahverengi, yeşil, mavi veya siyah renkte pigmentler ürettiği bilinmektedir. Pigment üretimi suşa, kullanılan besiyerine ve kültürün yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lechevalier vd., 1965: 663).

Genellikle melaninler veya melanoid pigmentleri olarak adlandırılan bu kahverengi-siyah metabolik polimerler taksonomi çalışmalarında faydalı birer karakterdir. Pigmentler organizmaların büyümesi ve gelişmesi için gerekli değildir, ancak hayatta kalma ve rekabet güçlerini artırmada önemli bir rol oynamaktadırlar. (Dastager vd., 2006: 1131).

Toprak bakterileri gibi, Aktinobakteriler çoğunlukla mezofiliktir ve 25-30 °C arasındaki sıcaklıklarda optimal büyüme göstermektedir. Termofilik Aktinobakteriler ise 40-80 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişmektedirler. Aktinobakteri grubu, yeryüzünde farklı ve geniş habitatlara yayılan kalabalık mikroorganizma gruplarından biridir. Kara ve su ekosistemlerinde dağılışı göstermektedirler. Aktinobakteriler bitki, hayvan ve fungal materyallerindeki polimer karışımlarını parçalayarak ısıya dayanıklı biyomalzemelerin geri dönüştürülmesinde ve kitin, keratin ve lignoselüloz gibi doğal polimerlerle ilişkili besin maddelerini geri dönüştürdükleri için toprağın biyolojik bozunumunda ve humus oluşumunda da önemlidir (Sharma, 2014: 802). Aktinobakteriler karmaşık polimerik maddeleri hidroliz ederek ve organik maddeyi stabilize ederek, toprak nemi alımını artırır ve mikrobiyal büyümeyi teşvik eder (Wallenstein ve Weintraub, 2008: 2100; Placella vd., 2012: 10931).

Çeşitli yaşam alanlarına sahip olsalar da toprak yoğun olarak buldukları birincil yaşam alanıdır ve bu nedenle Aktinobakterilerin izolasyonu için toprak önemli bir kaynaktır. Aktinobakterileri yoğunluğu, yaşam alanlarına ve iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Aktinobakteriler toprakta 10^6 ile 10^9 hücre arasında yoğunluklarda bulunurlar (Goodfellow ve Williams 1983: 201).

Aktinobakteriler çeşitli biyolojik aktiviteleri ve ürettikleri biyoaktif moleküller ile sekonder metabolit üreticileri olarak bilinirler. Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında antibiyotikler, pigmentler, toksinler, enzim inhibitörleri, feromonlar, immün ajanlar, reseptör antagonist ve agonistleri, pestisitler, antifungal, antibakteriyel, antitümöral ajanlar ile bitki ve hayvan büyüme promotörleri bulunmaktadır (Oskay vd., 2004: 441). Aynı zamanda önemli sayıda endüstriyel ve klinik enzimler üretirler. Yaş toprağa karakteristik kokusunu veren ve geosmin biyomolekülünü üretmeleri Aktinobakteri'lerin tanımlayıcı özelliklerinden biridir (Flardh ve Buttner, 2009: 39). Aktinobakteriler ayrıca birçok bitki patojenine biyokontrol ajanı olarak kullanılır (Jeffrey vd., 2007: 3697; Sprusansky vd., 2005: 664). Aktinobakteriler, tüm mikrobiyal sekonder metabolitlerin %70'ini oluşturur ve bu özelliklerinden dolayı biyoaktif bileşiklerin en büyük üreticileri arasında yer almaktadırlar (Janardhan vd., 2014: 1; Subramani ve Aalbersberg, 2012: 572).

Bir Aktinobakteri suşunun 1020 sekonder metabolit üretebileceği tahmin edilmektedir (Sosio vd., 2000: 213). Doğal biyoaktif bileşiklerin üçte ikisinin aktinobakteriler tarafından üretildiği belirlenmiştir. Özellikle günümüzde kullanılan antibiyotiklerin %80'i *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi aktinobakteriler tarafından üretilmektedir (Kumar vd, 2010: 12). Aktinobakteriler bitki biyokütlesi bozulmasında selüloolitik yetenekleri nedeniyle ayrıca toprakta, kompostta ve otçul hayvanlarla birlikte ekolojik olarak var olabilme özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler (Book vd., 2016: 1). Aktinobakterilerin kompost kalitesini ve besin içeriğini arttırdıkları da bilinmektedir. Kompostta bulunan organik maddeyi büyük ölçüde sindirebilmeleri koku oluşumunu azaltmaktadır (Ohta ve Ikeda, 1978: 490).

Aktinobakteri üyelerinin sınıflandırılması ve taksonomisi, ilk olarak morfolojik, kimyasal ve fizyolojik özellikler gibi sınırlı özelliklerinin araştırıldığı fenotipik kriterlere dayanmaktaydı. Bunlar arasında koloni morfolojisi, spor zinciri, substratın rengi, hava miselyum ve çözünür (difüze edilebilir) pigmentler cinsin farklılaştırılmasındaki önemli faktörler arasında yer almıştır (Sentausa ve Fournier, 2013: 793). PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniğinin gelişmesi ile Aktinobakteri taksonomisi 16S rRNA analizleri ile belirlenmeye başlamıştır. Morfolojik, fizyolojik ve metabolik kabiliyetleri bakımından çok büyük farklılık gösteren, bakteri alemi içerisinde 18 önemli alem arasındaki en büyük taksonomik birimden birini temsil etmektedir (Barka vd., 2016: 3).

2.2. Termofilik Aktinobakterilerin Genel Özellikleri

Termofilik Aktinobakteriler, 40-80 °C arasında ki yüksek sıcaklıklarda yaşayan aerobik ve doğada zorunlu kemoorganotrop mikroorganizmalardır (Gadkari vd., 1990: 3727). DNA'larında yüksek oranda G+C içermektedirler ve proteinlerinde polar amino asitlerden (Asn, Gln, Ser ve Thr) daha yüksek miktarda yüklü amino asitleri (Asp, Glu, Arg ve Lys) içerdikleri bilinmektedir (Suhre ve Claverie, 2003: 17198). Endosporları sesildir, sporlar dallanmamış kısa sporoforlar üzerinde ya da havasal ve substrat hifi üzerinde tek üretilir (Atwell ve Colwell, 1982: 478). Sporları sucul sistemlerde ve toprakta bol miktarda bulunur ve kötü ortam koşullarına dirençlilik göstererek, uzun süre canlılıklarını koruyabilirler (Yoon vd., 2000: 1906). Termofilik Aktinobakteriler toprak, bitki artıkları, kaplıcalar, volkanik menfez, gübre ve kompost gibi doğada birçok alanda bulunabilmektedirler (Satyanarayana vd.,2013: 459).

Termofilik Aktinobakterilerden elde edilen termostabil enzimler biyoteknolojik uygulamalarda oldukça kullanışlıdır ve aktivitelerini 50-65 °C aralığında yüksek sıcaklıklarda koruyan amilaz, ksilanaz ve selüloz enzimlerini üretebildikleri belirlenmiştir (De Azeredo vd., 2004: 641; Petrova ve Vlahov, 2013: 3). Termofilik Aktinobakteriler yüksek sıcaklıklarda gelişebildikleri için ekonomik olarak yararlı bileşikler üretmektedirler ve 50-65 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite gösterebildiklerinden dolayı yüksek derecede substrat çözünürlüğüne yol açan kirlenme ve vizkozite riskini azalttığından dolayı teknik ve ekonomik açıdan faydalıdır (Kikani vd., 2010: 1000).

Ekonomik potansiyellerinden dolayı biyo-bozunma (Kleeberg vd., 1998: 1731) gibi yararlı biyolojik süreçlerde ya da antibiyotik (Takeuchi vd., 1991: 271) ve enzimlerin (Uzel vd., 2007: 196) üretiminde termofilik Aktinobakterilere büyük ilgi gösterilmektedir. Termofilik Aktinobakteriler, DNA polimerazlar, pullulanazlar, amilazlar, ksilanazlar, lipazlar ve proteazlar gibi biyoteknolojik olarak önemli bazı enzimleri ürettikleri için endüstriyel öneme sahiptirler (Mahajan ve Balachandran, 2016: 134).

2.3. *Streptomyces* Cinsi Sistematığı ve Genel Özellikleri

Üstalem: *Bacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Altsınıf: *Actinobacteridae*

Takım: *Actinomycetales* (Buchanan, 1917: 158) (Zhi vd., 2009: 592)

Alt takım: *Streptomyceinae* (Rainey ve ark., 1997: 1088) (Zhi vd., 2009: 592)

Familya: *Streptomycetaceae* (Waksman ve Henrici, 1943: 339) (Zhi vd., 2009: 592)

Cins: *Streptomyces* (Waksman ve Henrici, 1943: 339)

Dokuz yüz kırk iki tür ve kırk dört alt tür içermesi nedeniyle Actinobacteria sınıfının en fazla üyesi olan taksonudur. Toprak ekosistemi ve su ekosisteminde en yaygın olarak bulunan Aktinobakteri cinsidir (Çil 2011: 29). Topraktan izole edilen Actinomycetales suşlarının %95'inden fazlasını *Streptomyces* cinsinin oluşturduğu belirlenmiştir (Williams ve Vickers, 1988: 174). Hem karasal hem de sucul ortamlarda yaygın olarak bulunan *Streptomyces*'ler saprofit özellikte olup bitki ve hayvanlarla parazitik ilişki göstermektedir (Sembiring ve Goodfellow, 2008: 50).

Streptomyces'ler alkali ve nötral toprakta gelişim göstermektedirler ve fazla su emmiş ve kolayca anoksik hale gelmiş topraktan ziyade, koşulların aerobik olduğu suyu süzölmüş topraktada (kumlu ya da kireçli toprak) bulunmaktadır. Su ve topraktaki *Streptomyces* oranı besin, sıcaklık, nem, pH, tuzluluk, toprak yapısı ve iklime bağılı olarak değışmektedir (Locci, 1989: 2346). *Streptomyces*'ler, mantarlara benzeyen filamentli, hareketli olmayan, aerobik, katalaz pozitif, G+C içeriğı %70'den fazla asitsiz gram pozitif ve yaşaam döngüleri süresince morfolojik farklılaşma gösteren bakterilerdir (Flardh ve Buttner, 2009: 37; Hasani vd., 2014:63). Bakteriler arasında *Streptomyces* türleri tipik olarak 8,7 Mbp ile 11,9 Mbp aralığında olup, en büyük genomlara sahiptirler (Zhou vd., 2012: 2252). *Streptomyces* türleri çoğı bakteri türünde görölmeyen miselyumlardan oluşmaktadır. Uygun şartlarda toprakta bulunan dinlenme halindeki sporları, henüz bilinmeyen bir sinyal yoluyla vejetatif ve sonrasında havasal miselyumlarını oluşturur (Chater ve Losick, 2001: 151).

Streptomyces türleri karbon kaynağı olarak çok sayıda organik bileşigi, selöloz, lignin gibi biyolojik materyalleri ve inorganik azot kaynaklarını kullanabilme yeteneğindeki bakterilerdir. *Streptomyces*'ler, ölü ve çürüyen organik maddelerin ayrıştırılmasında, hücre dışına hidrolitik enzimler salgılayarak selöloz, kitin veya nişasta gibi karmaşık polimerleri parçalarlar ve karbon döngüsünde rol oynarlar (Kutzner, 1986: 2040).

Streptomyces'ler oluşturdukları pigmentlerle substrat ve hava miselyumlarına renk verirler ve çoğı tür renkli çözünebilir pigment oluşturur (Korn-Wendish ve Kutzner, 1992: 923). Böylece petri kapları üzerinde *Streptomyces* kolonileri mikromantar ve Aktinobakteri dışındaki diğeri bakterilerden kolayca ayırt edilebilirler (Goodfellow ve Simpson, 1987: 99). Mezofilik, psikrofilik ve termofilik *Streptomyces*'ler mevcuttur. *Streptomyces*'ler çoğunlukla mezofiliktir ve 10-37 °C sıcaklık aralığında gelişim gösterirler (James ve Edwards, 1989: 227; Deeble vd., 2005: 172), ancak üç tür; *S. thermonitrificans*, *S. thermovulgaris* ve *S. thermoflavus* termofiliktir ve 40-80 °C sıcaklık aralığında gelişim gösterirler (Srivibool vd., 2010: 303).

Streptomyces'ler önemli bir biyoteknolojik grup olduklarından dolayı çok çeşitli kimyasal yapılara ait bileşikler üretirler. Tıbbi ve tarımsal antibiyotiklerin üçte ikisini, antitümör ajanları, antifungalleri, apoptozis indükleyicileri ve inhibitörlerini ve biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bileşik üretirler (Worrall ve Vijgenboom, 2010: 743).

Streptomyces'e önem verilme nedenleri arasında yüksek metabolit üretim hızı ve biyotransformasyon süreçleri, lingoselöloz ve kitin indirgeme yeteneğı, organik maddelerin biyolojik döngülerinde etkili olmaları yer almaktadır (Bentley vd., 2002: 141).

Aktinobakteriler, özellikle de *Streptomyces* cinsi, sekonder metabolit üretebilen yüksek organizmalardır ve antibiyotik üreticisi olarak funguslardan sonra ikinci sırada yer almaktadırlar. Aktinobakteriler üzerine yapılmış çalışmaların çoğu antibiyotik keşfi ve üretimi üzerine olsa da birçok deneysel çalışmada Aktinobakterilerin amilaz, selüloz, kitinaz gibi birçok hücre dışı enzimleri de ürettikleri belirlenmiştir (Suriya vd., 2016: 69). Bunların yanı sıra cins üyeleri faydalı biyoaktif bileşiklerin üretilmesiyle de bilinmektedir (Kekuda vd., 2014: 116). Bugüne kadar belirlenen doğal antibiyotiklerin (kloramfenikol, sipemisin, griseisin ve neomisin gibi) %75'inden fazlası ve farmasötik uygulamalara sahip çok çeşitli yapısal olarak farklı bileşikler *Streptomyces*'ten izole edilmiştir (Sathya vd., 2016: 1).

Streptomyces'ler, hem tıp hem de tarım alanlarında önemli uygulamaları olan tüm biyoaktif ikincil metabolitlerin üretimi için en çok tercih edilen bakteri grubudur (Watve vd., 2001: 386). Tür üyeleri antifungal, antibakteriyel, antiviral, antikanser ajanlar, insektisitler, herbisitler, antiparazitik ajanlar, bağışıklık bastırıcılar, antioksidanlar ve enzim inhibitörleri dahil olmak üzere sekonder metabolitlerin üretimi için kullanılmaktadırlar (Bérdy, 2012: 4).

Streptomyces'ler kompost, hayvan yemleri ve samanda bulunabilmektedir. Kompostun oluşumundaki ısıl işlemlerin erken safhalarında mezofilik türler yer alırken, ilerleyen süreçte yerini *Streptomyces albus* ve *Streptomyces griseus* gibi termotolerant türlere bırakmaktadır (Goodfellow ve Simpson, 1987: 100). Komposttan izole edilen termofilik türlerin sayısı 10^3 - 10^5 cfu/g arasında değişmektedir. Bu türler, genelde *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces megasporus*, *Streptomyces macrosporus* ve *Streptomyces thermolineatus* grupları olduğu belirlenmiştir (Goodfellow vd., 1987: 3135). Tarım alanında, *Streptomyces* türleri, farklı bitki patojeni mantarlara karşı biyokontrol rolleri için araştırılmaktadır (Law vd., 2017: 3). Ek olarak, *Streptomyces* bitkiler ve bakteriler arasındaki nitrojen sabitleyici simbiyotik ilişkiyi inhibe edebildiği veya destekleyebildiği belirlenmiştir (Tokala vd., 2002: 2161).

Literatür özeti olarak verilen çalışmalar incelendiğinde *Streptomyces* tür üyelerinin özellikle tıp alanında kullanıldıkları anlaşılmıştır. Yapılmış çalışmalar tür üyelerinin tarımın pek çok alanında da etkin bir şekilde kullanılabileceklerini göstermiştir.

Tarımsal uygulamalarda özellikle bitki gelişiminin teşvik edilmesi, patojen türlere karşı biyokontrol özellikleri ile ön plana çıkan *Streptomyces* türleri ile ilgili kompostlama üzerine yapılmış çalışmalarda belirlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında literatürde yer alan mevcut bilgilere katkı sağlanması hedeflenmiş, bu doğrultuda çalışma kompost alanında uygulamaya yönelik yapılandırılmıştır.

2.4. Mikroorganizmalara Uygulanan Enzim Testleri

Enzimler endüstrinin her alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yenilenen metotlar, biyokimyasal enzim üretim anlayışının yaygınlaşması ve buna bağlı olarak fermentasyon süreçlerindeki gelişmeler endüstriyel enzim miktarında artışı sağlamıştır. Endüstriyel enzim pazarı yılda yaklaşık %10 oranında büyümektedir. Endüstriyel enzimlerin neredeyse %75' i hidrolitik enzimlerden oluşur (Li vd., 2012: 1; Saha vd., 2009: 282). Gıda, yem, tekstil, atık işleme ve biyokütleden alkol üretimi gibi birçok alanda mikrobiyal enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim üretimi günümüzde de devam eden, sürekli gelişim gösteren bir süreçtir ve yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçların ticarileştirilmesi 30 yıldan uzun bir süredir devam etmektedir. Mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için çevresel şartlara adaptasyonlarını sağlayan çeşitli enzimlere sahiptirler (Tatar, 2007: 5; Çoşkun, 2010: 1). Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Horikoshi, 1999: 737). Ayrıca mikroorganizmalar hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması gibi nedenlerden dolayı ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklardır (Temiz, 1999: 90). Mikrobiyal enzimler özel mikroorganizmalar tarafından üretilirler ve mikroorganizmalar seçilirken enzim üretme yeteneklerinin dışında toksik ve patojen olmamaları da göz önünde bulundurulur. Dünyada bol miktarda bulunan çok çeşitli endüstri atıkları, mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilir. Böylelikle birçok atık maddenin değerlendirilmesi veya yok edilmesi de mümkün olmaktadır. Kontrol edilebilen şartlarda fermentasyon reaktörü içinde sürekli kültür üretilbildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez (Özdemir, 2004: 10).

Aktinobakteriler endüstriyel ölçekte üretilen bir dizi enzimin doğal üreticileridir ve pek çok çalışmaya konu olmuşlardır. Aktinobakteriler içerisinde termofil türlerden elde edilen termostabil enzimler biyoteknolojik uygulamalar için oldukça elverişlidir.

Termostabil enzimlerin daha çok tercih edilme sebepleri arasında yüksek sıcaklıklarda reaksiyonları daha hızlı yerine getirmek, substrat miktarını azaltıp çözünürlüğü arttırmak ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebildikleri için mikrobiyal kontaminasyonları azaltması bulunmaktadır (De Azeredo vd., 2004: 642). Endüstriyel açıdan önemli birçok kimyasal proses, yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullarda gerçekleştiğinden, bunlara alternatif yöntemler için ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır (Chibata, 1980: 5).

Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması, organik bileşiklerin çözünürlüğünü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından bazı önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da sağlamaktadır. Sonuç olarak küçük alanlarda reaksiyon yüksek hızlarda gerçekleşmektedir (Gül-Güven, 2007: 21).

Sunulan tez çalışması kapsamında Termofilik Aktinobakterilerin kompost karışımında kullanımları hedeflenmiştir. Bu doğrultuda mikroorganizmaların öncelikle kompost karışımlarında büyük öneme sahip selüloz, nişasta ve ksilan bileşiklerini degrade edip etmedikleri belirlenmiştir. Bu nedenle literatür araştırmasında enzim testleri ile ilgili bilgi sözü edilen bileşiklerin degradesyonunda rol alan amilazlar, selülozlar ve ksilanazlar ile sınırlandırılmıştır.

Amilazların tarihi 1811 yılında Kirchoff tarafından nişasta parçalayıcı enzimlerin bulunması ile başlamaktadır. Amilazlar nişastayı parçalama yeteneklerine göre, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını rastgele noktalardan parçalarken, ekzoamilazlar ise nişasta molekülünü indirgen olmayan ucundan parçalarlar (Gupta vd., 2003: 1599). Amilazlar hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenebilmektedir ancak uygun koşullarda kısa sürede elde edilmesi ve biyoteknolojik açıdan önemli olmasından dolayı mikroorganizmalardan eldesi daha avantajlıdır (Wiseman, 1987: 288; Beilen ve Li 2002: 339). Amilolitik enzimler, bakteri ve mantarlarda oldukça yaygındır. Bakteriyel amilazlar asidofilik, alkalifilik ve termoasidofilik bakterilerde bulunmuştur. Termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarında kullanıma uygundur (Haki ve Rakshit, 2003: 17).

Büyüme ortamının pH değeri, enzim salgılanması ve organizmanın morfolojik değişimini etkileyen önemli fizyolojik faktörler arasındadır. Organizmanın gelişmesinde değişiklik gösteren pH, ortamdaki ürün stabilitesini etkilemektedir (Sivaramakrishnan vd., 2006: 175).

Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen ve birçok durumda ekstraselüler salgılanan amilazlar oldukça farklı özelliklere sahiptirler. Aktinobakteria sınıfının bazı üyeleri de nişastayı parçalayabilme yeteneklerinden dolayı gıda endüstrisi, fermantasyon, kağıt endüstrisi ve tekstil gibi alanlarda büyük öneme sahip olan amilaz enzimini üretmektedir (Pandey vd., 2000: 140).

Termostabil mikroorganizmalardan elde edilen termofilik amilazlar da bu alanda oldukça önemli bir yere sahiptir (Kurakake vd., 1997: 58; Tanrıseven vd., 2002: 408). Termostabil amilazlar (genellikle α -amilaz), termofiller ve ekstrem termofillerden elde edilen enzimlerin endüstriyel olarak çok yüksek potansiyelinin olması nedeniyle araştırılmaktadır (Sunna vd., 1997: 2). Bakteriyel α -amilaz kullanımındaki artıştan dolayı endüstriyel kullanımına daha uygun karakteristiklerdeki enzim üretimi ve daha yüksek üretim sağlayan suşların elde edilmesi önem kazanmıştır (Demirkan vd., 2005: 2629). Mikrobiyal kaynaklı amilazlar; maliyet verimliliği, üretimin kısa sürmesi, modifikasyon ve optimizasyon süresinin kısa olması, üretim için gereken alanın az olması gibi avantajlardan dolayı tercih edilmektedirler (Arıkan vd., 2003: 1398).

Nişasta sıvılaştırma, şekerleşme, mayalama ile üretilen çeşitli gıda ürünleri, damıtmaya dayalı endüstriyel ürünler, kağıt, sanayi, tekstil ürünleri, deterjan endüstrisi gibi alanlarda kullanımın artması α -amilaz enziminin üretimine daha çok önem verilmesine neden olmuştur (Gupta vd., 2003: 1609). Ayrıca medikal ve klinik kimya analizleri ile biyoteknoloji uygulamalarında ve elektrolit, izolator ve yarı-iletken kapasitörlü biyosensörlerde de amilaz enzimi kullanılmaktadır (Menzel vd., 1998: 177; Giri vd., 1990: 17416).

Selülaz enzimleri, glikoz birimleri arasındaki glikozidik bağları parçalayabilen hidrolazlar olarak da adlandırılmaktadır (Lynd vd., 2002: 511). Substrat ve hidroliz ürünlerinin bulunduğu yere göre selülaz enzimleri, ekzoglukanaz, endoglukanaz ve β -glukozidaz olarak sınıflandırılmaktadır (Saddler vd., 1986: 86). β (1-4) endoglukanazlar E.C. 3.2.1.4 ile temsil edilmektedir. Selülazlar amorf selüloz kısmının iç glikozid bağlarını rastgele parçalayarak, düşük polimerizasyon derecesi ve çözünür oligosakkaritler ile polisakkaritleri serbest bırakmaktadır (Kumar vd., 2009: 808).

Ekzoglukanazların en önemli enzimlerinden olan sellobiyohidrolazlar (E.C. 3.2.1.74) ve glukanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.91) olarak selüloz zincirinin indirgeyici ve indirgeyici olmayan kısımlarından parçalamaktadır. (Labes vd., 2008: 1919). β -glukosidazlar selülaz kompleksinden β (1-4) bağlarını hidrolize eden β (1-4) glukozidazı (E.C. 3.2.1.21) içermektedir. Bu enzim aynı zamanda son üründe glikoz tarafından da inhibe edilebilmektedir (Nidetzki ve Claessens, 1994: 961).

Canlı sistemlerde selülaz enzimi, türlerin çoğunda yaygın olarak sentezlenmektedir. Bunlar arasında bakteri, mantar ve Aktinobakteri enzimlerin en iyi üreticileri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bitkiler ve hayvanlarda selülaz enzimi üretmektedirler.

Araştırmalar, nematodlar, yumuşakçalar ve eklembacaklılar da dahil olmak üzere bazı organizmaların da endojen selülozlar üretebildiğini belirlemiştir (Gupta, 2016: 148). Bakteriler tarafından selülozun parçalanması iki yolla olur. İlkinde, mikroorganizma, bitki hücre duvarını parçalamak için sinerjik olarak çalışan bir dizi serbest enzim üretir. İkincisinde, hidroliz enzimleri, enzimatik kompleksler halinde bağlanarak substrata etki etmeye başlarlar. Aerobik bakteriler ve mantarlar, selüloza zayıf bir şekilde etki ederler. Anaerobik bakteriler polisakkarit yapısına bağlanan ‘selülozom’ adı verilen, enzimatik kompleksleri, selülozu daha etkili bir şekilde parçalamak için üretmektedir (Lynd vd., 2002: 509).

Mikrobiyal selülozlar, yaygın endüstriyel uygulamaları nedeniyle odak biyokatalizörleri haline gelmişlerdir. Selülozik materyaller üzerinde büyüyen, mikrobiyal selülozların kaynağı olarak kullanılan çok çeşitli mikroorganizmalar (çeşitli mantar, bakteri ve Aktinobakteri türleri) vardır. Bu mikroorganizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilirler (Kuhad vd., 2011: 2). *Selülomonas* ve *Streptomyces*, selülozik aerobik bakterilerin sık görülen iki cinsidir. Genel olarak, bakteriyel selülozlar, mantar kaynaklı selülozlardan daha termostabillerdir. Ayrıca, bakteriler kısa sürede ve daha ekonomik karbon ve azot kaynakları kullanarak kolayca çok yüksek hücre yoğunluklarına gelebilirler ve yüksek miktarda enzim salgılaya yeteneğine sahiptirler (Li vd., 2008: 198).

Selülozik mikroorganizmalar biyosferde yaygın olarak bulunup, çeşitli çevresel kaynaklardan kolaylıkla izole edilebilmektedirler. Humus açasından zengin toprak, su, deniz, okyanus, kaplıcalar ve bitki artıklarından potansiyel lignoselülozik mikroorganizmalar izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Gupta, 2016: 149). Isıya dayanıklı selülozlar, termal koşullar altında yüksek aktiviteye sahiptirler. Bu nedenle, bu enzimler endüstriyel uygulamalar için önemlidir (Herbert, 1992: 396). termostabil selülozların uygulamadaki öneminden dolayı, yüksek termostabiliteye sahip yeni selülozları keşfetmek için çeşitli çalışmalar sürdürölmektedir (Annamalai vd., 2012: 305; Zhao vd., 2012: 559). Birçok selüloolitik termofilik bakteri izole edilmiş, çok sayıda selüloz-degrade edici enzim belirlenmiş ve karakterize edilip, klonlanmış ve ekspresyonu sağlanmıştır (Bergquist vd., 1999: 103).

Selüloz enzimi üretimi; karbon kaynağı, azot kaynağı, selüloz kalitesi, substratın nem içeriği ve konsantrasyonu, karıştırma hızı, inokulum boyutu ve yaşı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenmekte ve bu faktörlerin üretilen selüloz aktivitesi üzerindeki etkileri kullanılan mikroorganizmalara göre değişmektedir (Otajevwo, 2011: 148).

Karboksimetil selüloz ve laktoz, selüloz enzim üretimi veriminde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda ticari karbon kaynakları arasında karboksimetil selülozun en doğru karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010: 99). Karbon kaynağı enzim üretim maliyetini belirleyen en önemli faktördür. Bu yüzden karbon kaynağı olarak lignoselülozik atıkların kullanılması selüloz enzim maliyetinin düşürülmesi için önemlidir (Rashid vd., 2009: 809). Enzim üretimi farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının derişiminden önemli ölçüde etkilenmektedir ve yapılan çalışmalarda amonyum sülfatın en uygun azot kaynağı olduğu gözlenmiştir (Padmavathi vd., 2012: 1161). Enzim üretimini etkileyen parametrelerden olan nem miktarının % 40-50 arasında olması selüloz üretimi için ideal bir değerdir. İnokulum boyutunun %10 ve inokulum yaşının 20 saat olduğu durumlarda enzim aktivitesi optimum değerlerine ulaşmaktadır (Iqbal vd., 2010: 29, Nagar vd., 2010: 74). Daha yüksek miktarda aşılama boyutu nem içeriğini artırıp enzimin düşük aktiviteye sahip olmasına neden olmaktadır. Hidrolitik enzimlerin üretimi mikroorganizmaların gelişim evresiyle paralel bir şekilde ilerlemektedir. İnkübasyon süresi enzimlerin optimum koşullarda üretiminde en önemli faktörlerden birisidir. Selüloz enzimi üretimi sırasında ortalama 5 günde maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010: 100). Sıcaklık, mikroorganizmaların gelişim hızını ve miktarını etkileyen ana faktörlerden birisidir. Sıcaklığın artması ile enzim aktivitesinin artışında önemli bir değişim meydana gelmektedir (Thomas ve Ambikapathy, 2011: 141). Sıcaklık, pH, oksijen seviyesi, besin ve ürünlerin derişimleri gibi çevresel faktörler mikrobiyal gelişimi ve ürün oluşumunu önemli bir şekilde etkilemektedirler (Zoppas vd., 2013: 2376).

Selülozlar uzun yıllardır ticari olarak kullanılmaktadır ve hem endüstriyel hem de akademik araştırmalarda yoğun ilgi görmektedir (Kuhad vd., 2011: 1). Selülozik materyallerin enzimatik hidrolizi üzerine gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemlere ilgi günümüzde oldukça artmıştır. Dünya endüstriyel enzim talebinin %8'ini oluşturan selülozlar ve yenilenemeyen kaynakların gittikçe azalması; selülozu gıda, enerji, yakıt ve diğer ürünler için temel materyal haline getirmiştir (Krishna vd., 2000: 468).

Selülozların ana uygulama alanları gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyo yakıt, kimya, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997: 604). Selüloz, selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmaktadır. Selüloz zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonu sonucu oluşmaktadır (Niehaus vd., 1999: 714).

Selüloz enzimi uygulayarak kâğıt sanayisinde büyük ölçüde enerji tasarrufu sağlanmaktadır. Selülozlar aynı zamanda kağıttan boya uzaklaştırmak içinde kullanılmaktadır (Tomme vd., 1988: 8). Tekstil endüstrisinde selülozik dokuların biyolojik olarak parlatılması için selülozlar kullanılmaktadır (Csiszar vd., 2001: 1065). Selülozlar gıda endüstrisinde hemiselüloz ve pektinazlarla birlikte meyve sularının ve yağlı tohumların ekstraksiyonunda da kullanılmaktadırlar. Ayrıca meyve sularının filtrasyonunda ve berraklaştırılmasında rol oynayan selülozlar, rengi ve nektarın ekstraksiyon etkinliğini artırıp, meyvelerden pigmentlerin daha iyi şekilde ekstre olmasına olanak sağlamaktadırlar (Zoppas vd., 2013: 2385). Selüloz enzimleri, selülozik materyallerin glikoz ve diğer fermante edilebilir şekerlere çevrimi ile etanol gibi çeşitli fermantasyon ürünlerinin ya da tek hücre proteinlerinin üretilmesi amacıyla degradasyonunda kullanılmaktadırlar (Sukumaran vd., 2005: 837). Dünyamızdaki karbon döngüsü, mikroorganizmalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Karbon döngüsünde rol alan mikrobiyal selüloz, döngüye katkı sağlayan anaerobik parçalama, bitki atıklarının çürümesi ve kompost üretimi gibi yaygın olarak kullanılan proseslerin ayrılmaz bir bileşeni olarak kullanılmaktadır (Waldron vd., 2010: 395).

Ksilanaz enzimleri, ksilandaki β -1,4-D-ksilozidik bağlarını zincirin iç kısımlarından hidrolizle kıran glikosidazlardır (o-glikozid hidrolazlar; E.C. 3.2.1). Bunlar, hücre metabolizması için karbon kaynağının sağlanmasında ve bitki patojenlerince bitki hücresinin enfeksiyonunda gerekli olan ve doğada yaygın bir enzim grubudur (Collins vd., 2005: 4). Ksilanın kompleks yapısından kaynaklı molekülün tamamen hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim adı verilmektedir. Ksilanolitik enzimlerde Endo-1,4- β -ksilanaz, β -D-Ksilosidaz, α -L-Arabinofuranosidaz, α -D-Glukuronidaz, Asetil ksilan esteraz ve Fenolik asit esteraz yer almaktadır (Cobos vd., 2003: 812, Collins vd., 2005: 4, Polizeli vd., 2005: 577). Ksilan içeriğinin hidrolizi geniş bir grup mikrobiyal enzimin iş birliği ile sağlanabilmektedir (Amerah vd., 2017: 814). Endoksilanazlar, ksilan iskeletindeki iç glikozit bağlarını hidrolize ederken, ekzoksilanazlar ise endoksilanazların aktivitesi sonucunda meydana gelen ksilooligosakkaritleri hidroliz ederler (Wong vd., 1988: 305).

Yapılan çalışmalarda mikrobiyal ksilanazların (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz, E.C. 3.2.1.8) yüksek spesifiklikleri, reaksiyon koşulları, substrat kayıpları ve yan ürünleri nedeni ile ksilan hidrolizi için tercih edilen katalizörler oldukları belirtilmiştir (Kulkarni vd., 1999: 412).

Ksilanaz enzimlerinin özellikle bakteriler, mantarlar (Gilbert ve Hazlewood, 1993: 189; Sunna ve Antranikian, 1997: 39), ve mayalardan (Hrmova vd., 1984: 371) elde edildiği, ayrıca *Actinomycetes* (Ball ve McCarthy, 1989: 441; Beg vd., 2000: 398) gruplarının da enzim üretiminde rol aldığı belirtilmiştir. Ksilanaz üreticisi bakteriler arasında *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* ve *Rhodothermus* cinsleri önemli yer tutmaktadır. *Actinomycetes*' ler arasında *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*'larda ksilanaz üreticisi olarak bilinmektedir (Chakdar vd., 2016: 3).

Ksilanazlar bakterilerde, funguslarda, bitkilerde ve mayalarda bulunmaktadır. Ksilanaz üretici mikroorganizmalar hem prokaryotik hem de ökaryotik olabilmektedir. Ksilanazlar ayrıca marina alglerinde, protozoalarda, kabuklu hayvanlarda, böceklerde, salyangozlarda ve toprak bitkilerinin tohumlarında da bulunabilmektedir (Sunna ve Antranikian, 1997: 40).

Termostabil, soğuk adaptasyonu veya alkali kararlılıkta ksilanazlar çoğu bakteri gruplarında karakterize edilmiştir (Motta vd., 2013: 251; Chakdar vd., 2016: 3). Bakteriler arasında, *Bacillus*'lar potansiyel ksilanaz üreticisi olarak belirlenmiştir. 60-70 °C'ye kadar yüksek sıcaklıklarda aktif termostabil ksilanazlar, *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodothermus marinus*, *Thermotoga* spp., *Clostridium thermocellum* ve *Streptomyces* sp.'den rapor edilmiştir. *Streptomyces* sp., *Actinomadura* sp., ve *Saccharopolyspora patunthaniensis* organizmaları 65-90 °C arasında aktivite gösteren ksilanazlar üretmektedir. (Chakdar vd., 2016, 2).

Aktinobakteri grubuna ait *Thermomonospora alba* tarafından üretilen termofilik ksilanazlar da bulunmaktadır (Blanco vd., 1997: 2008). Ksilanazlar tek zincirli glikoproteinlerdir. Genel olarak moleküler ağırlıkları 6-80 kDa olup 40 ve 60 °C sıcaklıklarda; pH 4.5-6.5 arasında aktivite gösteren enzimlerdir (Butt vd., 2008: 22). Mikrobiyal kaynaklı ksilanazlar asidik veya nötral pH'larda optimum aktivite gösterirler.

Yapılan çalışmalarda ksilanaz çeşitliliğinde, molekül ağırlıkları ve pH değerleri arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda küçük molekül ağırlıklı ksilanazların bazik, büyük molekül ağırlıkların ise asidik olduğu belirlenmiştir (Wong vd., 1988: 313). Bakteri kaynaklı ksilanazlar genellikle pH 5-9 arasında, büyük bir alanda etkin olmasına rağmen çoğu nötral pH'larda da optimum aktiviteye sahiptirler (Beg vd., 2001: 335). Sıcaklık değerlerinin optimum 34 ve 75 °C aralığında değişebildiği ancak 75-90 °C sıcaklıklar arasında aktivite gösteren ksilanazların bulunduğu da bilinmektedir.

Ksilanaz aktivitelerinin, düşük amonyum sülfat derişimlerinde bile sıcaklıkla artış gösterdiği bilinmektedir. Fungal ksilanazlar genelde bakteriyel ksilanazlara göre daha düşük sıcaklık direncine sahiptirler (Abdulla vd., 2017: 154).

Ksilan yan dallarının özellikleri ve substrat polimer uzunluğu gibi özelliklere bağlı olarak farklı ksilanazlar farklı ksilanlara farklı afinite göstermektedir (Liab vd., 2000: 89). Bazı mikroorganizmalar çok sayıda farklı ksilanaz üretirken, bazılarında ksilanaz çeşitliliği azdır. Çok sayıda farklı hidroliz enzimi üreten mikroorganizmaların oluşumuna sebep olduğu mono ve disakkaritler genelde çevredeki mikroorganizmalarca alınır (Shallom ve Shoham, 2003: 221). Mikroorganizmalar farklı özellikte ksilanazlar üretebilir. Georis ve ark. *Streptomyces* sp. strain S38'den kraft kâğıt hamuru beyazlatma yeteneğine sahip üç farklı ksilanaz belirlemiştirler (Georis vd., 1999: 184). Özellikle mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, birçok endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik işlevlerinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. Ksilanazlar, selüloz ve pektinazlarla birlikte dünya enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadırlar (Polizeli vd., 2005: 577). Üretim teknolojilerinde yer alan bakteriyel ksilanazlar çeşitli uygulamalar için patentlenmiştir ve dünya çapında ticari uygulama için pazarlanmaktadır (Chakdar vd., 2016: 3). Ksilanaz enzimlerinin biyoteknolojik ve endüstriyel kullanım alanları temel olarak kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, hayvan besleme (yem endüstrisi), gıda endüstrisi ve diğerleri olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Collins vd., 2005: 5). Ksilanazların ekonomik açıdan yüksek birçok faydalı ürünün istenilen seviyede üretimi için önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Tek hücre proteini, enzimler, sıvı veya gaz yakıtların üretimi, çözücüler ve şeker şuruplarının üretimi öne çıkan uygulamalar arasındadır (Beg vd., 2000: 335). Günümüzde çevremizi endüstriyel atıklardan korumak ve uzaklaştırmak için kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin uygulanması önem kazanmıştır. Kâğıt endüstrisinde ksilanazlar, ağartma dışında farklı saflıktaki selüloz hamurlarının ve kâğıt ürünlerinin üretiminde de kullanılabilirler.

Kağıt endüstrisinde etkili enzim kullanımını arttırmak için, etkili ksilanaz üreten suşları ve teknolojileri uygun bir şekilde bir araya getirerek, hem çevresel hem de ekonomik olarak avantaj sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Kulkarni vd., 1999: 421). Ksilanazların kullanımı sadece kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ile sınırlı olmayıp aynı zamanda lignoselülozik materyallerin dönüşümü, tarımsal atıkların fermentatif ürünlere parçalanması, meyve sularının berraklaştırılması, hayvan gıdalarının sindiriminin artırılması alanlarında özel bir öneme sahiptir (Viikari vd., 1986: 68; Beg vd., 2001: 326).

Bu uygulamaların yanı sıra, buğday ve arpa nişastalarından glutenin ayrılmasında, tarımsal ürünlerin ve hububatların besin değerini arttırmada (Beg vd., 2001: 326), antimikrobiyal ajanlar ve antioksidantlar olarak kullanımda farmakolojik olarak aktif polisakkaritlerin üretiminde (Collins vd., 2005: 16), sürfaktantlar olarak kullanılmak üzere alkil glikozidlerin üretiminde (Beg vd., 2001: 327; Collins vd., 2005: 10), ksilanaz enzimlerinden yararlanılmaktadır. Ayrıca ksilanaz yemlerde doğal olarak bulunan ve besinsel değeri olmayan bazı faktörleri parçalanmasında görev almaktadır. Bu özelliği ile besi hayvanlarında daha çok ağırlık artışı sağlamak ve yemden daha iyi yararlanarak hayvanın performansını, protein, nişasta ve minerallerin kullanılabilir olmayan kaynaklardan elde edilebilirliklerini arttırmak gibi amaçlarla hayvan beslemede ticari enzim preparatları kullanılmaktadır. Ksilanazlar bu amaçla en çok kullanılan enzimler arasındadır. Ksilanazlar bitki hücrelerinden protoplast üretimi için hücre duvarının yumuşatılmasında da kullanılır (Wong vd., 1988: 313). Ksilanaz, selülazlar ve lakkazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle birlikte, lignoselülozlu biyokütleden etanol gibi biyoyakıtların üretilmesi için kullanılabilir. Bakteriler, termostabil ksilanazların zengin bir kaynağıdır ve lignoselüloz hidrolizi için tercih edilirler. Bakteri ksilanazlarının termostabilitesi, lignoselülozun fermente edilebilir ürünlerin dekonstrüksiyonu sırasında gerekli olan sert işleme koşulları için onları uygun hale getirir. Enzimatik sakkarifikasyon sırasında ksilanaz takviyesi, yüksek biyoetanol üretiminde indirgen şekerlerin varlığını artırır (Chakdar vd., 2016: 11).

2.5. Kompostlaşma ve Etki Eden Parametreler

Hızla artan insan nüfusu, değişim gösteren ekonomik koşullar ve gelişen teknoloji, çevresel döngü sürecini olumsuz yönde etkilemekte ve ciddi bir çevre tahribatına neden olmaktadır. Çevre kirliliğinde önemli bir paya sahip olan katı atıklar bir problem haline gelmiştir.

Son yıllarda sanayinin gelişimine bağlı olarak endüstriyel atık miktarında artış ve artan nüfusa bağlı olarak da katı atık miktarında önemli oranda artışlar ortaya çıkmıştır. Endüstriyel, evsel ve tarımsal kökenli bu atıkların giderimi veya değerlendirilmesi günümüz toplumları için bir zorunluluk haline gelmiştir (Uygun, 2012: 95). Sözü edilen katı atık miktarlarının azaltılmasında kullanılan ve bir giderim yerine geri kazanım yöntemi olarak bilinen kompostlama işlemi, sonuç ürünün gübre veya toprak düzenleyici olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle kompostlama özellikle tarımda yeniden kullanılması bakımından önemli bir geri dönüşüm yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Tarımsal üretim atıklarının kompostlaştırılması ve yeniden tarımda kullanılması toprağın, kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri üzerinde önemli rol oynamaktadır. Kompostlama sonunda elde edilen organik içerik ağır, killi bünyeye sahip olan toprakların fiziksel özelliklerini düzeltir ve toprağın havalanmasını sağlar (Aggelides ve Londra, 2000: 255).

Avrupa Birliği tarafından çıkarılan Arazi Doldurma Yönergesi uyarınca her ülkeden gömerek bertaraf ettiği biyobozunur atık miktarında azaltmaya gidilmesi ve katı atıkların alternatif yöntemlerle giderilmesi talep edilmiştir. Kompostlama biyobozunur atıkların gömme ile bertaraf edilmesi dışında en sıklıkla kullanılan alternatif yöntemlerden biridir. Yukarıda belirtildiği üzere yöntem ile elde edilen nihai ürün yeniden kullanılabilir. Bu nedenle bertaraf yöntemi olmaktan ziyade bir geri kazanım yöntemi olan kompostlama özellikle yönergenin devreye girmesinden itibaren yaygınlaşmıştır (Lleo vd., 2013: 70). Ülkemizde tarımsal atıkların değerlendirilmesi çok farklı şekillerde olabilmektedir. Kompostlama, biriktirme, yakma, biyogaz vb. yöntemlerle atıklar bertaraf edilirken bunlar içerisinde kompostlama ve biyogaz yöntemleri geri kazanım sağladıkları için en avantajlı yöntemlerdir (Külcü, 2002: 6). Kompostlama, katı atıkların işlenmesi, organik maddelerin biyolojik olarak parçalanması ve son kompost ürününün hazırlanması ve pazarlanması aşamalarından oluşmaktadır (Tchobanoglous, vd., 1993: 471). Başka bir deyişle kompostlama, ayrışabilir organik maddelerin mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu biyokimyasal yolla oksijenli koşullarda parçalanmaya tabi tutularak, patojen mikroorganizma içermeyen, bol miktarda bitki besin elementleri ihtiva eden, organik madde bakımından zengin, su tutma kapasitesi yüksek, sağlık yönünden zararsız organik humusun ortaya çıkmasıdır. Kompostlama sırasında organik atık içindeki mikroorganizmalar organik maddeyi ayrıştırıp daha küçük boyutlu organik son ürünlere dönüştürürler ve reaksiyon sırasında karbondioksit, su, ısı enerjisi açığa çıkar ve humuslaşma başlar (Camcı Çetin vd., 2004: 1319).

Kompost, toprağın organik madde içeriğini, killi toprakların su geçirgenliğini ve kumlu toprakların su tutma kapasitesini artırır. Ayrıca bitki kök büyümesini teşvik eder. Su ve hava için gerekli hacmi oluşturur. Humus, toprağın organik madde ihtiyacını azaltır. Azotun tutulmasını sağlayarak yeraltı suyuna karışmasını önler. Toprak yapısını iyileştirir ve su geçirgenliğini artırır (Avcıoğlu vd., 2011: 387).

Kompost, besin maddesi içeriğinden dolayı ticari gübre kullanımını azaltabilir, ayrıca sızıntıyı azaltabildiği için daha fazla besin maddesinin bitkiler tarafından alınmasına olanak sağlar. Kompost kullanımına bağlı olarak ticari gübre kullanımının azaltılması, kompost içeriği, kullanılan miktar, toprak, iklim koşulları ve ekilen mahsule göre ayarlanabilir (Gardner, 1998: 160). Kompost ağır metal ve zararlı organik bileşikler içermez bundan dolayı çevre açısından risk taşımaz ve toprak verimliliğini de olumlu yönde etkilemektedir. Kompost diğer atık değerlendirme yöntemlerine göre düşük maliyetli bir yöntemdir. Kompostlama aynı zamanda polisiklik aromatik hidrokarbon içeren atıkların, pestisitlerin ve petrolle kirlenmiş toprakların biyoremediasyonunda da kullanılmaktadır (Crawford vd., 1993: 3899, Michel vd., 1995: 2568, Beaudin vd., 1996: 38).

Kompostlamada katı içeriğin organik olması yeterlidir ve çok çeşitli organik kaynaklar kullanılabilir. Organik kaynaklar arasında meyve, sebze, yumurta, fındık, pamuk, yün ve deri atıkları, çiçek ve bitki kalıntıları, gıda atıkları, hayvan gübreleri, kağıt ve diğer evsel atıklar önemli yer tutmaktadır (Diaz vd., 2003: 233; Neklyudov vd., 2006: 342).

Kompostlama işlemi sırasında:

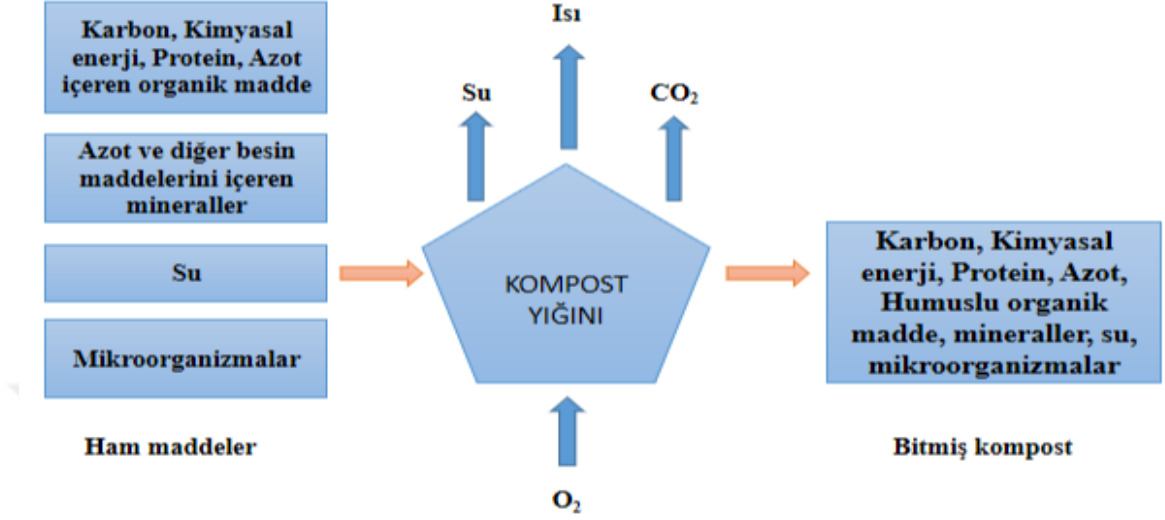
- Biyolojik olarak parçalanabilen organik maddeler toprak özelliklerini iyileştirmek üzere kullanılır.
- Organik içerikli atıklarda bulunan patojenler, böcek yumurtaları, yabancı ot ve istenmeyen bitki tohumları açığa çıkan ısı ile elimine edilir.
- Organik kökenli açığa çıkan atığın hacmi azaltılır.
- Bitki tarafından kullanılabilir azot, fosfor ve potasyum elde edilir (Tosun, 2003: 1; Tchobanoglous vd., 1993: 473).

Kompostlamada, biyolojik oksidasyonla sıcaklık sadece termofilik mikroorganizmaların yaşayabileceği ve patojenik organizmalarla yabancı otların tohumlarını öldürecek düzeye yükseltilir. Bundan dolayı kompost sıcaklığının bir süre termofilik seviyede tutulması gerekir.

Bu işlemde sonra mikrobiyal faaliyetlerle organik atıklardan kompost oluşturulur (Tınlmaz, 2002: 43). Kompostlama sırasında mikroorganizmaların metabolizmaları sonucunda açığa çıkan ısı, işlem sırasında meydana gelen ısı kaybından fazla ise sıcaklık yükselir, sıcaklığa duyarlı mikroorganizmalar ölür ve sıcaklığa dirençli mikroorganizmalar çoğalır.

İlk aşamada mezofilik bakterilerle beraber Aktinobakteri, maya ve mantarlar; yağları, proteinleri ve karbonhidratları ayrıştırırlar. Sıcaklık 40-45 °C'ye ulaştığında bakteri ve mantarlar ile beslenen protozoalar gelişmeye başlar. Bu aşamada kompostlaşmayı başlatan organizmaların büyük bir kısmı ölür ve bunların yerini 70 °C' ye kadar dayanabilen ve ısı üreten termofilik bakteriler alır. Termofilik bakteriler kendileri için yeterli besini tükettiklerinde ısı üretmeyi durdururlar ve kompost soğumaya başlar. Soğuyan kompost içerisinde materyale son özelliklerini veren, ölü bakteriler ve geriye kalan besinle beslenen, mantar ve Aktinobakterilerden oluşan yeni bir grup mikroorganizma çoğalır. Kompostlaşmanın üç evresi; mezofilik, termofilik ve olgunlaşma evreleri olarak adlandırılır (Külcü, 2007: 5).

Kompostlamada rol alan mikroorganizmaların temel gruplarını Aktinobakterileri de içine alan bakteri popülasyonu ve Fungi alemi oluşturur. Kompostlama işlemine katılan mikroorganizmalar arasında bakteriler 15-60 °C, mantarlar 20-30 °C, Aktinobakteriler 30-40 °C ve protozoalar 40 °C'de yer almaktadır. Aktinobakteriler kompostta selüloz, hemiselüloz, lignin ve kitin gibi organik maddelerin parçalanması sonucu topraktaki humus oluşumuna katkıda bulunurlar (Steger vd., 2007: 617). Nem ve amonifikasyon nedeniyle nötralden alkaliye doğru değişen çevre, Aktinobakterilerin hızlı ve yoğun şekilde üremeleri için ideal bir ortamdır (McCarthy ve Williams, 1990: 536). Aktinobakteriler kompostta çok yoğun bir şekilde üreme gösterirler ve kompost yığınlarının yüzeyinde 'yanma' olayı gerçekleşir. Kompostta az miktarlarda *Saccharopolyspora* ve *Pseudonocardia* üyeleri bulunsa da, olgunlaşmış kompost yığınlarında bulunan Aktinobakterilerin genelinin *Streptomyces* ve *Thermomonospora*'nın termofilik suşları olduğu belirlenmiştir (Williams, 1983: 1745).

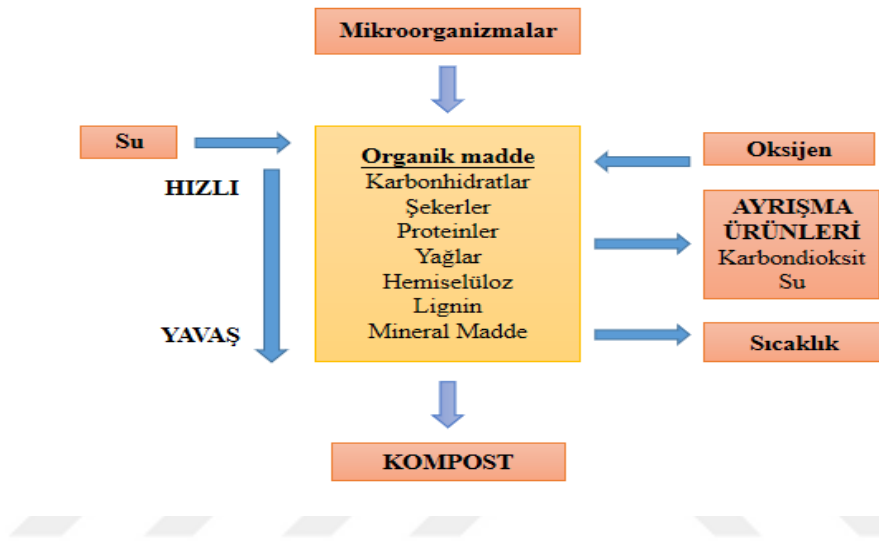


Şekil 2.1. Kompostlama İşlemi (Rynk, 1992: 6)

Kompostlama, aerobik veya anaerobik olmak üzere başlıca iki koşulda gerçekleştirilebilir. Bu proseslerdeki komposta dönüşüm oranları ortalama % 42 ve % 33 olarak belirlenmiştir (Öztürk, 2001: 375). Aerobik kompostlama, organik maddelerin serbest oksijenin mevcut olduğu ortamlarda ayrıştırılması yöntemidir. İşlem sonunda CO_2 , H_2O ve ısı oluşur. Anaerobik kompostlama ise organik maddelerin serbest oksijenin bulunmadığı ortamlarda biyolojik olarak ayrıştırılması yöntemidir ve oluşan metabolik son ürünler; CH_4 , CO_2 ve organik asitlerden oluşur (Haug, 1993: 456).

Anaerobik kompostlamada ayrıştırılan organik madde ağırlığı başına az enerji oluşması, oluşan ara ürünler sebebiyle koku probleminin ortaya çıkması, yöntemin tamamlanması için gereken sürenin çok uzun olması ve istenen sıcaklık değerlerine ulaşılamamasından dolayı kompostlama sistemlerinin çoğu aerobiktir (Tanuğur, 2009: 3). Aerobik kompostlama, oksijenli ortamda yapılan ayrışma işlemidir. Kompostlama uygun organik maddeler bir araya getirildiğinde başlar. Ham maddeler karıştırılır ve işlem için ortama yeterli miktarda hava verilir. Mikroorganizmalar oksijeni hızlı bir şekilde harcarlar.

Ortamdaki oksijen azaldıkça aerobik bozunma yavaşlar ve eğer yeteri miktarda oksijen olmazsa işlem durur. Ortama oksijen vermek için havalandırmanın sürekliliğinin sağlanması şarttır (Öztürk ve Bildik, 2005: 8). Aerobik kompostlama, madde ayrışmasını hızlandırır ve patojenlerin yok edilmesini sağlar ve istenmeyen kokuları en aza indirir (Bayer, 2008: 11). Yüksek kaliteli kompost üretiminin en hızlı yolu olan aerobik kompostlama, organik atıkları stabilize eder ve kullanılabilir hale getirir. Katma değeri yüksek kompost ürününe dönüştürmek için kabul gören bir yöntemdir (Liang vd., 2003: 132).



Şekil 2.2. Aerobik Kompostlama İşlemi (Bayer, 2008: 13)

Anaerobik kompostlama, organik maddelerin oksijensiz ortamda biyolojik olarak ayrışmasıdır. Anaerobik ayrışmanın metabolik son ürünleri metan, karbondioksit ve düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve ara ürünlerdir. Aerobik kompostlamada son ürün içerisinde humus bulunurken anaerobik kompostlamada humus yerine çamur bulunmaktadır. Literatür verisi anaerobik kompostlamada, yaş ağırlık bazında reaktöre alınan organik katı atığın yaklaşık %12' lik kısmının % 55–60 oranında CH₄ içeren biyogaza dönüştüğünü ortaya koymuştur (Öztürk, 1999, 55). Aerobik kompostlamada hedef, hacim azalması iken anaerobik kompostlamada ise enerji üretimidir. Kompost sistemlerinin tasarımında genellikle üretim maliyetlerinin düşürülmesi rol oynamaktadır. Bu kapsamda çalışmalar genellikle kompost karışımında kullanılacak malzemelerin biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi bir başka deyişle optimizasyonu üzerine yoğunlaşmaktadır (Keener vd., 2005: 288). Kompostlamaya etki eden pek çok parametre bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri tane boyutu, C/N oranı, mikrobiyal flora, nem, sıcaklık, pH, havalandırma (oksijen), zararlı maddeler, karıştırma ve süredir.

Tane Boyutu: Mikrobiyal aktivite organik maddelerin yüzeyinde oluştuğundan partikül büyüklüğünün küçültülmesi, yüzey alanındaki artışa bağlı olarak öncelikle mikrobiyal aktiviteyi teşvik etmektedir. Yüzey alanındaki artış aynı zamanda organik maddenin parçalanmasında da hızlandırıcı etki gösterir. Tane boyutundaki optimizasyon ihtiyacı temel olarak partikül büyüklüğünün ayarlanma zorunluluğundan kaynaklanmaktadır. Partiküllerin çok küçük ve yoğun olması yığın içerisindeki hava akımını engelleyerek mikroorganizmaların ihtiyacı olan O₂'nin azalmasına neden olmakta bu durum mikrobiyal aktivitenin azalması ile sonuçlanmaktadır. Partikül büyüklüğü aynı zamanda mikroorganizmanın karbon ve azot kullanımında etkilemektedir (Bayer, 2008: 27). Kompostlama prosesinde tercih edilen en büyük parça büyüklüğü 5 cm'den düşük olmalıdır (Tchobanoglous, vd., 1993: 474). Partikül büyüklüğüne bağlı olarak karşılaşılan sorunlarda kullanılan yaygın çözümler arasında hacim düzenleyici materyallerin kullanılması da bulunmaktadır. En yaygın kullanılan hacim düzenleyici materyaller ağaç kabukları, talaş, odun yongası, parçalanmış lastik ve samandır (Finstein ve Morris, 1975: 141).

C/N oranı: Kompostlama için en önemli faktörden biri C/N oranıdır. Mikroorganizmalar yüksek yapılı bitkiler gibi besin maddesi olarak karbon, azot, kükürt, fosfor, kalsiyum, magnezyum, potasyum maddelerinden faydalanırlar ve bunların derişimleri kompostun besin değerini etkilemektedir. Azot hariç diğer bütün elementler evsel atıklarda yeteri kadar bulunduğundan kompostlamanın devamı için C/N oranı büyük önem taşımaktadır (Varank, 2006: 26). Mikroorganizmalar karbonu enerji ve büyüme için kullanırken, azotu protein oluşturmak için kullanırlar. Karbon, mikroorganizmalar tarafından hücre oluşumu ve büyümesi için kullanılmaktadır. Mikrobiyal metabolik faaliyetler sırasında CO₂ oluşur ve atmosfere salınır. Bir başka deyişle CO₂ salınımı mikrobiyal aktivitenin devam ettiğinin bir göstergesidir. Kompostlama için kullanılan hammaddenin uçucu katı madde içeriği ile CO₂ salınımı doğru orantılıdır. Artan uçucu katı madde miktarı daha fazla CO₂ salınmasına neden olacaktır. Uçucu katı madde miktarı kompost malzemesinin içerdiği toplam karbon miktarını temsil etmektedir. Materyalin içerdiği azot miktarı, atığın türüne göre değişmektedir (Epstein, 2011: 17; Öztürk vd., 2015: 252). Yüksek C/N oranı kompost işlemini yavaşlatırken, düşük C/N oranı ise amonyak salınımının meydana gelmesine yol açmaktadır. Kompostlama işlemi için uygun C/N oranı 20-40 arasında değişmektedir (Epstein, 2011: 17).

Mikrobiyal flora: Kompostlama işleminde rol oynayan mikroorganizmalar; funguslar, Aktinobakteriler ve bakterilerdir. Kompost, mikroorganizmaların oluşturduğu aerobik bir sürecin ürünüdür. Kompost oluşumunda mikroorganizmalar organik maddeyi karbon kaynağı olarak kullanırlar. Mikroorganizmaların gelişim ve aktiviteleri sonucu sıcaklık, CO₂, H₂O ve humus oluşur (Epstein, 1997: 352). Kompostlama sırasında mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler bazı kompleks yapıya sahip organik bileşiklerin basit suda eriyebilir bileşikler haline gelmesini sağlarlar (Benitez vd., 1999: 297). Kompost içerdiği yararlı mikroorganizmalar, besinler ve organik madde nedeniyle toprak kalitesini artırır. Organik substratların ayrışmasını başlatan mezofilik mikroorganizmalar protein, şeker ve nişasta substratlarını okside ederler. Mezofilik bakteri ve funguslar, sıcaklık yaklaşık 40 °C'ye ulaştığında yerini termofil bakteriler alır. En yüksek sıcaklıklara ulaşılan termofilik aşamada termofilik funguslar ve Aktinobakteriler ayrışmayı sürdürürler (Zibilske, 1998: 487).

Kompostlamanın başlangıcında, mezofilik bakteri ve mantarlar, monosakkaritler, nişasta ve lipitler gibi organik maddenin çözünür ve kolayca parçalanabilen kısımlarını degrade ederler. Bakteriler organik asitler üretir, bu sırada pH 5–5.5'e düşer. Isı, ekzotermik bozunma reaksiyonlarından açığa çıktıkça, sıcaklık kendiliğinden yükselmeye başlar. Proteinlerin bozulması, amonyak salınımına neden olur ve pH hızla 8-9'a yükselir. Bu aşama birkaç saatten birkaç güne kadar sürebilmektedir. Kompost, sıcaklık 40 °C'ye ulaştığında termofilik faza girer ve mezofilik bakterilerin yerini termofilik bakteri ve mantarlar alır ve atığın bozunma oranı artar. Sıcaklık 55–60 °C'yi aşarsa, mikrobiyal aktivite ve çeşitlilik önemli miktarda azalır. Isıtmadan sonra, pH nötr bir seviyede stabilize olur. Termofilik evre birkaç günden birkaç aya kadar devam edebilir. Kolayca parçalanabilen karbon kaynakları tüketildikten sonra kompost soğumaya başlar. Soğuduktan sonra kompost stabildir. Mezofilik bakteri ve mantarlar yeniden ortaya çıkar ve bunu olgunlaşma aşaması izler. Bununla birlikte, türlerin çoğu ilk mezofilik fazda görev alan mikroorganizma türlerinden farklıdır. Aktinobakteriler genellikle bu aşamada yoğun bir şekilde büyür. Bunun yanısıra kompost karışımında genellikle bazı protistler ve geniş bir makroorganizma grubu bulunur. Biyolojik süreçler yavaş ilerler, bu sırada aktiviteye bağlı olarak kompostun nem içeriği ve olgunluğu artış gösterir. Fazların süresi, organik maddenin bileşimine ve oksijen tüketimi ile belirlenebilen prosesin verimliliğine bağlıdır. (Tuomela, 2002, 10).

Nem: Nem oranı kompostta mikroorganizmaların faaliyetleri açısından oldukça önemli bir parametredir. Yüksek nem içeriği bakterilerin aktivitelerini artırır ve kompostlamanın daha hızlı oluşmasını sağlar. Biyokimyasal bozunmayı sağlayan mikroorganizmalar, besinlerini ancak suda çözülmüşlerse alabilirler. Bu nedenle ortamda su bulunması gereklidir. Nem içeriği kompostlama prosesi boyunca % 40-60 arasında tutulmalıdır (Meenembal vd., 2003: 442). Nem içeriği % 30'un altında ise, ayrışma oranı hızla azalmaktadır ve %70'in üstünde ise mikrobiyal aktivitenin yavaşlaması ile koku oluşmasına ve süzüntü suyuna besin maddesi bulaşmasına neden olmaktadır. Kompostlamanın nihai başarısı, ilk hammaddelerin nem içeriğine bağlıdır. Araştırmalara göre, aerobik kompostlamanın optimum nem içeriği aralığı %50-%70'tir (Bernal vd., 2009: 5445). Kompost materyallerinin farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kompostlama reaksiyon sistemi nedeniyle, farklı kompostlama sistemleri arasında optimum nem içeriğinde de farklılıklar vardır (Gajaakshmi ve Abbasi, 2008: 314). Lei ve ark. (Lei vd., 2011: 55), su içeriği % 65 olduğunda, inek gübresinin kompostlama işleminde en yararlı olduğunu, buna karşılık domuz gübresi kompostlaması için önerilen nem içeriğinin % 66 olduğunu bildirmiştir.

pH: pH değişikliği kompostlama sürecini etkileyebilir; bu nedenle, pH'ın etkili kontrolü, kompostlama için çok önemlidir. Genel olarak, 7.5 ile 8.5 arasındaki bir pH değeri, kompostlama için en uygun olanıdır (Bernal vd., 2009: 5446). Bununla birlikte çalışmaların çoğu, farklı türde organik (biyokömür) ve inorganik (kireç, zeolit, kaolin, bentonit ve kömürün) katkı maddeleri ile pH değerinin 6,7 ile 9,0 arasında önemli ölçüde optimize edilebildiğini ortaya koymuştur. Mikroorganizmaların yaşadığı belli bir pH aralığı mevcuttur. Genel olarak bakterilerin optimum pH aralığının 6-8 arasında iken mantarlar asidik ortamı tercih ederler. Başlangıç değeri ne olursa olsun kompostlaşma süresi sonunda pH 7.8-8.0 arasında stabil hale gelir (Graves ve Hattemer, 2000: 9). Kompostun ilk aşamasında CO₂ ve organik asitlerin oluşmasıyla pH değeri yaklaşık 5-6 seviyesine düşerken, sonraki aşamalarda 8.0-8.5 seviyesine kadar ulaşabilir. Bu durum, CO₂ eliminasyonundan olduğu kadar proteinlerin ayrışmasından da ileri gelmektedir (Sharma vd., 1997: 457). Amonyak gazı biçiminde ortamdaki azotun kaybını en aza indirmek için pH değeri, 8,5'in üstüne çıkmamalıdır (Tchobanoglous vd., 2002: 457).

Sıcaklık: Kompostlamada mikrobiyal aktiviteyi etkileyen önemli faktörlerden biridir (Avnimelech vd., 2004: 114). Kompostlama sürecindeki katı atıklarda gözlenen sıcaklık artışı, solunum metabolizmasıyla ilgili olan ekzotermik reaksiyonlar ile meydana gelmektedir.

Oksijenli kompostlama sırasında üç sıcaklık evresi gözlenir; bunlar mezofilik, termofilik ve soğuma evresi olarak bilinmektedir. Kompostta yüklemesi yapılan substratın ortamda bulunan mikroorganizmalar tarafından biyokimyasal olarak dönüştürülmesi süresince ortaya çıkan ısı, ortam sıcaklığının artışı olarak kendini gösterir. Kompost sıcaklığı karışım hazırlandıktan sonra başlangıç fazı olarak da bilinen mezofilik (25-40 °C) koşullardan termofilik (35-65 °C) koşullara ulaşır. Kompostlama işleminde kaliteli bir ürün elde etmek için sıcaklık 55-70 °C arasında tutulmalıdır. 55 °C'nin altında kompostta insan, hayvan ve bitki sağlığı için tehdit oluşturan patojenlerin yok edilmesi için daha uzun bir süreç gerekmektedir. 70 °C üzerinde ise kompostta bu sıcaklığa adapte olabilen birkaç tür kalacak ve kompostun verimi düşecektir. Süreç ilerledikçe tüketilebilir besin kaynakları mikroorganizmalarca metabolize edilip kullanıldığı için kompostun sıcaklığı düşmekte ve çevre sıcaklığına yaklaşmaktadır. Sıcaklık, kompostlama kalitesini yansıtan en önemli göstergedir ve değişimi kompostlama aşamasını ve tamamlanma durumunu yansıtabilmektedir (Bian vd., 2017: 582). Termofilik faz sırasında daha yüksek bir sıcaklık, kompost materyallerinin daha yüksek mikrobiyal bozunması ile ilişkilidir (Onwosi vd., 2017: 143). Sonuç olarak, termofilik faz ne kadar erken meydana gelirse, organik madde o kadar erken bozulur ve nemlenir (Awasthi vd., 2014: 215). Sıcaklıklardaki bu düşüş kompostlama işleminin tamamlandığının, olgun ve stabil ürünün oluştuğunun göstergesidir (Diaz vd., 2007; Epstein, 2011: 45). Sıcaklık dağılımı, kompost yığınının nem içeriği, havalandırma hızı, atmosfer koşulları ve C/N oranından etkilenmektedir (Avnimelech vd., 2004: 115).

Oksijen(havalandırma): Aerobik kompostlama için mikrobiyal aktivite oksijen varlığı ile mümkündür. Kompostlama oksijenin tüketildiği ve karbondioksitin üretildiği bir oksidasyon işlemidir. Dolayısıyla kompostlama süresince bu iki gazın izlenmesi, kompostlama aktivitesinde güvenilir bir gösterge temin edebilir (Stoffella ve Kahn, 2001: 78). Biyolojik parçalanma için oksijen ihtiyacının sağlanması, ortamdan fazla nemin uzaklaştırılması ve prosesteki sıcaklığın kontrol edilmesi amacıyla havalandırma uygulanır (Meenembaal vd., 2003: 442). Kompostlama süreci aerobik şartlar altında gerçekleşen bir işlem olduğundan süreç boyunca oksijene ihtiyaç duyulmakta ve bu nedenle havalandırma yapılmaktadır. Malzemenin boşluklu olması oksijenin mikroorganizmalar tarafından erişilebilir olması açısından önemlidir. Boşluk miktarı hammaddeye, nem oranına ve partikül boyutuna göre değişmektedir. Ağaç parçaları, talaş ve bahçe atıkları gibi doğal malzemeler veya kauçuk parçaları gibi yapay malzemeler hacim malzemeleri olarak kullanılmaktadır.

Oksijenin sınırlayıcı faktör olmaması için işlem boyunca ortamdaki oksijen miktarı %10 üzerinde tutulmalıdır. Oksijenin %5'in altına düşmesi durumunda ise metan gibi anaerobik metabolizma ürünü olan gazların oluşumu gözlenir (Epstein, 2011: 354). Havalandırma yetersiz olursa kompostta oksijen miktarı azalmakta ve ortamdaki mikroorganizmalar oksijensiz solunum yapmaya başlamaktadır. Yeterli miktarda oksijen bulunmazsa ortam anaerobik olur. Anaerobik bozulmada farklı mikroorganizma yapısı ve farklı biyokimyasal reaksiyonlar görülür. Ayrıca anaerobik işlem aerobik işlemden daha yavaştır ve verimi daha azdır. Anaerobik işlemlerde metan (CH₄), karbondioksit, organik asitler, hidrojen sülfür (H₂S) oluşur. Bu bileşiklerin birçoğu, çok ağır koku yaydığından kontrol edilmesi gerekir. Anaerobik koşullarda, oluşan kötü kokunun giderilmesi ve kompost ürününün daha kısa sürede elde edilebilmesi için aerobik koşulların korunması gerekir (Öztürk ve Bildik, 2005: 10). Havalandırma oranı fazla olur ise kompost yığını ısınmamakta ve kompostlama yapılamamaktadır (Rasapoor vd., 2008: 572).

Karıştırma: Besinlerin ve mikroorganizmaların daha düzenli ve homojen dağılımını sağlamak için kompostlama süreci boyunca karıştırma işlemi uygulanmaktadır (Stelmachowski vd., 2003: 252). Organik atıkları karıştırma, nem içeriğini optimum seviyeye yükseltmek veya indirmek için önemlidir. Kompostlama süreci boyunca organik materyalin “döndürme” olarak adlandırılan bir işlemle karıştırılması aerobik aktivitenin korunmasında büyük önem taşır. % 50–60 maksimum nem ve 15 günlük bir kompostlama süresine sahip olan bir organik atık için, ilk döndürme 3. günde önerilmektedir. Sonrasında 3'er günlük periyotlar hâlinde ve toplamda 4-5 kez çevirme koşuluyla organik materyalin homojen karışımının sağlanması gereklidir (Tchobanoglous vd., 1993: 459).

Süre: Ham maddenin kompostta dönüşmesi için gereken sürenin uzunluğu; kullanılan madde, sıcaklık, nem ve havalandırma sıklığı gibi birçok parametreye bağlıdır. Uygun nem içeriği, C/N oranı ve sıkça havalandırma mümkün olan en kısa kompostlama süresini sağlar. Yetersiz nem, yüksek C/N oranı, düşük sıcaklık, yetersiz havalandırma, büyük partiküller ve ortamda yüksek miktarda dayanıklı maddenin (odun kökenli maddeler) olması kompostlama işlemini yavaşlatan etkenlerdir. Gereken kompostlama süresi, kompostun kullanım amacına göre değişebilmektedir (Bayer, 2008: 31).

Zararlı Maddeler: Bazı organik maddeler kompost ve mikroorganizmalar için zararlı maddeler taşıyabilir. Mangan, bakır, çinko, nikel, krom ve kurşun gibi ağır metaller bunlar arasında yer almaktadır. Kompostta ağır metal arttıkça sıcaklık düşer.

Sıcaklık düşüşleri sırasında mikroorganizmaların metabolik faaliyetlerinin yavaşladığı ve bazı mikroorganizmaların öldükleri belirlenmiştir. Mikroorganizma ölümleri ağır metallerin yüksek sıcaklıktaki toksik etkilerine bağlıdır. Mikrobiyal faaliyetin azalması veya tamamen durmasına bağlı olarak ani sıcaklık düşüşleri görülebilmektedir (Halistürk vd., 2006: 17).

Kompostun yararları: Kompost toprağın organik madde içeriğini, killi toprakların geçirgenliğini ve kumlu toprakların su tutma kapasitesini artırır. Ayrıca bitki kök büyümesini teşvik ederek, su ve hava için gerekli hacimi oluşturur. Humus, toprağın organik madde ihtiyacını azaltır ve yer altı suyuna karışmasını önler. Azotun tutulmasını sağlar. Humus açısından zengin topraklar; yetiştirilen bitkilerin daha sağlıklı, hastalıklara ve zararlılara karşı daha dayanıklı olmasına olanak sağlamaktadır ve böylece ilaçla mücadele ihtiyacını da azaltmaktadır (Uygun ve Dursun, 2012: 98). Kompost erozyon kontrolünde, maden çıkarılmış alanların, eski kum/çakıl ocaklarının ve yanmış orman alanlarının iyileştirilmesinde, golf sahaları, peyzaj çalışmaları, çim sahaları, parklar ve oyun alanlarının yapımında ve yol kenarlarında kullanılır. Ayrıca kompostun bitki gelişimine olumlu etkisi nedeniyle tarla, bahçe uygulamaları, seracılık, meyvecilik, fidanlık ve çiçekçilikte de yaygın olarak kullanılmaktadır. Koku yok etmede filtre malzemesi olarak ve düzenli depolamada son örtü malzemesi olarak kullanım alanları bulunmaktadır (Varank, 2006: 33).

Spor oluşturan bakterilerin kompostlaşmaya etkisi Rainisalo ve ark. tarafından real time PCR analizi ile incelenmiştir. Kompostlaşma sırasında evrelerden alınan numuneler incelendiğinde *Streptomyces* spp. tüm evrelerde belirlenmiştir. Sonuçlar kompost son ürününde sıcaklığın önemli olmadığını ortaya koymuştur (Rainisalo vd., 2011: 7981). *Agaricus brasilienses* cinsi yenilebilir bir mantar üretimi için hazırlanan kompostta üretim için şeker pancarı küspesi kullanılmıştır. 2 gün aralıklarla karıştırılan ve 14 gün süresince takip edilen sistemler 55-65 °C sıcaklığa ulaşmıştır. Kompost numunelerinden yapılan izolasyon sonucunda mikrobiyal florayı büyük oranda *Bacillus* familyasına ait mikroorganizmaların kontrol ettiği anlaşılmıştır. Bu familyadan sonra en fazla görülen grup *Streptomyces* spp. ağırlıklı olmak üzere Aktinobakteri grubudur (Silva vd., 2009: 593).

Belediye organik atıklarının kompostlanmasıyla açığa çıkan fosfolipid yağ asitlerinin derişimi olgunlaşma parametresi olarak Steger ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada izlenmiştir. Sonuçlar olgunlaşma evresinde tek aktif grup içeren yağ asitlerinin varlığını ortaya koymuştur. Mikrobiyal floranın da incelendiği çalışmada Aktinobakteri popülasyonunun toplamın %50'sini oluşturduğu belirlenmiştir (Steger vd., 2007: 618).

Literatür verisi incelendiğinde kompost karışımlarında her sıcaklıkta üreme potansiyeli olan ve bağlı olduğu filumda baskın olan *Streptomyces spp.*'nin kompost hızlandırıcı olarak önemli bir potansiyele sahip olduğu anlaşılmaktadır.

2.6. Prokaryotik Taksonomi

Sistemik, organizmaların özelliklerini ve çeşitliliklerini, organizmalar arasındaki farklılıkları ve ilişkilerini ortaya koyan sınıflandırma, isimlendirme, identifikasyon, genetik mekanizma analizi, filogeni ve evrimsel süreçleri kapsayan bir bilim dalıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993: 20). Bir başka deyişle sistemik; biyoçeşitliliğin ve organizmaların birbirleriyle arasındaki etkileşim olarak da ifade edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar sistematik; taksonomi, ekoloji, biyokimya, patoloji, genetik ve moleküler biyoloji bilimlerinden faydalandığını belirtmişlerdir (Kämpfer ve Glaeser, 2013: 130). Prokaryot taksonimi de kullanılan moleküler tekniklerin keşfinden önce, sınıflandırmada organizmanın fenotipik özellikleri kullanılmaktaydı. Fenotipik özellikler bakteri genomunun çok küçük kısmını ifade etmektedirler ve çevre şartlarından etkilenmektedirler. Bundan dolayı, fenotipik yöntemler bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında yeterli değildir (Sow vd., 2005: 410). Teknolojik gelişmelerden sonra, sistematik çalışmalarda genotipik yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla sınıflandırmanın daha kesin ve doğru olarak yapılabilmesi sağlanmıştır. Çevresel değişimlerden etkilenmeyen ve evrimsel olarak yayılım gösteren genomik bilgiyi kullanan genotipik yöntemler, sistematik çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Vandamme vd., 1996: 412). Genomik bilgi elde etme yöntemleri çoğunlukla DNA/RNA moleküllerine yöneliktir. Kemotaksonomide kullanılan hücre bileşenlerinin aksine RNA miktarı, kromozomal DNA miktarı ve kompozisyonu organizmaların gelişme koşullarından ve çevresel değişimlerden etkilenmez. Ayrıca, nükleik asitler canlılar arasında evrensel olarak dağılmıştır ve geniş oranda standart olarak kullanılabilir özellikte sahiptirler (Coenye vd., 2005: 149).

Prokaryot sınıflandırması günümüzde polifazik taksonomi adı verilen fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik bilginin kombinasyonuna dayanmaktadır (Schleifer, 2009: 534). Taksonomi çalışmalarında uygulanan fenotipik yöntemler; morfoloji, antijenik özellikler, büyüme aralığı, metabolik üretim, patogeneze ve mikroorganizmanın ekolojisidir. Aktinobakteri cinslerinin sınıflandırılmasında geçmiş yıllarda morfolojik özelliklerinden yararlanılmıştır. Bununla birlikte günümüzde farklı taksonların tanımlanmasında morfolojik özellikler temel kriter olmakla birlikte, farklılıkları tanımlamak için yeterli belirleyici unsur olarak kabul edilmemektedirler (Barka vd, 2016: 5).

Nümerik taksonomi, kullanılan testlerin sayısını artırarak, suşlar ve türler arasındaki fenetik benzerlik katsayılarını hesaplayarak fenotipik tanımlamayı geliştirmiştir (Sneath ve Sokal, 1973: 266). Nümerik taksonominin amacı, taksonomik birimleri morfolojik, besinsel, biyokimyasal, degradesyon ve fizyolojik özellikler gibi çok sayıda fenotipik veriyi kullanarak homojen gruplara dağıtmaktır.

Kemotaksonomi, prokaryotların çeşitli hücrenel bileşiklerinin araştırılmasına dayanmaktadır. Kemotaksonomi analizlerinde kullanılan yapısal bileşikler yağ asitleri, polar lipitler, solunum kinonlar, dış zar pigmentleri, sitoplazmik poliaminler, peptidoglikan, teikoik asitler, mikolik asitler ve lipopolisakkaritlerdir (Daniels vd., 2007: 473).

Genotipik karakterizasyonda ise DNA-DNA hibridizasyonu, DNA'nın G+C içeriği ve 16S rRNA gen dizi analizi kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Ebers, 2006: 152; Tindall vd., 2010: 251). Aktinobakteri üyelerinin başlangıçta morfolojik, kimyasal ve fizyolojik özelliklere dayanan sınıflandırılması. günümüzde 16S rRNA geni nükleotit dizileme analizlerine dayanmaktadır (Sentausa ve Fournier, 2013: 792).

2.7. 16S rRNA Gen Bölgesi

Moleküler teknikler, türlerin ilişkilerinin anlaşılmasında ve tanımlanmasında nümerik ve kemotaksonomik tekniklerle birlikte kullanılan çalışmalardır (Hassan ve Wellington, 2009). 16S rRNA yaklaşımı mikrobiyal taksonomide geniş çapta kullanılan standart tekniklerden biridir (Woese, 1987: 253). 16S rRNA geni RNA'nın alt birimi olup 1540 nükleotidden oluşur. 16S rRNA gen bölgesi moleküler tür teşhisi çalışmalarında, filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve bakteriyel tanımlama çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu bölgeler tür için spesifiktir ve çok sayıda korunmuş bölge içerdiğinden türlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Brown-Elliott vd., 2006: 260). Metagenomik analiz çalışmalarında 16S rRNA geni yaygın bir hedef olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA geninin bütün bakterilerde bulunması, fonksiyonel olarak korunmuş olması, uygun büyüklükte olması (~1550 bç), çok değişken bölgeler içermesi sayesinde PCR primerlerinin oluşturulabilmesi ve değişken bölgelerin tür analizinde belirleyici olması, bu genin dizilerinin mevcut veri tabanlarında ulaşılabilir ve kıyaslanabilir olması metagenomik çalışmalarda tercih edilme sebebidir (Turan vd., 2018: 24; Neelakanta ve Sultana, 2013: 39). 16S rRNA geni yüksek derecede korunumlu nükleotit dizilerinden oluşur ve bazı değişken nükleotit bölgeleride bulunmaktadır. 16S rRNA bulunan değişken bölgeler cins ya da türe özgü olabilmektedir (Jenkins vd., 2012: 483).

16S rRNA genleri, farklı bakteriler arasında önemli sekans farklılıkları gösteren dokuz değişken bölge içerirler ve içerdiği değişken bölgelerin sekansları diagnostik çalışmalar ve diğer bilimsel çalışmalar için hedef oluşturmaktadır. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda 16S rRNA dizi analizlerinde % 97'den daha az benzerlik gösteren suşların, farklı türler olduğu belirlenmiştir (Chakravorty vd., 2007: 331).

Prokaryotların tanımlanması ve sınıflandırılmasında moleküler belirteç olarak kullanılan 16S rRNA gen dizisine dayanan filogenetik analizin önemi nedeniyle, 16S rRNA gen dizi analizi mümkün olduğu kadar standardize yapılmalıdır. Dizi kalitesi, dizi hizalama ve ikili dizi benzerlikleri ile filogenetik ağaçların hesaplanması gibi önemli aşamalar 16S rRNA gen dizilerinin analizinde göz önünde bulundurulmalıdır. Analiz yapılırken sadece genin tamamına yakın uzunluktaki (en az 1300 nükleotid) yüksek kaliteli diziler kullanılmalıdır (Kämpfer ve Glaeser, 2013: 131). 16S rRNA gen dizisi verileri, bir suşun taksonomik durumunun göstergesini sağlayabilir ve suşun yeni bir türü temsil edip etmediğini veya daha önce tanımlanan bir tür olup olmadığını da belirleyebilir. Bu, hem mevcut taksonlara ikili dizi benzerliklerinden hem de filogenetik analiz ve 16S rRNA gen dizileri kullanılarak ağaçlandırmadan sonra dizinin taksonomik küme bağlantısından belirlenebilir.

2.8. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni

Filogenetik çalışmaların amacı tüm organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi atasoy ilişkileri şeklinde ortaya çıkarmaktır. Organizmaların sahip olduğu moleküler mekanizmalar, tek bir ataya sahip olduklarını gösterirler ve ortak atadan evrimleşmeleri sayesinde türler, birbirleriyle ilişkilendirilebilirler (Singh, 2015: 256; Xiong, 2006: 131). Moleküler filogenetik, gen ve protein dizilerindeki mutasyonları tespit ederek evrimsel yakınlığı ve bu değişikliklerin hızını ve düzenini belirleyerek organizmaların evrimsel tarihlerini ortaya çıkarmaktadır (Baloğlu vd., 2012: 335). Filogenetik analizler hızlı DNA dizilenme tekniklerinin gelişmesi ile daha yaygın hale gelmiştir. Bugüne kadar, filogenetik analiz için yararlı olan büyük veritabanları oluşturulmuştur (Leep vd., 2004: 163). Filogenetik analizlerde ilk olarak incelenecek dizi elde edilir. Daha sonra bu diziler referans dizi olarak bilinen daha önce saptanmış ve doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir.

Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmelerde çeşitli türlerden elde edilen diziler GenBank, EMBL gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak hizmete sunulmaktadır (Sancar, 2017, 12; Mount, 2001: 78).

Filogenetik çalışmalarda evrimsel ilişkiyi göstermek için çeşitli şemalarla ve istatistiksel verilerle sonuçlar filogenetik ağaçlara dönüştürülür. Filogenetik ağaçlar dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin görsel olarak anlaşılabilmesini sağlar ve türler arasındaki ilişkilendirmeyi yapmak, zaman içinde değişime uğrayan türlerin ortak atalarını belirlemek için filogenetik ağaçlar kullanılmaktadır (Freeman vd., 1999: 441). Dizilerin hizalanması sonucu elde edilen hesaplanmış genetik uzaklık, her bir takson çifti arasındaki mesafelerin bir matrisinin oluşturulmasında kullanılmaktadır ve bu taksonlar arasındaki mesafeler sonucunda filogenetik ağaçlar oluşturulur (Saitou ve Nei, 1987: 407).

Filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlayabilmektedir. Filogenetik ağaçlar dallardan ve düğümlerden oluşmaktadır. Dallar, türler arasındaki popülasyonun zaman içerisindeki uyumunu gösterir ve filogenetik ağaçlar köklü ya da köksüz olabilmektedir. Köklü ağaçlar soy hattının nereden köklendiği bilindiği için ayrılma olayının belirlenmesi yapılabilir ancak köksüz ağaçlarda, türlerin önce ya da sonra açığa çıktığı ifade edilmez ve ayrılma olayı belirlenemez (Freeman ve Herron, 1999: 444). Filogenetik ağaçlarda her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan bir taksona denk gelir ve ağaçta bulunan dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtmaktadır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirlerine yakın dallarda yer almaları ile ayırt edilmektedirler. Ağaçtaki dalların uzunluğu ise dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını ifade etmektedir (Saitou ve İmanish, 1989: 408).

Moleküler verilerden filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan pek çok yöntem vardır. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan yöntemler ikiye ayrılmaktadır. Bu yöntemler karakter temelli ve mesafe temelli yöntemlerdir (Baloğlu vd., 2012: 336). Belirli bir kriter altında olası ağaçların tamamını veya geniş bir kısmını inceler ve en olası ağacı seçer ve bu metod 'Karakter Temelli Yöntemler' olarak adlandırılır. Diğer strateji ise bir ağacın bölgesel topolojik ilişkisini inceler ve adım adım en olası ağacı oluşturur ve bu metoda da 'Mesafe Temelli Yöntemler' adı verilir (Saitou ve İmanishi, 1989: 409).

Filogenetik ağaç oluşturmada farklı yöntemler (Maximum Parsimoni, Maximum Likelihood, Mr. Bayes, UPGMA) kullanılırken sunulan tez çalışmasında oluşturulan filogenetik ağaçlar komşu birleştirme yöntemi (Neighbor-joining method) ile yapılmıştır (Michener ve Sokal, 1957: 495). Neighbor-Joining metodu ağaç oluşturmak için birbirine en yakın türleri kullanır ancak hepsinin kökten eşit uzaklıkta olduğunu varsaymaz ve sadece bir tane ağaç oluşturulur ve diğer olası ağaç topolojileri test edilmez (Baloğlu vd., 2012: 337).

Filogenetik ağaç oluşturmak için çok sayıda program kullanılmaktadır. Filogenetik analizde en çok tercih edilen programlar MEGA, PAUP, PHYLIP ve MRBAYES' dir (Freeman ve Herron, 1999: 2). Karşılaştırmalı filogenetik analizlerde ilgili türlerin dizilerine BLAST ve CLUSTAL X sekans karşılaştırma veri tabanlarından ulaşılabilir ve 16S rRNA gen sekansının hizalanması için kullanılabilir (Hibbett vd., 2007: 513, Porter ve Golding, 2012: 35749).



3. MATERYAL-METOD

3.1. Aktinobakteri ve *Streptomyces* Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları

Aktinobakteri ve *Streptomyces* izolatları halen devam etmekte olan 118O231 kodlu “Termofilik Aktinomisetlerin Kompost Hızlandırıcı Olarak Etkilerinin İncelenmesi” konulu TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan izolasyon çalışmaları sonucu elde edilmiştir. İzolasyon çalışmaları sırasında iki kompost karışımı hazırlanmıştır. İlk karışım gübre, saman ve topraktan oluşurken ikinci karışım da toprağın yerine mikroorganizma kaynağı olarak aktif çamur kullanılmıştır. Aktif çamur örnekleri Osmaneli Belediyesine ait atık su arıtım tesisinden alınmıştır. Kompost karışımları 15 gün süresince izlenmiş ve 12-24 saat arasında değişen aralıklarla sıcaklık, pH ve nem ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kompost karışımlarının kuru toplam ağırlıkları 300 kg olarak belirlenmiştir. Bu değer C/N: 30’a karşılık gelmektedir. Mikroorganizma izolasyonu için hazırlanan kompost karışımlarının bileşenleri Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Aktinobakteri İzolasyonu İçin Hazırlanan Kompost Karışımları

Sistem No	Temel bileşen	Mikroorganizma kaynağı
1	Gübre, Buğday sapı	Aktif çamur
2	Gübre, Buğday sapı	Toprak

Kompost denemeleri sonucunda sıcaklık değerleri 63 °C’ye kadar yükselmiş, izolasyon çalışmaları farklı sıcaklıkta alınan numunelerden gerçekleştirilmiştir. Sistemlerin nem oranı % 50’nin üzerindedir. pH değerleri 8 civarlarında sabit kalmıştır. Bu değer mikroorganizma üremesi için engel teşkil etmemektedir. Toprak ve aktif çamur kullanılarak hazırlanan kompostlardan elde edilen numuneler karışıklık olmaması amacıyla toprak numunesi olarak TN kısaltmasıyla aktif çamur için ise aktif çamur numunesi olarak AÇN kısaltmasıyla Tablo 3.2.’de verilmiştir. Numunelerin alındığı sıcaklık değerleri birbirine yakındır ve bazı numuneler arasında sıcaklık farkı 5 °C’nin altındadır. Bu durumda olan numuneler için birleştirme yapılmış ve izolasyon birleştirilmiş numunelerden gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.3.’de birleştirilen toprak ve aktif çamur örnekleme sıcaklıkları verilmiştir. Tez çalışması kapsamında ayrıca aktif çamurdan numune alımı gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. İzolatların Eldesinde Kullanılan Toprak ve Aktif Çamur Sıcaklıkları

Örnek Sayısı	Gün	Toprak-Aktif çamur	Sıcaklık
1	3.gün	T.N.1	63
2	3.gün	T.N.2	63
3	4.gün	T.N.1	61
4	4.gün	T.N.2	61
5	5.gün	T.N.1	39
6	5.gün	T.N.2	49
7	6.gün	T.N.2	39
8	7.gün	T.N.1	35
9	7.gün	T.N.2	35
10	8.gün	T.N.1	49
11	8.gün	T.N.2	49
12	3.gün	AÇ N.1	53
13	3.gün	AÇ N.2	53
14	4.gün	AÇ N.1	61
15	4.gün	AÇ N.2	61
16	5.gün	AÇ N.1	48
17	5.gün	AÇ N.2	48
18	6.gün	AÇ N.1	48
19	6.gün	AÇ N.2	48
20	7.gün	AÇ N.2	39
21	7.gün	AÇ N.2	39
22	8.gün	AÇ N.2	48

*: T.N, Toprak numunesi **: AÇN, Aktif çamur numunesi

Tablo 3.3. Birleştirilen Toprak ve Aktif Çamur Sıcaklıkları

TOPRAK	
Sıcaklık	Birleştirilen Örnekler
1) 49 °C	5.gün T.N.1 5.gün T.N.2 8.gün T.N.1 8.gün T.N.2
2) 61-63 °C	4.gün T.N.1 4.gün T.N.2 3.gün T.N.1 3.gün T.N.2
AKTİF ÇAMUR	
Sıcaklık	Birleştirilen Örnekler
1) 48 °C	8.gün A.Ç.N.1 8.gün A.Ç.N.2 6.gün A.Ç.N.1 6.gün A.Ç.N.2 5.gün A.Ç.N.1 5.gün A.Ç.N.2
2) 53 °C	3.gün A.Ç.N.1 3.gün A.Ç.N.2
3) 61 °C	4.gün A.Ç.N.1 4.gün A.Ç.N.2
4) A: Aktif çamur	---

3.2. Aktinobakteri ve *Streptomyces* İzolasyonu

Çalışmada kullanılan kültür ortamları ve solüsyonların içerikleri EK-1 ve EK-2'de yer almaktadır. İzolasyon çalışmalarında klasik yöntemlerden biri olan Dilüsyon Plaka Tekniği kullanılmıştır.

3.2.1. Dilüsyon Plaka Yöntemi

Kompost çalışmalarından alınan toprak ve aktif çamur numuneleri ilk olarak 15 gün süreyle laboratuvar ortamında kurutulmuştur ve sonrasında dilüsyon plaka yöntemi ile izolasyon aşamasına geçilmiştir. Seçilen toprak ve aktif çamur örneklerinden 0.5 gr tartılarak havanda dövülmüş ve elekten geçirilmiştir. 4.5 ml ringer solüsyonu içeren boncuklu tüplere aktarılmış ve 30 dakika boyunca toprak kolloidlerinde bulunan sporları ringer solüsyonuna geçirebilmek için 10^{-1} 'lik ilk dilüsyon tüpleri elde çalkalama vasıtasıyla mekanik etkiye maruz bırakılmıştır. Çalkalama işlemi sonrasında izolasyon esnasında vejetatif formlara bağlı kontaminasyonun engellenmesi için $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış su banyosunda tüpler 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Su banyosunda belirlenen süre bekletilen tüpler daha sonra steril şartlar altında vorteks karıştırıcı (DAIHAN Scientific Co., Ltd., KOREA) ile karıştırılıp, otomatik pipet (Axygen, USA) ile 1 ml alınarak içerisinde 9 ml ringer solüsyonu olan cam tüpe aktarılarak 10^{-2} dilüsyonu hazırlanmıştır. Bu işlem 10^{-3} ve 10^{-4} dilüsyonlarını hazırlamak için tekrarlanmıştır. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} lük dilüsyonlardan otomatik pipet (Axygen, USA) ile 0.2 ml alınan çözeltiler, sikloheksimid ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), rifampisin ($0.5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidiksik asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli tripton yeast glukoz ekstrakt agar (TYGA), gauze's medium No.2 (SM3) agar, starch casein agar (SCA) ve nutrient agar (NA) yüzeyine inoküle edilmiştir. İnokülasyonlu petriler, O_2 girişine izin verecek şekilde $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ etüvde 7-14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 3.4. Aktinobakteri ve *Streptomyces* Türlerinin Selektif İzolasyonunda Kullanılan Ortamlar

No	Spesifik Besiyeri	Antibiyotikler	Kullanım Amacı
1	Gauze's Medium No.2	Nalidilik acid (10 µg/ml) Novobiocin (10 µg/ml)	Aktinomiset izolasyonunu sağlamak ve diğer mikroorganizma gruplarının inhibisyonunu sağlamak
2	Starch Casein Agar	Nalidilik asit (10 µg/ml)	Aktinomiset izolasyonunu sağlamak ve diğer mikroorganizma gruplarının inhibisyonunu sağlamak
3	Tripton Yeast Extract Agar	Rifamycine(4 µg/ml) Cylohexemide(50 µg/ml) Nalidilik asit (10 µg/ml)	Aktinomiset izolasyonunu sağlamak ve diğer mikroorganizma gruplarının inhibisyonunu sağlamak
4	Nütrient Agar	Cylohexemide(50 µg/ml)	Fungusların inhibisyonunu sağlamak ve diğer mikroorganizma gruplarının izolasyonunu sağlamak

3.2.2. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması

Dilüsyonları yapılan ve farklı seçici kültür ortamlarına aktarılan örnekler 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C etüvde 7-14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen inkübasyon süresi sonunda petri kaplarında yapılan incelemeler sonucunda Aktinobakter sınıfına ait mikroorganizmalar seçilmiştir. Aktinobakteri kolonileri beyaz, sarımtırak, pembe, turuncu veya krem gibi çok farklı renk ve serobriformdan, sert kabuğumsu görünüme kadar çok farklı koloni morfolojilerine sahip olabilmektedirler. Farklı olabileceği düşünülen Aktinobakteri ve benzeri koloniler steril kürdanla alınarak izole edildikleri tripton yeast glukoz ekstrakt agar, SM3 agar, starch casein agar ve nutrient agar yüzeyine inoküle edilmiştir. 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C etüvde 7-14 günlük inkübasyonun ardından seçilen organizmalar saf izolatlar olarak elde edilmiştir.

3.2.3. İzolatların Stoklanması

Elde edilen izolatlar inkübasyon sonunda % 30 gliserol içeren otoklavlanabilir 1.5 ml'lik vidalı kapaklı tüpler içerisine steril öze veya kürdan yardımıyla transfer edilerek -18 °C'de stoklanmıştır.

Tablo 3.5. İzolasyon Sonucu Elde Edilen Tüm İzolatların Listesi

Organizma Adı	Sıcaklık	İzolat Kaynağı	Dilüsyon	Pasaj Ortamı
N4A13	45	NA N _x /R/C	10 ⁻⁴	NA
N1A19	45	NA N _x /R/C	10 ⁻³	NA
N4A29	45	NA N _x /R/C	10 ⁻⁴	NA
T2A04	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻³	TYG
T4A05	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻⁴	TYG
T4A06	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻³	TYG
FG59	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻⁴	TYG
FG71	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻³	TYG
T4A08	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻⁴	TYG
T4A09	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻³	TYG
T6A12	45	TYG N _x /R/C	10 ⁻⁴	TYG
S6A03	45	SM3 N _x /R/C	10 ⁻³	SM3
S1A15	45	SM3 N _x /R/C	10 ⁻⁴	SM3
S1A16	45	SM3 N _x /R/C	10 ⁻³	SM3
S4B18	50	SM3 N _x /R/C	10 ⁻⁴	SM3
S5B20	50	SM3 N _x /R/C	10 ⁻³	SM3
N1C01	55	NA N _x /R/C	10 ⁻⁴	NA
N3C07	55	NA N _x /R/C	10 ⁻³	NA
N3C40	55	NA N _x /R/C	10 ⁻⁴	NA
N2D41	60	NA N _x /R/C	10 ⁻³	NA

3.3. İzolatların Degredasyon ve Enzim Aktivite Testlerinin Uygulanması

Kompostun termofilik aşamasından yoğun ve tekrarlı olarak bulunduğu belirlenen Aktinobakteri izolatları saflaştırılarak elde edilmiştir. Saflaştırma sonucu elde edilen izolatların selüloz, ksilan ve nişasta enzim testleri uygulanmıştır.

3.3.1. Ksilan Degredasyon Testi

Ksilanaz aktivitesinin belirlenebilmesi için katı besiyeri kullanılmıştır. Ksilan (Oat spelt) içeren besiyerine çizgi şeklinde ekilen izolatlar 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C etüvde 7-14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerine % 0.1'lik kongo kırmızısı çözeltisinden eklenerek 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın ortamdan uzaklaştırılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilmiş ve 15 dakika beklenmiştir. Etraflarında sarı hidroliz zonu bulunan izolatlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Gessesse, 1998: 3534; Voget vd., 2006: 28).

3.3.2. Nişasta Degredasyon Testi

Nişasta degredasyonunda ilk aşamada, nişasta (% 0.1 w/v) eklenmiş glukoz yeast ekstrakt agar (GYEA) içeren petrilere ekilen izolatlar 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C etüvde 7-14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Lugol's iodin eriyiği ortam üzerinde ince bir tabaka oluşturacak şekilde petrilere dökülmüştür. Ortamda nişasta varsa iodin nişasta ile birleştiğinde koyu mavi bir kompleks oluşacaktır. Oligosakkarit ve diğer basit şekerlerin ortamda varlıkları büyüme alanı civarındaki açık zon ile belirlenebilmiş ve okuma sırasında bu durum pozitif olarak kaydedilmiştir (Kumar, vd., 2015: 59).

3.3.3. Selülaz Degredasyon Testi

İzolatlar CMC agar (tripton, maya özütü, NaCl, CMC, Agar) besiyerine (pH:10.0 ve % 10 NaCl içeren) çizgi şeklinde ekilerek 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C etüvde 7-14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri kutusuna %0.1'lik kongo kırmızısı çözeltilisinden dökülerek örnekler 15 dakika süreyle boyanmış sonrasında 1M NaCl çözeltisi ilave edilip 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Boyama işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen suşlar selülaz (glukanaz) pozitif olarak değerlendirilmiştir (Saini vd., 2016: 90).

3.4. Seçilen İzolatlara Morfolojik Testlerin Uygulanması

Dilüsyon plaka yöntemi kullanılarak elde edilen Aktinobakteri izolatlarına uygulanan enzim test sonuçlarına göre seçilen izolatların morfolojik olarak benzerlik ve farklılıklarının belirlenmesi amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır. Seçilen izolatların tamamı 10 farklı katı besiyerine steril kürdan ile ekimleri yapılmış ve morfolojik olarak incelenmiştir.

Seçilen izolatların morfolojik incelenmesinde ISP besiyerleri (ISP 2-7 agar) ve Aktinobakterilerin morfolojik tanımlamasında kullanılan diğer besiyerleri (nutrient Agar, modifiye bennett's agar, triptikaz soy agar, czapek's agar) kullanılmıştır. İzolatlar belirtilen ortamlara aktarılmış ve tüm morfolojik özellikleri (substrat, hava miselyum yapıları, diffüzlenebilir pigment, spor morfolojisi, koloni morfolojisi) belirlenmiştir.

3.5. 16S rRNA Analizleri için DNA İzolasyonu, Dizileme Analizlerinin ve Filogenetik Analizlerin Yapılması

3.5.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Kontrolü

Enzim test sonuçları ve morfolojik özelliklere göre seçilen izolatlar 16S rRNA analizi yapılarak Aktinobakteri grubu ile olan benzerlikleri belirlenmiştir. Moleküler karakterizasyonda ilk adım test suşlarının genomik DNA izolasyonudur.

Aktinobakteri olduğu düşünülen izolatlar besiyeri isteklerine göre tripton yeast glukoz ekstrakt agar, gauze's medium No. 2 agar, starch casein agar ve nutrient agar kültür ortamında 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C 7-14 gün süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, her bir izolattan bir öze dolusu kültür alınarak yine besiyeri isteklerine göre 30 ml tripton yeast glukoz ekstrakt broth, SM3 broth, starch casein broth ve nutrient broth içeren erlenlere transfer edilmiştir. Kültürler çalkalamalı inkübatörde, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de, 160 rpm'de 7-14 gün süre ile inkübe edilmiş ve saflıkları kontrol edildikten sonra steril ependorflara kültürlerden 1,5 ml ilave edilerek, 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası DDH₂O ve TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) tamponu ile yıkanarak (Sambrook ve Russell, 2001) DNA ekstraksiyonuna hazır hale getirilmiştir. DNA izolasyonu için uygulanan işlem basamakları aşağıda yer almaktadır:

İşlem Basamakları

Lizatin Hazırlanışı;

1. İzolatlardan elde edilen her bir hücre peleti üzerine 180 µl lizozim (20 mg/ml) tamponu eklenip 30 sn vortekslendikten sonra 37 °C 'de 12 saat bekletildi.
2. 12 saat bekletildikten sonra hücre peletine 2 µl triton-x ilave edilip pipetaj yapıldı ve 37 °C su banyosunda 30 dk bekletildi.
4. 20 µl RNaz ve 20 µl Proteinaz K eklenip 30 sn vortekslemeden sonra 37 °C su banyosunda 30- 45 dk bekletildi.
5. 200 µl PureLink Genomik Parçalama/Bağlama tamponu eklenerek 30 sn vortekslendi ve 55 °C su banyosunda 30 dk bekletildi.
6. Lizata 200 µl % 96-100'lük etanol eklenip homojen bir çözelti elde etmek amacıyla 5 sn vortekslenerek iyice karıştırıldı.

Uygulama;

1. Yaklaşık 640 µl olan lizat PureLink spin kolona aktarıldı ve kolon oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

2. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı. Kolona hazırlanan yıkama tamponunu 1'den 500 µl eklendi ve kolon oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

3. Toplama tüpü atıldı ve kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona hazırlanan yıkama tamponu 2'den 500 µl eklendi ve kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.

4. Spin kolon 1,5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolona 25-200 µl PureLink Genomik Ayırma Tamponu eklendi.

5. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 1,5 dk santrifüjlendi ve böylece istenilen izolat DNA'sı saf bir şekilde elde edildi. Saflaştırılan DNA -20 °C muhafaza edildi.

3.5.2. DNA İzolasyon Kontrolü

DNA izolasyon işleminin ardından, örneklerin agaroz jel elektroforez tekniği ile kontrolü sağlanmıştır. İzole edilen DNA örneklerini agaroz jelde görünür hale getirebilmek için jele floresan özellik gösteren etidyum bromür (EtBr) boyası ilave edilmiştir. Elektroforez tablası kullanımdan önce saf su ile temizlenmiş ve kurutularak düz bir zemine bırakılmıştır. % 1'lik agaroz jel hazırlamak için 1 gr agaroz tartılmış ve üzerine 1X TBE tamponu eklenmiştir. Hazırlanan çözelti mikrodalgada ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra çözelti elle tutulur sıcaklığa ulaştığında üzerine 3-5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Ardından çözelti kabarcık kalmayacak şekilde tablaya dökülmüş ve 30-45 dk beklenmiştir. Jel donduktan sonra elektroforez tablası içerisinde 1X TBE tamponu olan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA örneğinden 3 µl ve jel yükleme tamponundan (brom fenol mavisi) 1 µl dikkatli bir şekilde karıştırılarak transfer edilmiştir. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanmış ve 120 voltta 30-45 dk yürütülmüştür.

3.5.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR İşlemi

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ve saflaştırılması kapsamında, saf DNA örnekleri kullanılarak 16S rRNA geninin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu iki evrensel primer (27f ve 1525r; Lane, 1991: 140) kullanılarak Termal Cyclerda (PCR, Techne ve Thermo) gerçekleştirilmiştir.

Denatürasyon, amplifikasyon bitiş ve soğuma basamaklarından oluşan 35 döngü sonucu çok miktarda 16S rRNA gen bölgesi elde edilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltımında kullanılan her bir örnek için 50 µl ölçüdeki reaksiyon karışımı aşağıdaki Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltımı İçin PCR Reaksiyon Şartları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	55	2	35
Uzama	72	3	35
Son Uzama	72	8	1
Reaksiyon sonrası saklama	4		

Tablo 3.7. 16S rRNA Gen Bölgesi Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları

Reaktif	Stok yoğunluğu	Miktar (µl)
Hot Start Master Mix	2x	25
27f primeri	10 pmol	1
1525r primeri	10 pmol	1
Kalıp DNA	50-100 ng	2
Nükleaz içermeyen su		X
Toplam Hacim		50 µl

16S rRNA kodlayan gen bölgeleri çoğaltılan örneklerin saflaştırılması ve en az 4 farklı oligonükleotid primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilemesi, MacroGen firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Oligonükleotid primerlerinin detayları Çizelge 3.8’de verilmiştir. 16S rRNA dizi verileri MEGA 7.0 programında hizalanmış ve EzTaxon Serverda (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>; Kim vd., 2012: 718) bulunan global hizalama algoritmaları kullanılarak en yakın akraba organizmalarla olan 16S rRNA nükleotit benzerliği belirlenmiştir. Filogenetik analizler için MEGA7 ve BioEdit analiz programları (Kumar vd., 2016: 1870) kullanılmıştır. Filogenetik dendogramların çizilmesinde Neighbour Joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) algoritması ve Jukes-Cantor evrimsel uzaklık matrisi kullanılmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçlar bize kompostlaşmada etkin olan Aktinobakterilerin belirlenmesinde rehber olmuştur. Ayrıca elde edilen bu filogenetik ağaçların incelenmesi ve EzTaxon Server programındaki benzerlik oranlarının da dikkate alınması ile olası yeni türlerin belirlenmesi sağlanmıştır.

Tablo 3.8. 16S rRNA Gen Bölgesinin Dizilemesi İçin Kullanılan Dizileme Primerleri

Primer Adı	Sekans (5' ve 3')	Büyüklik	Bandlanma Alanı		Kullanım		Kaynak
			5'	3'	PCR	Sekans	
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	8	27	√	√	(Lane, 1991: 140).
Mg520f	CAGCAGCCGCGTAATAC	18	520	536		√	(Kageyama vd. 2004: 3890).
Mg5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		√	(Chun ve Goodfellow, 1995: 247).
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	1544	1525	√	√	(Lane, 1991: 140).
800r	TACCAGGGTATCTAATCC	18	800	782		√	(Chun ve Goodfellow, 1995: 247).

*Lane (1991)’e göre: M, A:C; R, A:G; W, A:T Sayılar *Escherichia coli* rrnB şununun (GenBank JO1695, Brosius ve ark., 1978) 16S rRNA’nın gen dizisine karşılık gelir.

3.6. Kompostlaşma İçin Seçilen Aktinobakterileri İzolatlarının Çoğaltılması, Liyofilize Edilmesi

Kompost uygulamasında başarılı olma ihtimalleri yüksek olan *Streptomyces* izolatları seçilmiştir. İzolatların seçiminde enzim test sonuçları, morfolojik karakterleri ve 16S rRNA dizileme analiz sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. Seçilen izolatlar en iyi üreme gösterdikleri tripton yeast glukoz ekstrakt broth, SM3 broth, starch casein broth ve nutrient broth içeren erlenlere transfer edilmiştir.

İzolatlar çalkalamalı inkübatörde, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C 160 rpm’de 7-14 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda izolatlar 50 ml’lik ependorflara aktararak 10 dk. 10.000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen peletler -20’de bir gece bekletilmiştir. Bekletilen peletler liyofilizatöre bırakılarak -40 °C ve vakumlu basınç altında 24 saat kurutulmaya bırakılmıştır. Liyofilize edildikten sonra kuru mikroorganizmanın 1 gramı ilk etapta 5 ml besiyerine ilave edilerek sonrasında ringer çözeltisi eklenip 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Yeni oluşturulan kompost karışımına elde edilen mikroorganizma karışımı/ karışımları eklenmiştir.

3.7. Termofilik Aktinobakterilerin Seçimine Farklı Parametrelerin Etkisi

Kompost karışımlarında kullanılmaya aday Termofilik Aktinobakterilerin belirlenmesinde iki farklı projeden elde edilen bulgular kullanılmıştır. Yüksek lisans çalışmasına kaynaklık eden ilk proje TÜBİTAK 118O231 kodlu “Termofilik Aktinomisetlerin Kompost Hızlandırıcı Olarak Etkilerinin İncelenmesi” konulu projedir. Söz konusu projede enzim temelli bir seçim kriteri uygulanmıştır. TÜBİTAK projesinden elde edilen 3 adet mikroorganizma Yüksek lisans tez çalışması kapsamında kompost denemelerinde kullanılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasına kaynaklık eden ikinci proje 2019-02.BŞEÜ.01-01 kodlu “Kompost Karışımlarında Hızlandırıcı Olarak Kullanılacak Termofilik Aktinomisetlerin Seçimine Farklı Parametrelerin Etkisi” konulu Yüksek Lisans Tez Projesidir. Bu proje kapsamında TÜBİTAK projesi kapsamında izole edilen ve enzim testleri tamamlanan 21 adet izolat kullanılmıştır. Bu proje kapsamında izolatlardan 15’inin 16S rRNA analizleride tamamlanmıştır. Seçilen 21 izolata sıcaklık, pH, karbon kaynakları, antogonistik etki ve üre hidroliz testleri uygulanmış, mikroorganizmaların birbirileri ile etkileşimleri antagonistik etki testi ile belirlenmiştir. Proje kapsamında kompost karışımlarında kullanılabilecek izolatların seçiminde Tübitak projesinde kullanılan seçim kriterlerine ek olarak farklı parametreler eklenmiştir. Detaylar bulgular kısmında yer almaktadır. Proje kapsamında yapılan çalışmalar değerlendirilerek seçilen mikroorganizmalar ile farklı kompost denemelerinin yüksek lisans tez çalışmasından sonra gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

3.7.1. Sıcaklık Tolerans Testi

Seçilen izolatlar tryptone yeast glucose extract broth (TYG), nutrient broth ve SM3 (glikoz-pepton besiyeri) brotlara ekim yapılarak izolatlar optimum büyüme gösterdikleri 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de 3 gün 160 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar inkübasyon sonrasında tryptone yeast extract agar, nutrient agar ve SM3 agar'a 6 µl nokta inokülasyon ile damlatılmıştır. Damlatma yapılan petriyerler 4 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C sıcaklıklarda etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı yapılmıştır (Xu vd., 2005:1150).

3.7.2. pH Tolerans Testi

Seçilen izolatlar tryptone yeast glucose extract broth (TYG) , nutrient broth ve SM3 (glikoz-pepton besiyeri) brotlara ekim yapılarak izolatlar optimum büyüme gösterdikleri 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de 3 gün 160 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. pH toleransı testi için ISP 9 besiyeri kullanılmıştır. pH aralığı 4-9 olarak ayarlanmış ve pH'ların ayarlanması için 5M H₃PO₄ ve 1N NaOH kullanılmıştır. İzolatlar inkübasyon sonrasında pH 4-9'a ayarlanmış ISP 9 agarına 6 µl nokta inokülasyon ile damlatılmıştır. Damlatma yapılan petriyerler 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de sıcaklıklarda etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı yapılmıştır (Xu vd., 2005: 1150).

3.7.3. Karbon Kaynaklarının Kullanımı

Seçilen izolatlar tryptone yeast glucose extract broth (TYG) , nutrient broth ve SM3 (glikoz-pepton besiyeri) brotlara ekim yapılarak izolatlar optimum büyüme gösterdikleri 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de 3 gün 160 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Farklı karbon kaynakları olarak seçilen D-glikoz, sükroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz varlığında izolatların üremeleri incelenmiştir. C kaynakları tindilisasyon yöntemi ile steril edilmiştir. İlk olarak izolatların üremesinde kullanılan bazal ortama (ISP 9) NaCl (0.5 g / lt⁻¹) ve FeSO₄. 7H₂O (0.01 g / lt⁻¹) ilave edilmiştir. Temel besiyeri olarak kullanılacak ISP 9 besiyerine %1 (w/v) oranda karbon kaynağı aseptik olarak eklenmiştir. Negatif kontrol olarak sadece bazal ortam (ISP 9), pozitif kontrol olarak da karbon kaynağı olarak %1 (w/v) D-glikoz içeren besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar hazırlanan sükroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz içeren ISP 9 besiyerlerine 6 µl nokta inokülasyon ile damlatılmıştır ve 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de sıcaklıklarda etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynaklarının izolatlarının gelişimine etkisi 21 günlük periyotta gözlenmiştir (Sharma vd., 2016: 7).

3.7.4. Üre Hidroliz Testi

Üre testi için izolatlar Luria-Bertani (LB) brotha inokülasyonu yapılmıştır. İzolatların optimum büyüme gösterdiği sıcaklıkta (45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de) 3 gün 160 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar inkübasyon sonrası ürea agara nokta inokülasyonu yapılmıştır. İzolatlar İzolatların optimum büyüme gösterdiği sıcaklıkta (45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de) 3 gün bekletilmiştir. İzolatların üreyi hidroliz edip etmedikleri inkübasyon sonunda renk değişimi ve zon verme olarak belirlenmiştir (MacFaddin, 2000: 145).

3.7.5. Antagonistik Etki

Antagonistik etki ile suşların birbirleri ile uyumluluğu belirlenmiştir. Test "Cross-streak" olarak adlandırılan bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Antagonistik etkiyi belirleyebilmek için Bennet's agar kullanılmıştır. İlk olarak tek izolat Bennet's agar'a steril kürdan ile çizgi şeklinde dikey olarak petri kabına inoküle edilmiştir. İzolatın optimum büyüme gösterdiği sıcaklıkta (45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de) 3-4 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İzolat üreme gösterdikten sonra dikey çizginin sağına ve soluna steril kürdan yardımı ile farklı izolatlar yatay şekilde inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası izolatın optimum büyüme gösterdiği sıcaklıkta (45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de) 3-4 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon süresi sonrasında çizgi ekimle (yatay) inoküle edilen izolatlarda üreme durumu değerlendirilmiştir. Dikey olarak inoküle edilen mikroorganizma, yatay inoküle edilen mikroorganizmayı inhibe edebildiği gibi herhangi bir etkide göstermeyebilir. Değerlendirme inhibisyon oranlarına göre yapılmıştır (Dede, 2020: 2).

3.8. Kompost Denemeleri

Tez çalışması kapsamında kompost karışımlarında kullanılmak üzere üç adet mikroorganizma seçilmiştir. Mikroorganizmaların seçim süreci Bulgular kısmında detaylı olarak verilmiştir. Mikroorganizmaların seçiminde önceden belirtildiği üzere enzim aktivitelerinin karşılaştırılmasına yönelik bir yöntem uygulanmıştır. N3C07, T4A05 ve N4A13 kodlarıyla bulgular kısmında sonuçları verilen mikroorganizmalar kompost denemelerinde rahat izlenebilmeleri amacıyla sırasıyla A, B ve C harf kodlarıyla belirtilmiştir.

Kompost karışımı büyükbaş hayvan gübresi, saman ve çimenden oluşmaktadır. Çimen, mikroorganizmalara azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Kompostta kullanılan çimen miktarı 1 kg olarak belirlenmiştir. Kuru temel üzerinden toplam kompost ağırlığı 300 kg'dır.

Karışımında yer alan gübre ve saman sırasıyla 284 ve 15 kg olarak sistemlere karıştırılmıştır. Kompost karışımlarında ağırlık oranı karışımın karbon/azot (C/N) oranı C/N: 30 olacak şekilde belirlenmiştir.

Kompost karışımlarına eklenen mikroorganizma miktarı toplamda 1 g'dır. Mikroorganizmalar eklenmeden önce liyofilize edilmiş, ekleme öncesi aktifleştirilip seyreltilerek kompost karışımlarına eklenmiştir. Buna göre ilk önce liyofilize örnekler 30 ml besiyerinde (Nutrient broth) 30 dakika aktifleştirilmiş, sonrasında 1L ringer çözeltisi ile sistemlere verilmiştir. Liyofilizasyonda temel amaç, eklenen mikroorganizma miktarında standartlaşmanın sağlanmasıdır. İşlem TÜBİTAK projesi kapsamında ticari takdim yöntemi ve miktar stabilizasyonu için önerilmiş ve proje kapsamında uygulanmıştır.

Kompost sistemlerine eklenen mikroorganizmaların performansları tek tek, ikili karışımlar ve üçlü tek bir karışım olmak üzere 8 sistem hazırlanarak incelenmiştir. Sistemler sırasıyla K (Kontrol), A, B, C, AB, AC, BC ve ABC kodlarıyla belirtilmiştir. Mikroorganizma ağırlıkları tek kullanımda 1 g, ikili karışımlarda her bir mikroorganizmadan 0.5 g ve üçlü tek karışımda mikroorganizmaların her biri 0.33 g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kompost denemelerinde yapılan çalışmalar sistem gidişatının ve kompost olgunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümleri içermektedir. Buna göre sistemlerin izlenmesinde periyodik olarak gerçekleştirilen sıcaklık, nem ve pH ölçümlerinden yararlanılırken kompost olgunluğunun belirlenmesinde çimlenme indeksi (GI) ve organik madde ölçümleri kullanılmıştır. Çimlenme indeksleri % 80'den büyük ise kompostun olgunlaştığı kabul edilmektedir. Organik madde kaybı bir önceki ölçüme kıyasla % 5 ve altında ise kompostlaşmanın durduğu kabul edilmiştir. Organik madde ölçümleri kompostta eklenen mikroorganizma ve karışımlarının performans karşılaştırması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin değerlendirilmesi sonucu seçilen iki sistem ile Dewar ısı testi de tez çalışması kapsamında yürütülmüştür. Tez çalışması kapsamında kompost sistemleri ile yapılan denemelerin daha rahat takip edilebilmesi amacıyla Tablo 3.9.'da detaylar verilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında sıcaklık ölçümleri 24 saat aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler yer seviyesinin 60 cm üzerinden ve merkeze yakın üç farklı noktadan yapılmıştır. Nem ve pH ölçümleri 3 gün aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Kompost karışımları 3 gün aralıklarla havalandırılmıştır. Aktarma olarak da adlandırılan işlem kompost yığınının alt üst edilmesini içermekte ve mikroorganizmanın oksijenlenmesinin sağlanması amacıyla yapılmaktadır.

Sıcaklık ölçümleri aktarma öncesi yapılırken pH ve nem tayinleri aktarma sonrası alınan numuneler ile gerçekleştirilmiştir. Kompost karışımlarından numune alımları ilk olarak kompostun alt kısmından sonrasında sırasıyla orta ve üst kısımlarından her bölge için 10-15 alt numune olmak üzere eşit miktarda ve toplamda 2L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Aktarma, ölçüm ve numune alım prosedürleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) regülasyonlarına (40 CFR Part 503) uygun olarak yürütülmüştür.

pH ölçümlerinde 1/10 Potansiyometrik yöntem kullanılmıştır. Yöntem 1g olarak alınan numunenin saf su ile 10 ml'ye seyreltilmesini ve sıvıdan pH tayinini içermektedir. Organik madde içerikleri 55 °C'de kuru yakma ile belirlenmiştir. Nem içeriklerinin belirlenmesinde organik madde tayini sırasında belirlenen kuru ve yaş madde ağırlıklarından yararlanılmıştır.

Kompost olgunluğunun belirlenmesinde Çimlenme indeksi (GI %) verileri bitki temelli bir yaklaşım olarak uygulanmaktadır (Jagadabhi vd., 2019: 280; Pampuro vd., 2017: 5). Yöntemde ilk aşamada alınan numune, 20 g olarak tartılmış ve 200 ml saf su ile 5 saat süresince 300 rpm'de karıştırılmıştır. 10000 rpm'de santrifüjlenerek elde edilen kompost sıvısı salatalık (*Cucumis sativus*) ve "Ahmet" cinsi buğday (*Triticum*) tohumlarında kullanılmıştır. "Ahmet" koruma altında olan bir cinstir ve günümüzde yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu nedenle GI % sonuçları büyük önem taşımaktadır. Kompost sıvısı "Whatman No 1" filtre kâğıdının yerleştirildiği 10 cm çapa sahip petrilere 5ml olarak uygulanmıştır. Toplamda petri başına 10 tohum ve 3 tekrar olmak üzere uygulama gerçekleştirilmiştir. Biyolojik tekrarlılık aynı koşullarda yapılan ikinci bir deneme ile sağlanmıştır. GI değerleri 5ml saf su eklenen tohumlarla karşılaştırma yapılarak aşağıdaki formül uyarınca hesaplanmıştır (Pampuro vd., 2017: 5; Jagadabhi vd. 2019: 280; Tong vd., 2019: 2).

$$GI(\%) = ((SG(\%) * RL(\%))/100$$

Burada:

GI (%): çimlenme indeksini

SG(%): kontrole göre tohum çimlenme yüzdesini

RL(%): kontrole göre kök uzunluğunu

İfade etmektedir. Örnek verilecek olursa kontrol petrisinde 30 üzerinden 29 tohum çimlenmiş, buna karşılık kompost sıvısı eklenen petrilere toplamda 28 tohum çimlenmiş ise SG % değeri 96'ya karşılık gelmektedir.

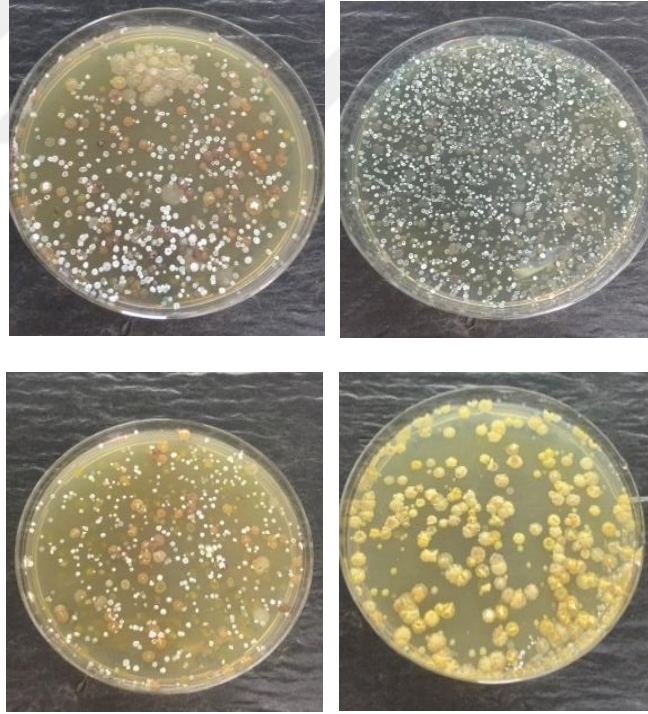
Tablo 3.9. Kompost Sistemlerinde Gerçekleştirilen Ölçüm ve Analizler

Gün	pH	Sıcaklık	Nem	Organik madde (%)	Çimlenme indeksi (%)
0	+	+	+	+	
1		+			
2		+			
3	+	+	+	+	
4		+			
5		+			
6	+	+	+	+	
7		+			
8		+			
9	+	+	+	+	
10		+			
11		+			
12	+	+	+	+	
13		+			
14		+			
15	+	+	+	+	+

4.BULGULAR

4.1. Kompost Karışımlarından Aktinobakteri ve *Streptomyces* sp. İzolasyonu

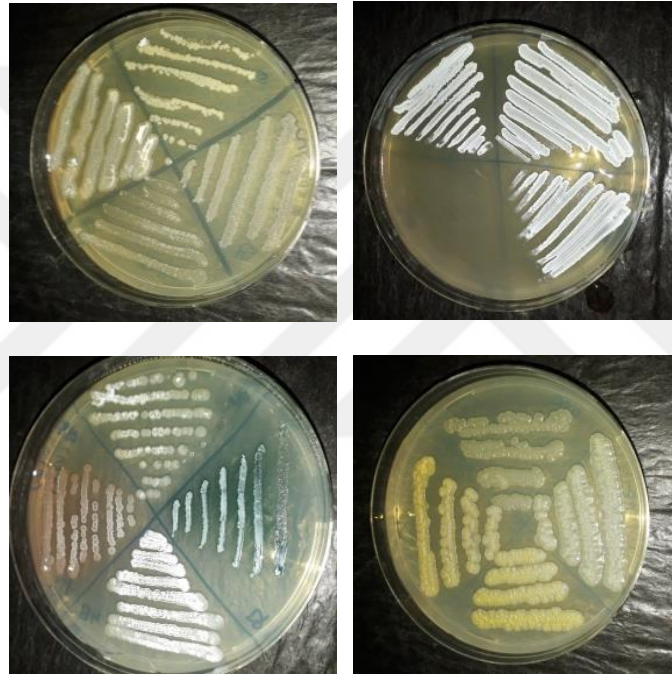
İzolasyon çalışmaları sırasında iki kompost karışımı hazırlanmıştır. İlk karışım gübre, saman ve topraktan oluşurken ikinci karışımda toprağın yerine mikroorganizma kaynağı olarak aktif çamur kullanılmıştır. 4 ayrı besiyeri ve farklı seçici antibiyotikler ile yapılan selektif izolasyon çalışmalarında dilüsyon plaka yöntemi kullanılmıştır. 10^{-3} ve 10^{-4} dilüsyonlarından otomatik pipet ile alınan çözeltiler ($0,2 \text{ ml}$), cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), rifampicin ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli tripton yeast glukoz ekstrakt agar, cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), rifampicin ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit ilaveli SM3 agar ve cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), rifampicin ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit ilaveli nutrient agar yüzeyine inoküle edilmiştir. İnokülasyona bırakılan petripler $45 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen izolasyon petriplerinden bazı örnekler Şekil 4.1.'de, detaylı görseller Ek-3'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Aktinobakteri ve *Streptomyces* İzolasyon Plaklarından Bazı Örnekler

4.2. İzolatların Seçimi

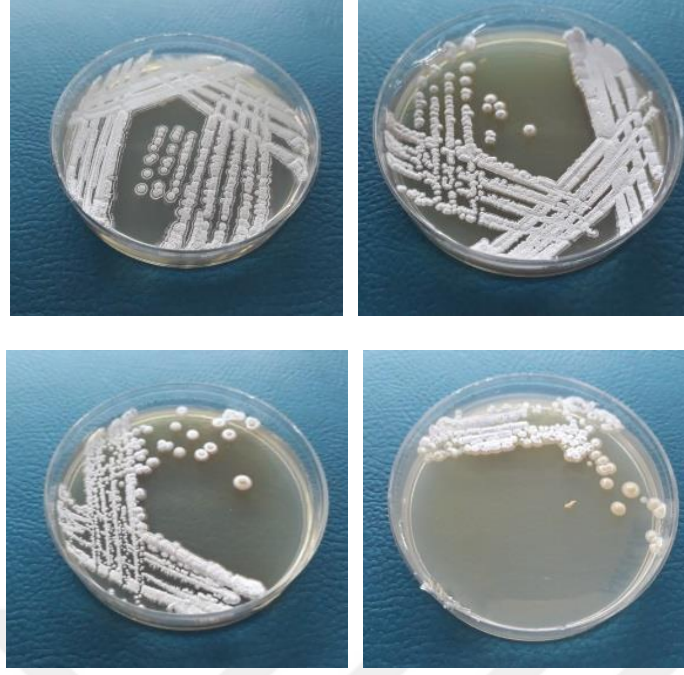
Dilüsyon plaka yöntemiyle farklı seçici besiyerlerine (TYG, NA, SCA ve SM3) ekimleri yapılan izolatlar 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C’de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır ve izolasyon petrilerinde Aktinobakteri ve *Streptomyces* benzeri koloniler belirlenmiştir. Koloni morfolojilerine göre seçilen *Streptomyces* ve benzeri koloniler steril kürdan kullanılarak tryptone yeast glucose extract agar, nutrient agar ve SM3 agar yüzeyine dörtlü ekimler şeklinde transfer edilmiştir. Elde edilen izolatların dörtlü ekim petrilerinden bazı örnekler Şekil 4.2.’de, detaylı görseller Ek-4’te verilmiştir.



Şekil 4.2. İzolasyon Plaklarından Seçilen *Streptomyces* sp. Benzeri İzolatların Dörtlü Ekimleri

4.3. İzolatların Tek Koloni Ekimi

Seçilen izolatların saflıklarının kontrolü ve koloni morfolojilerinin daha iyi görülebilmesi amacıyla ekimleri tripton yeast glukoz ekstrakt agar, nutrient agar ve SM3 ortamına tek koloni seyreltme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tek koloni yöntemi kullanılarak inokülasyonu yapılan izolatların petri görüntüleri Şekil 4.3.’te verilmiştir, detaylı görseller Ek-5’te verilmiştir.



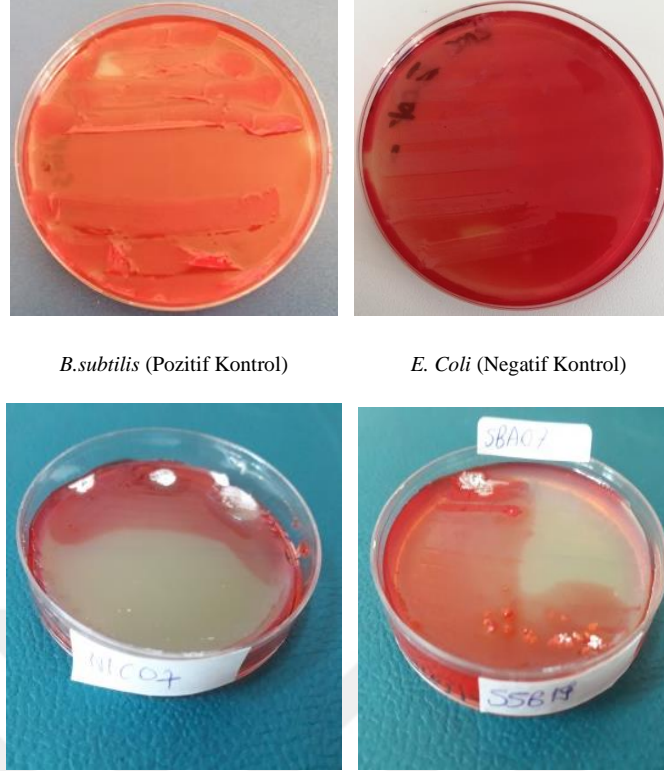
Şekil 4.3. Seçilen İzolatların Tek Koloni Örnekleri

4.4. İzolatlara Degredasyon ve Enzim Aktivite Testlerinin Uygulanması

Dilüsyon plaka yöntemi ile yapılan izolasyon sonucu *Streptomyces* benzeri çok sayıda izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlara selüloz, nişasta ve ksilan enzim testleri uygulanmıştır.

4.5. Selüloz Enzim Degredasyonu

Seçilen izolatlardan, selüloz aktivitesini belirlemek amacıyla CMC agar besiyerine çizgi ekimleri yapılmış ve 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sırasıyla petri kutusuna % 0.1’lik kongo kırmızısı ve 1M NaCl çözeltisi ilave edilerek işlem sonunda izolatın etrafında oluşan sarı hidroliz zonu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sarı hidroliz zonu gözlenmeyen suşlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Selüloz enzim degredasyon testi yapılan izolatlardan petri görüntüleri Şekil 4.4’te verilmiştir, detaylı görseller Ek-6’da verilmiştir. Selüloz aktivitesi 21 izolata uygulanmıştır. 20 izolat selüloz aktivitesine pozitif sonuç verirken, 1 izolat (N4A13) negatif sonuç vermiştir.



Şekil 4.4. Seçilen izolatların selülaz enzim test sonuçlarının örnek petri görüntüleri

4.6. Nişasta Enzim Degredasyonu

Seçilen izolatların nişastayı (% 0.1 w/v) parçalayabilme yetenekleri nişasta (% 0.1 w/v) eklenmiş GYEA (glukoz yeast ekstrakt agar) kullanılarak test edilmiştir. Ekimleri yapılan ve 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C’de beş gün inkübasyona bırakılan test izolatlara Lugol’s iodin eriyiği uygulanmıştır. Koloni çevresindeki açık zon pozitif olarak kaydedilmiştir. Nişasta enzim degradasyon testi yapılan izolatların petri görüntüleri Şekil 4.5.’te verilmiştir, detaylı görseller Ek-6’da verilmiştir. Nişasta aktivitesi 21 izolata uygulanmıştır. 15 izolat nişasta aktivitesine pozitif sonuç verirken, 6 izolat negatif sonuç vermiştir.



E. Coli (Negatif Kontrol)



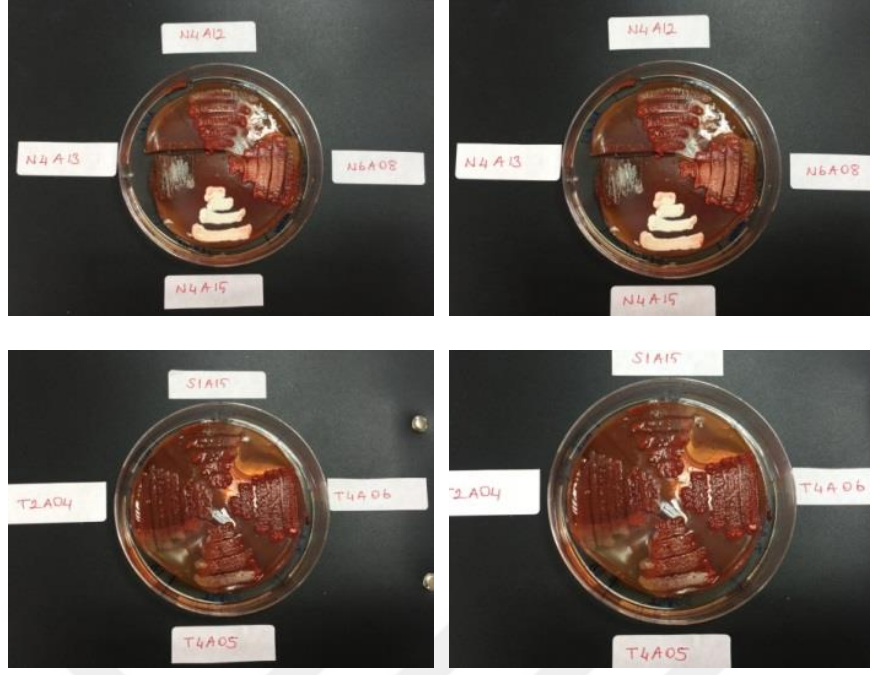
Lactobacillus paracasei (Pozitif Kontrol)



Şekil 4.5. Seçilen İzolatların Nişasta Enzim Test Sonuçlarının Örnek Petri Görüntüleri

4.7. Ksilan Enzim Degredasyonu

Ksilinaz aktivitesinin belirlenebilmesi için ksilan (Oat spelt) içeren besiyeri kullanılmış ve çizgi ekimleri yapılan izolatlar 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri kutusuna sırasıyla % 0.1’lik kongo kırmızısı çözeltisi ve daha sonra 1M NaCl çözeltisi ilave edilerek 15’er dakika inkübasyona bırakılmıştır. Boyama işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen suşlar ksilan (glukanaz) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sarı hidroliz zonu gözlenmeyen suşlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Ksilan enzim degridasyon testi yapılan izolatların petri görüntüleri Şekil 4.6.’da verilmiştir. Detaylı görseller Ek-6’da verilmiştir. Ksilan aktivitesi 21 izolata uygulanmıştır. 2 izolat (N4A13 ve T4A05) ksilan aktivitesine pozitif sonuç verirken, 19 izolat negatif sonuç vermiştir.



Şekil 4.6. Seçilen İzolatların Ksilan Enzim Test Sonuçlarının Örnek Petri Görüntüleri

İzolatlara uygulanan nişasta, ksilan ve selüloz enzim test sonuçları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

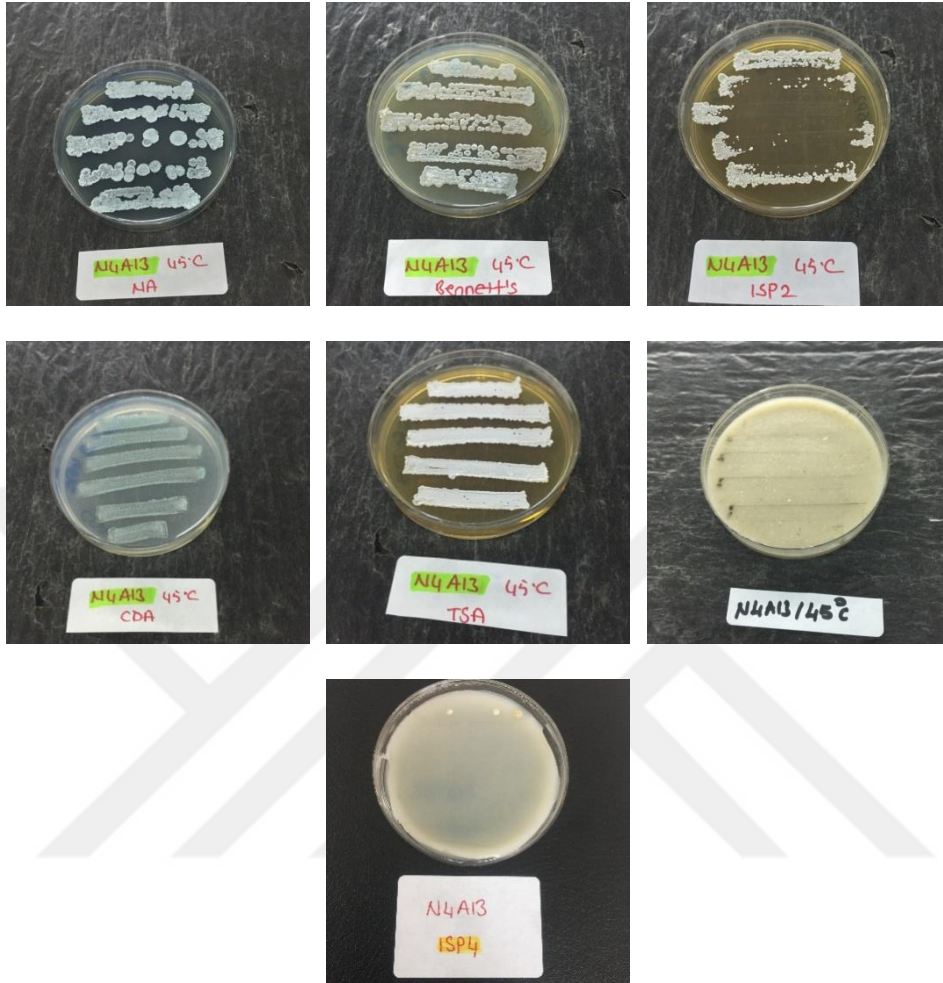
Tablo 4.1. Aktinomiset ve *Streptomyces* İzolatlarına Uygulanan Enzim Testleri ve Sonuçları

İzolat kodu	İzolatın Gelişim Sıcaklığı	Nişasta testi	Selüloz testi	Ksilan testi
N4A13	45	+	-	+
N1A19	45	+	+	-
N4A29	45	-	+	-
T2A04	45	+	+	-
T4A05	45	+	+	+
T4A06	45	+	+	-
FG59	45	+	+	-
FG71	45	-	+	-
T4A08	45	+	+	-
T4A09	45	+	+	-
T6A12	45	-	+	-
S6A03	45	+	+	-
S1A15	45	-	+	-
S1A16	45	+	+	-
S4B18	50	+	+	-
S5B20	50	-	+	-
N1C01	55	-	+	-
N3C07	55	+	+	-
N3C40	55	+	+	-
N2D41	60	+	+	-

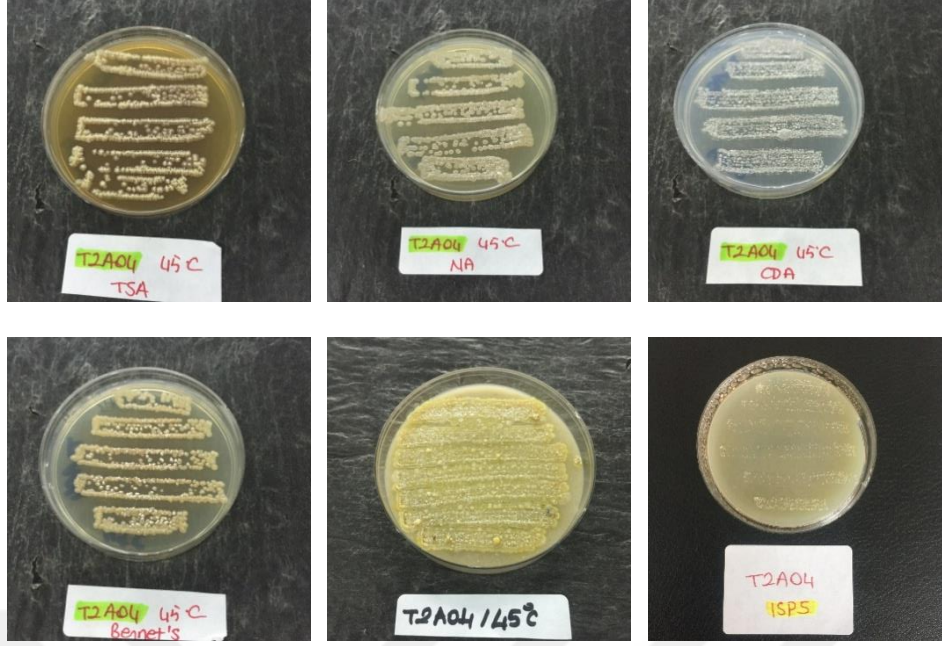
4.8. Seçilen İzolatlara Morfolojik Testlerin Uygulanması

Enzim test sonuçlarına göre seçilen 21 izolatın morfolojik incelemesi ISP besiyerleri (ISP 2-7 agar) ve Aktinomisetlerin morfolojik tanımlamasında kullanılan diğer besiyerlerinde (Nutrient Agar, modifiye Bennett's agar, triptikas soy agar, Czapek's agar) yapılmıştır. İzolatların tüm morfolojik özellikleri (substrat, hava miselyum yapıları, diffüzlenebilir pigment, spor morfolojisi, koloni morfolojisi) belirlenmiştir. Bu prosedür ile enzim testleri sonucunda pozitif olan izolatların, morfolojik özellikleri açısından da farklı olup olmadıkları belirlenmiştir.

Morfolojik katologlama kullanılarak izotlar incelenmiştir. Morfolojik test sonuçlarına örnek petriler Şekil 4.7. ve 4.8.'de verilmiştir. Diğer morfolojik test sonuçları Ek 7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. N4A13 İzolatının Morfolojik Tanımlanmasında Kullanılan ISP2, ISP4, NA, CDA, TSA, Bennett's ve Oat meal Agar Görüntüleri. N4A13 izolatı ISP 5, ISP 6 ve ISP 7'de üreme göstermemiştir.



Şekil 4.8. T2A04 İzolatının Morfolojik Tanımlanmasında Kullanılan ISP5, TSA, NA, CDA, Bennett's ve Oat meal Agar Görüntüleri. T2A04 İzolatı ISP2, ISP4, ISP6 ve ISP 7'de üreme göstermemiştir.

Test izolatlarının morfolojik özellikleri; substrat, hava miselyum yapıları, difüzebilir pigment ve spor morfolojisi; Tablo 4.2.'de verilmiştir. Morfolojik olarak farklı olduğu belirlenen 15 izolat seçilerek 16S rRNA analizlerine geçilmiştir. Substrat, hava miselyum yapıları, difüzebilir pigment, spor morfolojisi, koloni morfolojisi açısından incelenen izolatlardan benzerlik gösterenlerden biri seçilmiştir.

Tablo 4.2. Aktinomiset İzolatlarının 10 Farklı Besiyerinde Gelişim Ve Pigment Özellikleri

Organizma Adı	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7	Bennett's Agar	TSA	Czapek's Agar	Nutrient Agar
N4A13	G :+++ R :Beyaz A :- S :+	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Beyaz A :- S :+	G :+++ R :Beyaz A :- S :+	G :+++ R :Beyaz A :- S :+	G :+++ R :Beyaz A :- S :+
N1A19	G :+++ R :Yeşil A :Gri S :+	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+
N4A29	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :-
T2A04	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :--- R :- A :- S :-	G :--- R :- A :- S :-	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+	G :+++ R :Sarı A :+ S :+

“Tablo 4.2. devamı”

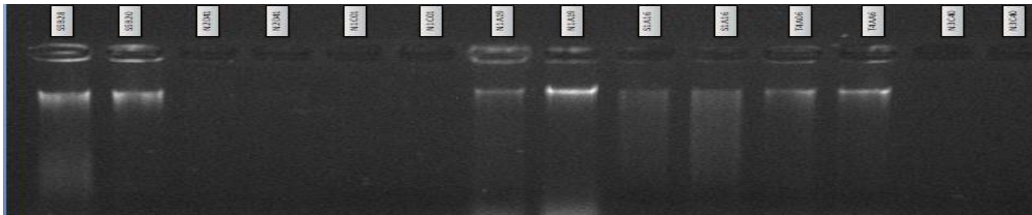
N3C07	G :+++ R :Beyaz A : + S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : -
N3C40	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +
N2D41	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :--- R : - A : - S : -	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +	G :+++ R :Beyaz A : + S : +

4.9. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların Görüntülenmesi

Seçilen izolatlar, besiyeri isteklerine göre ekimleri yapılmış ve sonrasında sıvı besiyerinde geliştirilerek saflıkları kontrol edilmiştir. Saf oldukları belirlenen izolatların kültürlerinin pelletleri alınarak DNA ekstraksiyonuna hazır hale getirilmiştir. Bu organizmalardan genomik DNA (DNA izolasyon Kiti-invitrogen,USA) izole edilmiş ve DNA kontrolü % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. DNA izolasyonu yapılan izolatların agaroz jel görüntüleri Şekil 4.9. ve 4.10.'da verilmiştir.



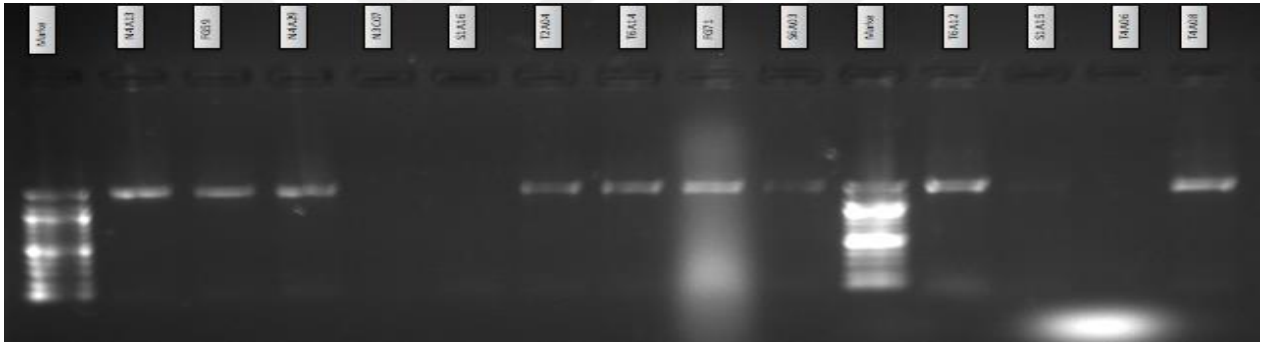
Şekil 4.9. DNA İzolasyonu Yapılan İzolatların Elüsyonlarının %1'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü



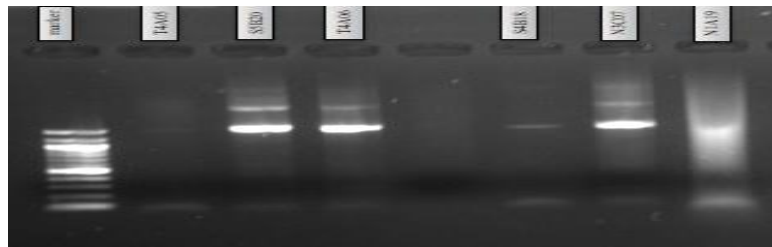
Şekil 4.10. DNA İzolasyonu Yapılan İzolatların Elüsyonlarının %1'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü

4.10. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunda, saf DNA örnekleri kullanılarak 16S rRNA geninin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için iki evrensel primer (27f ve 1525r; Lane, 1991: 145) kullanılmış ve Termal Cycler (PCR, Techne ve Thermo) ile gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon, amplifikasyon bitiş ve soğuma basamaklarından oluşan 35 döngü sonucu çok miktarda 16S rRNA gen bölgesi elde edilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen ürünler % 1'lik agaroz jelde (100 ml 1XTBE tampon, 1.0 g agaroz) DNA leader ile birlikte 90 voltta 45 dakika yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (SYNGENE G-BOX) fotoğflanarak kaydedilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenerek kaliteleri ve doğru bölgenin amplifikasyonun yapıp yapılmadığı marker kullanılarak kontrol edilmiştir. PCR işlemi gerçekleştirilen izolatların agaroz jel görüntüleri Şekil 4.11 ve 4.12.' de verilmiştir.



Şekil 4.11. DNA İzolasyonu Yapılan Bazı İzolatların %1'lik Agaroz Jeldeki 16S rRNA Görüntüsü



Şekil 4.12. DNA İzolasyonu Yapılan Bazı İzolatların %1'lik Agaroz Jeldeki 16S rRNA Görüntüsü

4.11. 16S rRNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi Ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

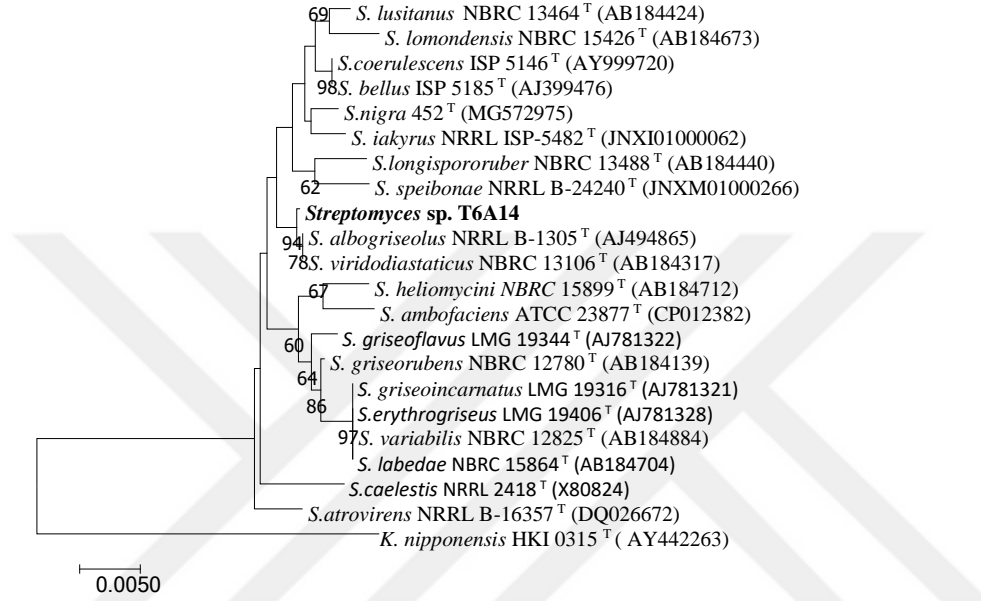
16S rRNA dizilerinin eldesi ve saflaştırma işlemleri Hizmet Alımı (MacroGen Inc., Hollanda) yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 16S rRNA ham dizi verileri MEGA 7.0 programında hizalanmış ve EzTaxon Serverda (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>; Kim vd., 2012: 718) bulunan global hizalama algoritmaları kullanılarak en yakın akraba organizmalarla olan 16S rRNA nükleotit benzerliği belirlenmiştir. Filogenetik analizler için MEGA 7.0 ve BioEdit analiz programları (Kumar vd., 2016: 1870) kullanılmıştır. Filogenetik dendogramlar, Neighbour Joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) algoritması ve Jukes-Cantor evrimsel uzaklık matriksi ile çizilmiştir. Elde edilen filogenetik ağaçlar bize kompostlaşmada etkin olan Aktinomisetlerin belirlenmesinde rehberlik etmiştir. Ayrıca elde edilen bu filogenetik ağaçların incelenerek ve EzTaxon Server programındaki benzerlik oranlarına bakılarak olası yeni tür/türler belirlenmiştir. Filogenetik analizlerin yapılmasında, benzer olan organizmalar birlikte analiz edilmiş ve tek bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Farklı türlerle akrabalık ilişkisi gösterenler ise ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bunun nedeni ise *Streptomyces* cinsinin dokuz yüz kırk iki tür ve kırk dört alt türe ve izolatların en yakın oldukları türlere 0-15 nt farklılığına sahip olmasıdır. Filogenetik analizlerde ayrımı en iyi şekilde görebilmek için her izolat ayrı analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.13-19'da verilmiştir.

Filogenetik analizler sonucunda test edilen 15 izolatın *Streptomyces* cinsi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* cinsi ile ilişkili olan izolatlardan FG59 sp. izolatı *Streptomyces griseoincarnatus* ile % 98.94 benzerlik ve 15/1416 nt farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. FG71 izolatı ise *S. matensis* ile %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

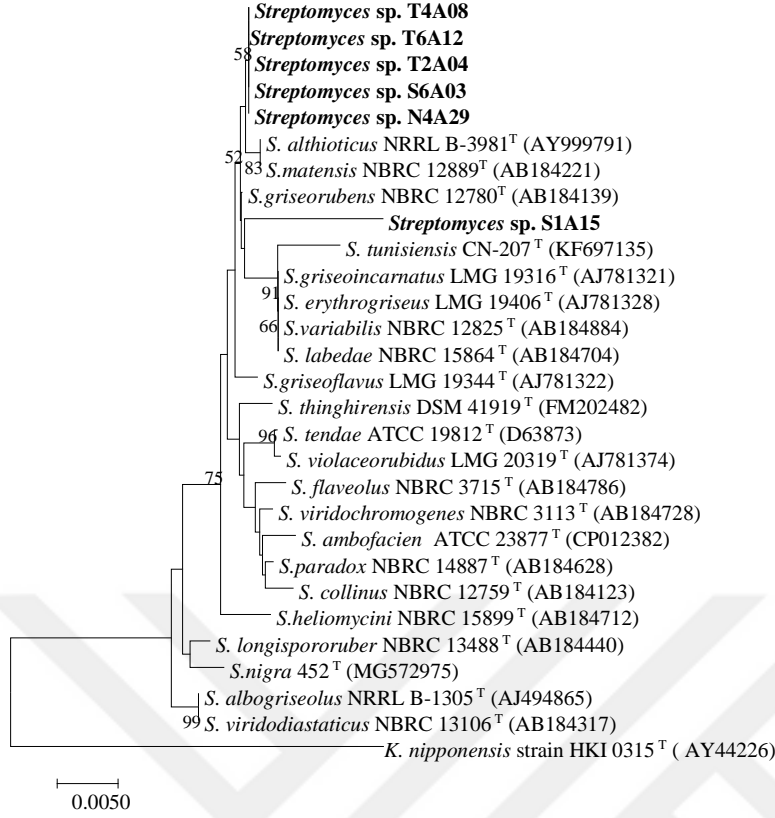
N4A29, S6A03, T2A04, T4A08 ve T6A12 izolatları *S. griseorubens* ile % 99.93 benzerlik ve 1/1447 nt farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. S1A15 izolatının da *S. griseorubens* ile yakın akraba olduğu tespit edilmiştir (% 98.76 benzerlik; 18/1447 nt farklılığı). T6A14 izolatı %99.93 benzerlik ve 1/1449 nt farklılığı ile *S. albogriseolus* tip türüne akraba olduğu belirlenmiştir.

N4A13, S5B20, T4A05 ve T4A06 izolatları *S. griseorubens* ile % 99.93 benzerlik ve 1/1447 nt farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir.

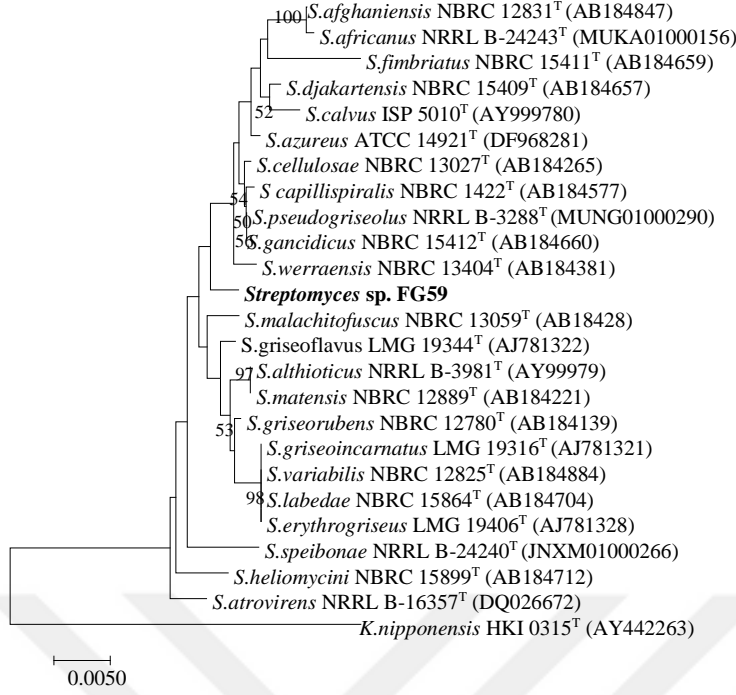
Streptomyces cinsi ile ilişkili olan izolatlardan N3C07 sp. izolatu *Streptomyces thermovulgaris* ile % 100 benzerlik ve 0/1427 nt farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir. *Streptomyces* cinsi ile ilişkili olan izolatlardan S4B18 sp. izolatu *Streptomyces matensis* ile % 99.93 benzerlik ve 1/1433 nt farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm dizileme sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.



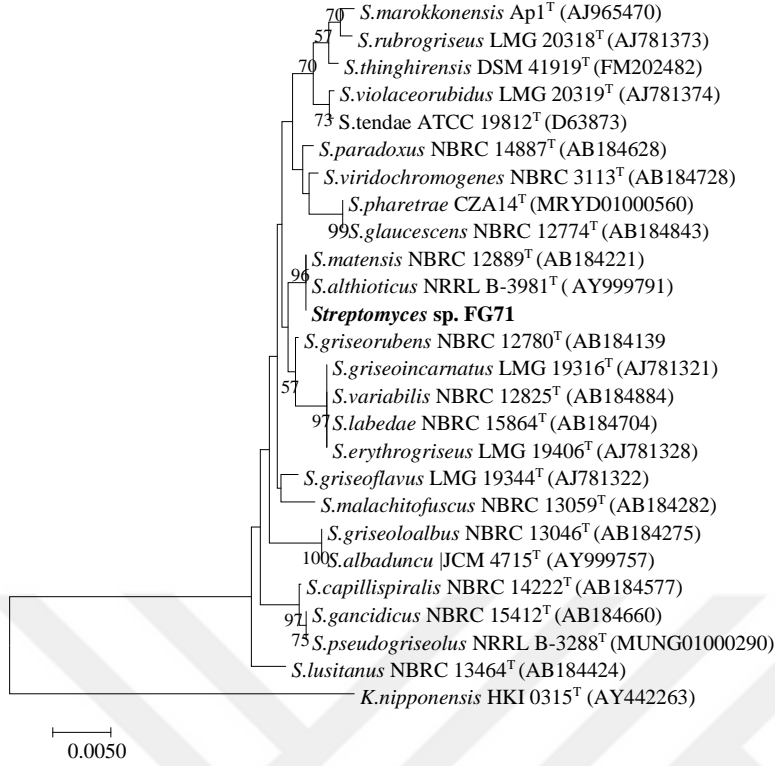
Şekil 4.13. *Streptomyces* cinsine ait T6A14 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



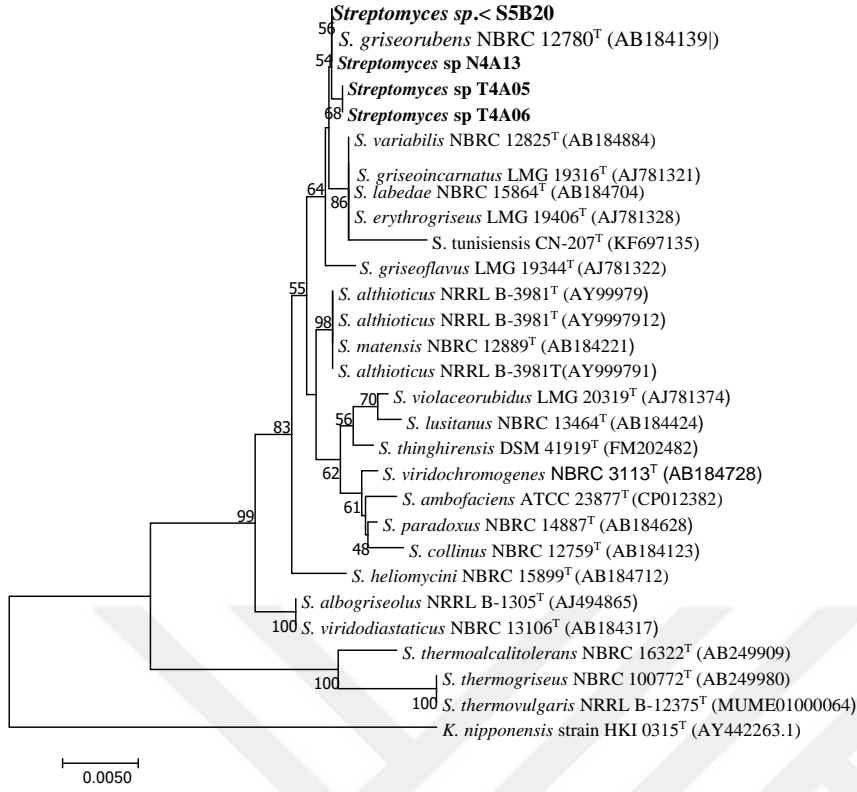
Şekil 4.14. *Streptomyces* cinsine ait N4A29, S1A15, S6A03, T2A04, T4A08 ve T6A12 izolatları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



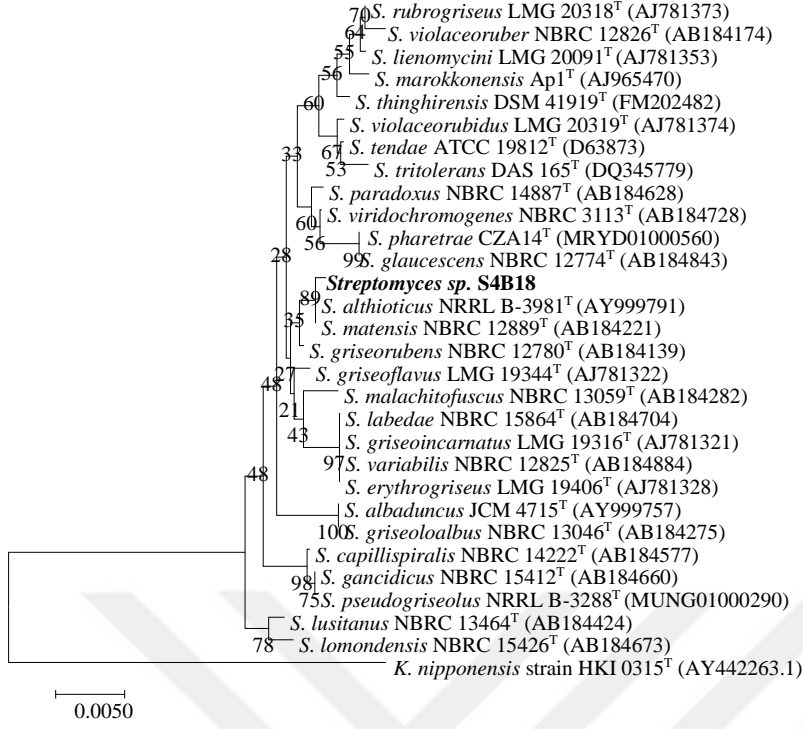
Şekil 4.15. *Streptomyces* cinsine ait FG59 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



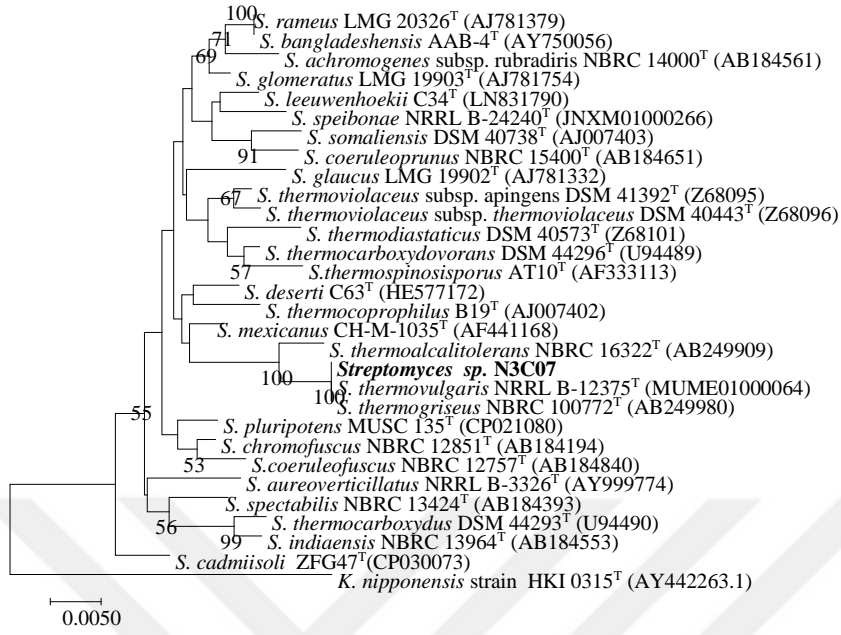
Şekil 4.16. *Streptomyces* cinsine ait FG71 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987: 407) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



Şekil 4.17. *Streptomyces* cinsine ait N3C07, N4A13, S4B18, T4A05, S5B20 ve T4A06 izolatları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



Şekil 4.18. *Streptomyces* cinsine ait S4B18 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.



Şekil 4.19. *Streptomyces* cinsine ait N3C07 izolatu ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *K. nipponensis* DSM 0315^T (AY442263) kullanılmıştır.

Tablo 4.3. 16S rRNA Analizi Yapılan Mikroorganizmaların Benzerlik ve Nükleotit Farklılıkları

Organizma Kodu	Tür	Benzerlik	Nükleotit Farklılığı	Dizi Uzunluğu (bp)
N3C07	<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	100.000	0/1427	1,443 bp
N4A13	<i>Streptomyces griseorubens</i>	100.000	0/1418	1,441 bp
S4B18	<i>Streptomyces matensis</i>	99.93	0/1433	1,449 bp
S5B20	<i>Streptomyces griseorubens</i>	100.000	0/1412	1,447 bp
T4A05	<i>Streptomyces griseorubens</i>	100.000	0/1416	1,450 bp
T4A06	<i>Streptomyces griseorubens</i>	100.000	0/1420	1,444 bp
FG59	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	98.94	15/1416	1,458 bp
FG71	<i>Streptomyces matensis</i>	100.000	0/1419	1,465 bp
N4A29	<i>Streptomyces griseorubens</i>	98.94	1/1447	1,496 bp
S1A15	<i>Streptomyces griseorubens</i>	98.76	18/1447	1,504 bp
S6A03	<i>Streptomyces griseorubens</i>	99.93	1/1447	1,519 bp
T2A04	<i>Streptomyces griseorubens</i>	99.93	1/1447	1,511 bp
T2A08	<i>Streptomyces griseorubens</i>	99.93	1/1447	1,492 bp
T6A12	<i>Streptomyces griseorubens</i>	99.93	1/1447	1,500 bp
T6A14	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	99.93	1/1449	1,501 bp

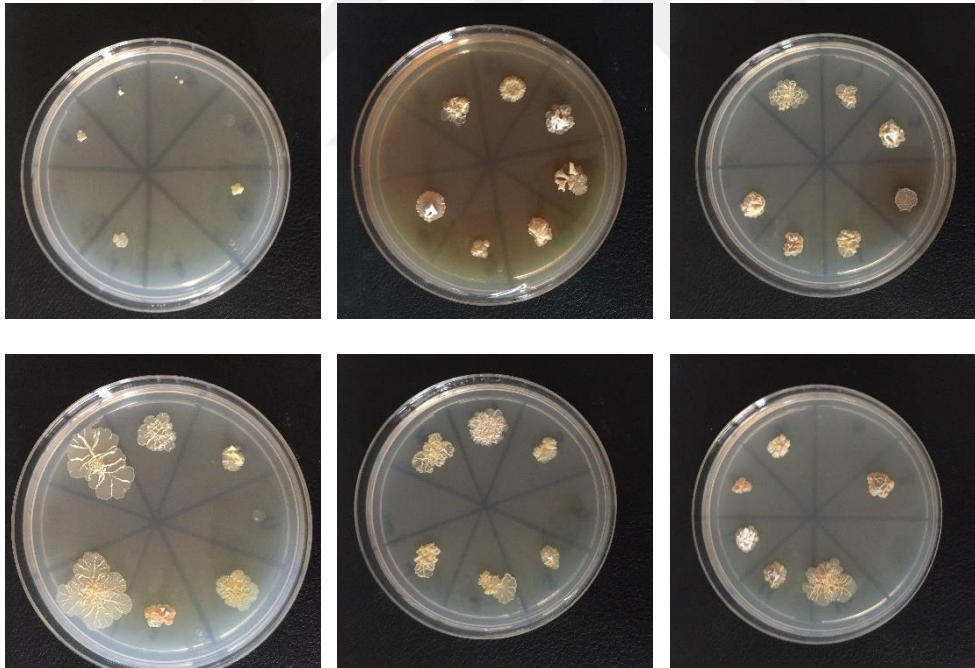
4.12. Kompostlaşma İçin Seçilen Aktinobakteri İzolatlarının Çoğaltılması, Liyofilize Edilmesi

Kompostlaşma deneylerinde kullanılmak üzere N3C07, N4A13 ve T4A05 kodlu üç *Streptomyces* spp. suşu seçilmiştir. Suşların seçiminde enzim test sonuçları, C kaynağı kullanımları, sıcaklık, ph ve üre testleri ile morfolojik analizler ve 16S rRNA dizileme analiz sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. Seçilen suşlar en iyi üreme gösterdikleri besiyerinde çoğaltılmış, 250 ml'lik Bennett's brothlarda 3-5 gün 160 rpm'de sıcaklık isteklerine göre inkübe edilmiştir.

Aktifleştirilen mikroorganizmalar 15 ml'lik falkonlara dağıtılarak santrifüjlenmiş ve elde edilen pelletler -20 °C' 1 gece bekletilmiştir. 1 gece sonunda 15 ml'lik falkonlar 24 saat liyofilizatörde kurutulmaya bırakılmıştır. Elde edilen kuru örnekler steril kapta tartılmış ve kullanıma kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

4.13. Sıcaklık Toleransı

Sıcaklık tolerans testlerinde sıcaklık aralıkları 4 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C olarak belirlenmiştir. Bennet's agara nokta inokülasyon ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler belirlenen sıcaklıklarda 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık tolerans petri görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir, detaylı görseller Ek-8'de verilmiştir. Suşların sıcaklık test sonuçları tablo 4.4.'te verilmiştir. Sıcaklık tolerans testi uygulanan 21 suştan 10 tanesi (T4A08, FG59, T6A14, FG71, T6A12, S5B20, N3C07, N1A19, T4A09, N2D41) 4-60 °C'deki sıcaklık aralıklarında üreme göstermiştir. 2 suş (S1A16, N1CO1) 4 °C'de üreme göstermemiştir. 2 suş (N4A13, S6A03) ise 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda üreme göstermemiştir.



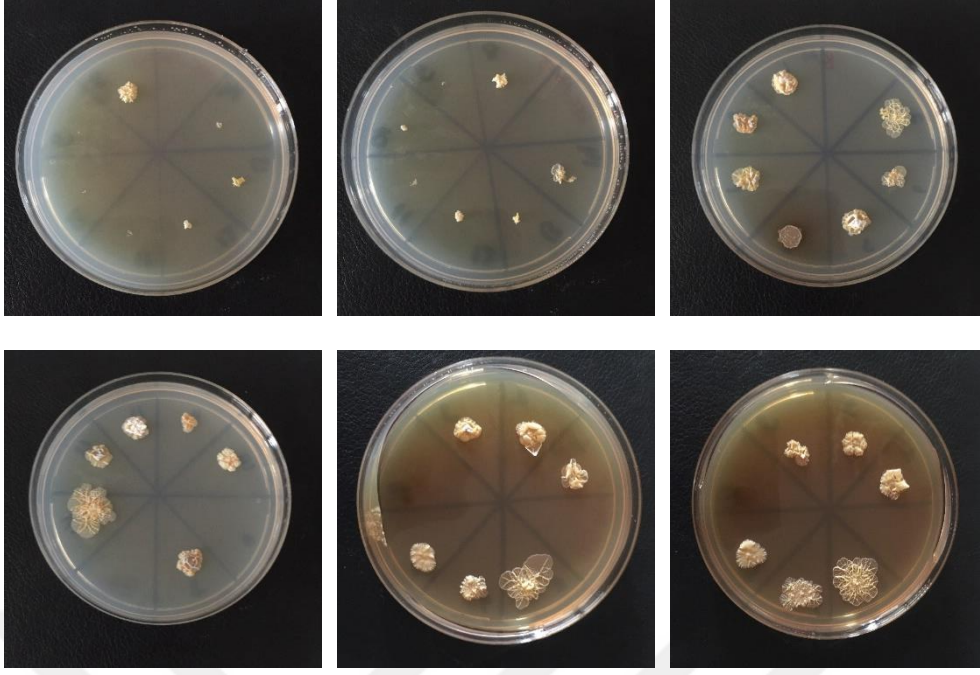
Şekil 4.20. Sıcaklık Tolerans Testi Petri Görüntüleri

Tablo 4.4. Seçilen İzolatların 4 °C- 60 °C Sıcaklık Tolerans Test Sonuçları

Org. Kodu	4 °C	20 °C	30 °C	37 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
S1A15	+	+	+	+	+	+	-	-
T4A08	+	+	+	+	+	+	+	+
N4A13	+	+	+	+	+	-	-	-
FG59	+	+	+	+	+	+	+	+
N4A29	+	+	+	+	+	+	-	-
T2A04	+	+	+	+	+	+	-	+
T6A14	+	+	+	+	+	+	+	-
FG71	+	+	+	+	+	+	+	+
T6A12	+	+	+	+	+	+	+	+
S6A03	+	+	+	+	+	-	-	-
T4A05	+	+	+	+	+	+	-	-
T4A06	+	+	+	+	+	+	-	-
S5B20	+	+	+	+	+	+	+	+
S4B18	+	+	+	+	+	+	-	-
N3C07	+	+	+	+	+	+	+	+
N1A19	+	+	+	+	+	+	+	+
T4A09	+	+	+	+	+	+	+	+
S1A16	-	+	+	+	+	+	+	-
N1C01	-	+	+	+	+	+	+	-
N3C40	+	+	+	+	+	+	+	-
N2D41	+	+	+	+	+	+	+	+

4.14. pH Toleransı

pH tolerans testlerinde pH aralıkları 4-9 olarak belirlenmiştir. Tolerans testi için hazırlanan Bennets agara nokta inokülasyon ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyer belirlenen suşların optimum sıcaklıklarında 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. pH tolerans petri görüntüleri Şekil 4.21’de verilmiştir. Detaylı görseller Ek-9’da verilmiştir. İzolatların pH test sonuçları tablo 4.5.’de verilmiştir. 21 suşa pH tolerans testleri uygulanmıştır. Suşlardam 2 tanesi (FG59, T4A06) pH 4 ve pH 5’te üreme göstermemiştir. *Streptomyces* sp. N3C40 suşu pH 4’te üreme göstermemiştir. *Streptomyces* sp. N1C01 suşu pH 4, pH 5 ve pH 6’da üreme göstermemiştir. *Streptomyces* sp. S1A15, T4A08, N4A13, N4A29, T2A04, T6A14, FG71, T6A12, S6A03, T4A05, S4B18, S5B20, N3C07, N1A19, T4A09, S1A16 ve N2D41 suşları ise pH 4 – 9 aralığında üreme göstermişlerdir.



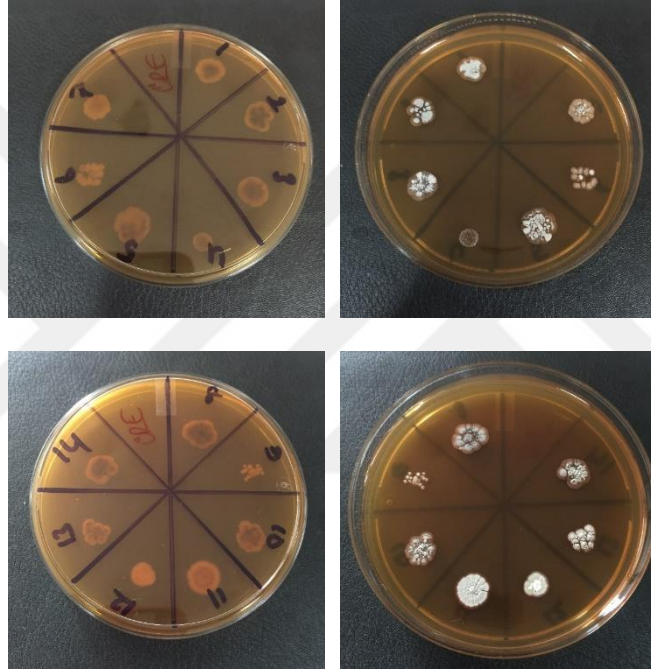
Şekil 4.21. Seçilen İzolatların 4-9 pH Tolerans Test Sonuçlarının Petri Görüntüleri

Tablo 4.5. Seçilen İzolatların pH 4-9 Tolerans Test Sonuçları

Org. Kodu	pH: 4	pH: 5	pH: 6	pH: 7	pH: 8	pH: 9
S1A15	+	+	+	+	+	+
T4A08	+	+	+	+	+	+
N4A13	+	+	+	+	+	+
FG59	-	-	+	+	+	+
N4A29	+	+	+	+	+	+
T2A04	+	+	+	+	+	+
T6A14	+	+	+	+	+	+
FG71	+	+	+	+	+	+
T6A12	+	+	+	+	+	+
S6A03	+	+	+	+	+	+
T4A05	+	+	+	+	+	+
T4A06	-	-	+	+	+	+
S5B20	+	+	+	+	+	+
S4B18	+	+	+	+	+	+
N3C07	+	+	+	+	+	+
N1A19	+	+	+	+	+	+
T4A09	+	+	+	+	+	+
S1A16	+	+	+	+	+	+
N1C01	-	-	-	+	+	+
N3C40	-	+	+	+	+	+
N2D41	+	+	+	+	+	+

4.15 Üre Hidroliz Testi

Suşlar üre agara nokta inokülasyon tekniği ile inkübe edilmiştir. İnkübe edilen petriler izolatların optimum sıcaklıklarında (45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C) 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üreme ve zon gösteren suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üre hidroliz petri görüntüleri Şekil 4.22’de verilmiştir. Suşların üre hidroliz test sonuçları tablo 4.6.’de verilmiştir. Üre hidroliz testi 21 suşa uygulanmıştır. 21 suş üre hidroliz testinde pozitif sonuç göstermişlerdir.



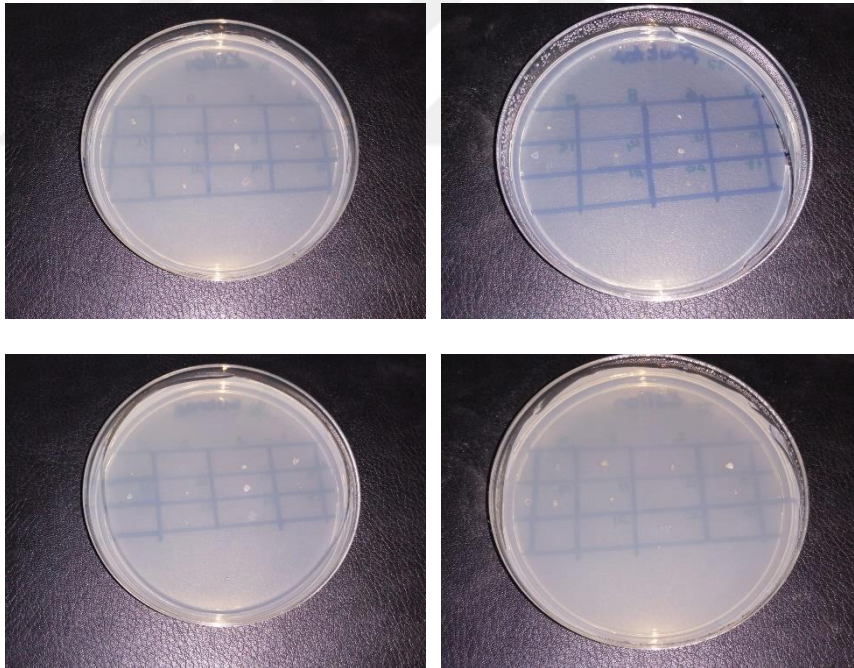
Şekil 4.22. İzolatların Üre Hidroliz Testi Petri Görüntüleri

Tablo 4.6. İzolatların Üre Hidroliz Test Sonuçları

Organizma Adı	Üre Hidrolizi	Organizma Adı	Üre Hidrolizi	Organizma Adı	Üre Hidrolizi
S1A15	+	T4A06	+	FG71	+
T4A08	+	S5B20	+	T6A12	+
N4A13	+	S4B18	+	S6A03	+
FG59	+	N3C07	+	T4A05	+
N4A29	+	N1A19	+	N1C01	+
T2A04	+	T4A09	+	N3C40	+
T6A14	+	S1A16	+	N2D41	+

4.16. Karbon Kaynaklarının Kullanımı

Farklı karbon kaynakları olarak seçilen D-glikoz, sukroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz varlığında suşların üremeleri incelenmiştir. Negatif ve pozitif kontrollere göre suşların karbon kaynaklarını kullanıp kullanmadığına göre üreme durumlarına bakılmıştır. Suşların karbon kaynakları petri görüntüleri Şekil 4.23'te verilmiştir. Detaylı görseller Ek-11'de verilmiştir. Suşların karbon kaynakları test sonuçları tablo 4.7.'de verilmiştir. Karbon kaynakları testi sonucunda *Streptomyces* sp. T4A06, T6A12, S1A16, FG59, T6A14 ve T2A04 suşları negatif kontrol, D-glikoz, sukroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz varlığında pozitif sonuç vermiştir. *Streptomyces* sp. N4A13, N1C01 ve N3C40 suşları negatif kontrol ve D-glikoz varlığında pozitif sonuç verirken, sukroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz varlığında negatif sonuç vermiştir. *Streptomyces* sp. N1A19, N2D41, T4A05 ve S6A03 suşları galaktoz varlığında negatif sonuç vermiştir, sukroz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve fruktoz varlığında pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.23. İzolatların Karbon Kaynakları Kullanım Testi Petri Görüntüleri

Tablo 4.7. İzolatların karbon Kaynakları Kullanım Test Sonuçları

Organizma Adı	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Galaktoz	Arabinoz	Ksilan	Sukroz	Fruktoz
T6A12	+	+	+	+	+	+	+
S1A16	+	+	+	+	+	+	+
S1A15	+	+	+	-	+	+	-
N4A13	+	+	-	-	-	-	-
N4A29	+	+	+	+	+	+	-
T4A06	+	+	+	+	+	+	+
N1A19	+	+	-	+	+	+	+
T4A08	+	+	+	-	+	+	+
FG59	+	+	+	+	+	+	+
FG71	+	+	-	-	+	+	+
T4A05	+	+	-	+	+	+	+
T6A14	+	+	+	+	+	+	+
T2A04	+	+	+	+	+	+	+
T4A09	+	+	+	-	+	+	+
S5B20	+	+	-	-	+	+	+
S4B18	+	+	-	-	-	+	-
N1C01	+	+	-	-	-	-	-
N3C40	+	+	-	-	-	-	-
N2D41	+	+	-	+	+	+	+
N3C07	+	+	+	-	+	-	-
S6A03	+	+	-	+	+	+	+

4.17. Antagonistik Etki

Antagonistik etki ile suşların birbirleri ile uyumluluğu belirlenmiştir. Test “Cross-streak” olarak adlandırılan bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Dikey olarak inoküle edilen mikroorganizma, yatay inoküle edilen mikroorganizmayı inhibe edebildiği gibi herhangi bir etkide göstermeyebilir. Değerlendirme inhibisyon oranlarına göre yapılmıştır. *Streptomyces* sp. T4A06, N3C07, T4A05 ve N4A13 suşlarına antagonistik etki testi uygulanmıştır.

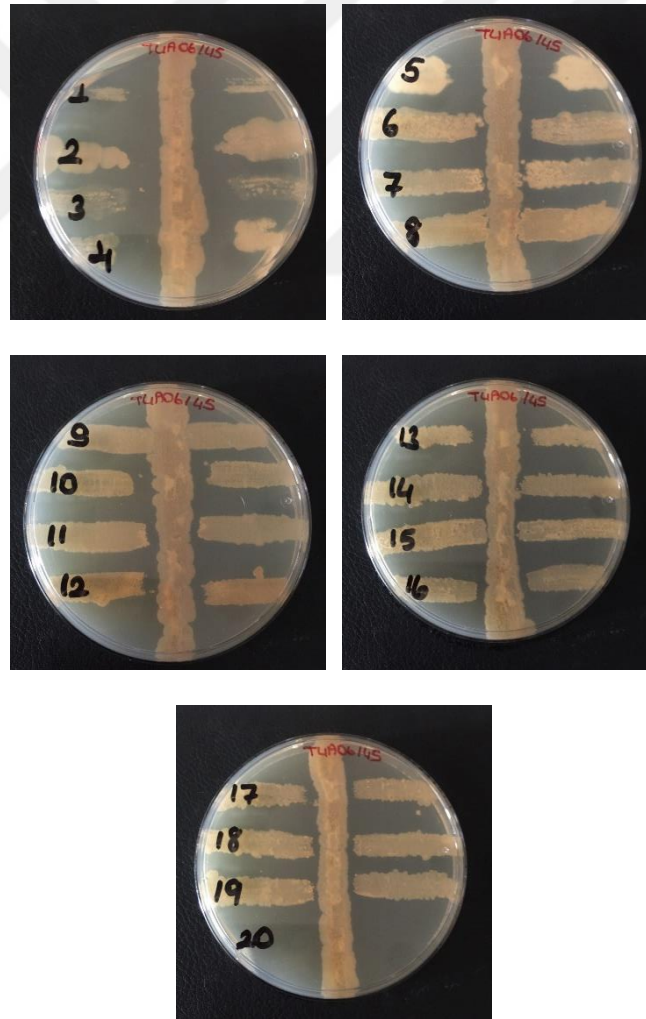
Suşların antagonistik etki petri görüntüleri Şekil 4.24’te verilmiştir. Suşların antagonistik etki sonuçları tablo 4.8. – 4.11.’de verilmiştir. Detaylı görseller Ek-11’de verilmiştir.

Streptomyces sp. T4A06 suşunun antagonistik etki sonucunda *Streptomyces* sp. S1A16 ve S6A03 suşlarını inhibe etmediği, *Streptomyces* sp. T6A12, S1A15, N4A13, N4A29, N1A19, T4A08, FG59, FG71, T4A05, T6A14, T2A04, T4A09, S5B20, S4B18, N1C01, N3C40, N2D41 ve N3C07 suşlarını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Streptomyces sp. N3C07 suşunun antogonistik etki sonucunda *Streptomyces* sp. N1C01, T4A09, T4A05 ve S6A03 suşlarını inhibe etmediği, *Streptomyces* sp. FG71, N4A29, T2A04, T6A14, N3C40, S1A16, S1A15, T4A08, N4A13, FG59, T406, T6A12, N2D41, N1A19, S5B20 ve S4B18 suşlarını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Streptomyces sp. T4A05 suşunun antogonistik etki sonucunda *Streptomyces* sp. N1C01, T4A09, S6A03, N3C40, S1A16, S1A15, T4A08, N4A13, FG59, T4A06, T6A12, N2D41, N1A19, S5B20 ve S4B18 suşlarını inhibe etmediği, *Streptomyces* sp. FG71, N4A29, T2A04, T6A14 ve N3C07 suşlarını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Streptomyces sp. N4A13 suşunun antogonistik etki sonucunda *Streptomyces* sp. FG59, N1A19, S5B20, S4B18 ve S6A03 suşlarını inhibe etmediği, *Streptomyces* sp. N1C01, T4A09, N3C40, S1A16, S1A15, T4A08, T4A05, T4A06, T6A12, N2D41, N1A19, FG71, N4A29, T2A04, T6A14 ve N3C07 suşlarını inhibe ettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.24. İzolatların Antogonistik Etki Testi Petri Görüntüleri

Tablo 4.8. T4A06 izolatının antogonistik etki sonuçları

Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu	Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu
FG71	+	T4A08	+
N4A29	+	N4A13	+
T2A04	+	FG59	+
T6A14	+	T4A05	+
N1C01	+	N3C07	+
N3C40	+	T6A12	+
T4A09	+	N2D41	+
S1A16	-	N1A19	+
S1A15	+	S5B20	+
S4B18	+	S6A03	-

*+: İnhibe ettiği -: İnhibe etmediği

Tablo 4.9. N3C07 İzolatının Antogonistik Etki Sonuçları

Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu	Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu
FG71	+	T4A08	+
N4A29	+	N4A13	+
T2A04	+	FG59	+
T6A14	+	T4A05	-
N1C01	-	T4A06	+
N3C40	+	T6A12	+
T4A09	-	N2D41	+
S1A16	+	N1A19	+
S1A15	+	S5B20	+
S4B18	+	S6A03	+

*+: İnhibe ettiği -: İnhibe etmediği

Tablo 4.10. T4A05 İzolatının Antagonistik Etki Sonuçları

Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu	Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu
FG71	+	T4A08	-
N4A29	+	N4A13	+
T2A04	+	FG59	-
T6A14	+	N3C07	-
N1C01	-	T4A06	-
N3C40	-	T6A12	-
T4A09	-	N2D41	-
S1A16	-	N1A19	-
S1A15	+	S5B20	-
S4B18	-	S6A03	-

*+: İnhibe ettiği -: İnhibe etmediği

Tablo 4.11. N4A13 İzolatının Antagonistik Etki Sonuçları

Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu	Organizma Adı	İnhibisyon Sonucu
FG71	+	T4A08	+
N4A29	+	T4A05	+
T2A04	+	FG59	-
T6A14	+	N3C07	+
N1C01	+	T4A06	+
N3C40	+	T6A12	+
T4A09	+	N2D41	+
S1A16	+	N1A19	-
S1A15	+	S5B20	-
S4B18	-	S6A03	-

*+: İnhibe ettiği -: İnhibe etmediği

4.18. Kompost Denemeleri

Materyal-Metod kısmında belirtildiği üzere toplamda 8 adet sistem rahat takip edilebilmesi amacıyla harf kodu verilerek hazırlanmış ve sistemler periyodik ölçümlerle izlenmiştir. Tez kapsamında ilk olarak tüm sistemlerin sıcaklık performansları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.12’de verilmiştir. Çelge’de A, B ve C kodlarıyla verilen mikroorganizmalar sırasıyla *Streptomyces* sp. N3C07, T4A05 ve N4A13 kodlarıyla enzim ve parametre testlerinde kullanılan mikroorganizmalara karşılık gelmektedir. Önden belirtildiği üzere karışımlarda toplam mikroorganizma ağırlıkları 1 g olacak şekilde ekleme gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.12. Tez Çalışması Kapsamında Hazırlanan Sistemlerin 15 Günlük Sıcaklık Performansları

Sistem	Başlangıç Sıcaklığı (°C)	55 °C’ye ulaşma zamanı (gün)	>55 °C’de kalma zamanı (gün)	Pik sıcaklığı (°C)	Pik sıcaklığına ulaşma zamanı (gün)	Termofilik fazda kalma süresi (gün)*	30 °C’ye ulaşma süresi (gün)
K	30	3	4	65	6	10	12
A	30	3	4	63	5	13	13
B	30	4	3	60	5	13	15
C	30	3	1	55	3	10	14
AB	30	4	2	55	4	13	15
AC	33	4	6	56	4	13	15
BC	30	2	8	60	3	13	13
ABC	30	3	4	58	7	13	13

*Termofilik fazda kalma süresi yığın sıcaklığının 35 °C’nin üzerinde kaldığı süre temel alınarak hesaplanmıştır.

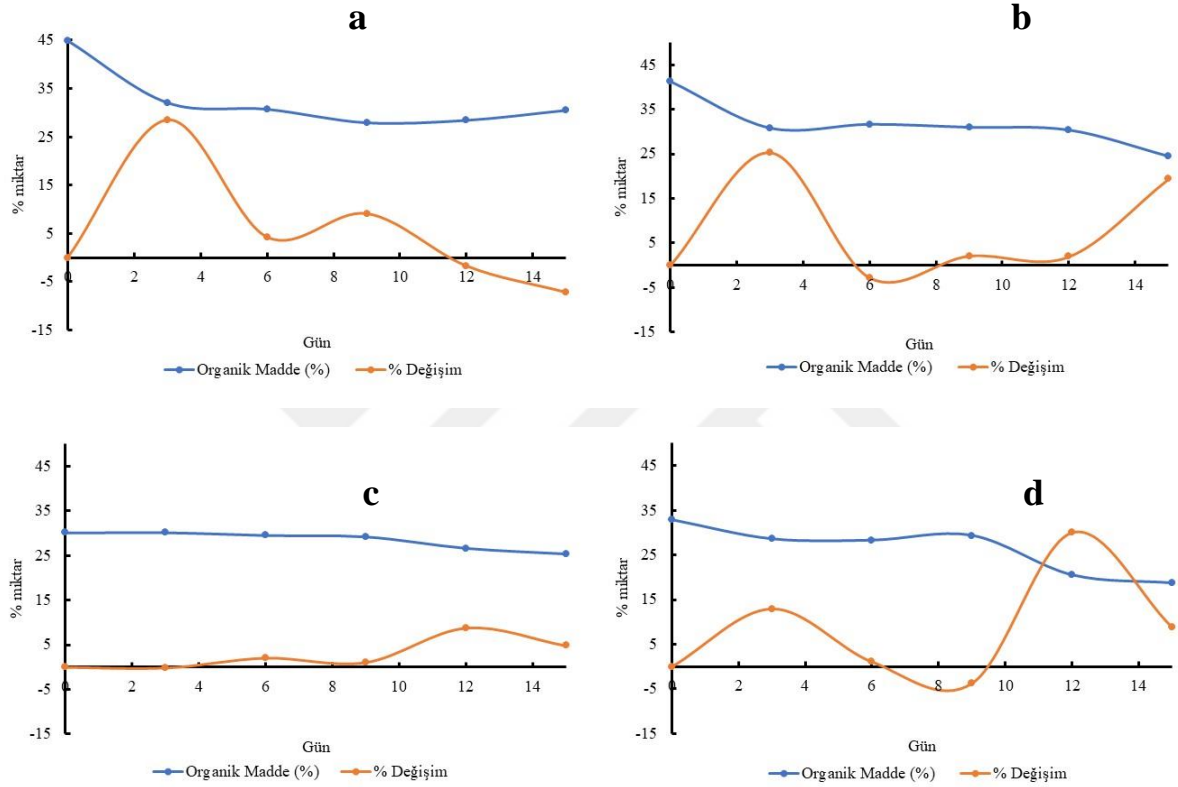
Sistemler genel olarak incelendiğinde elde edilen ilk bulgu mikroorganizma eklenmesiyle termofilik fazda kalma süresinin değişimidir. Sistem C haricinde tüm sistemlerde mikroorganizma eklenmesine bağlı olarak termofilik evrenin uzun sürdüğü görülmüştür. Pik sıcaklıkları arasında yapılan bir karşılaştırma sistemlerde 60 °C ve üzeri sıcaklıkların elde edilebildiğini göstermiştir. Tüm sistemler kompost için hijyen gereksinimi olan 55 °C sıcaklık değerinde en az 1 gün kalmıştır (Inserra vd. 2006: 1). Sistem BC en kısa sürede 55 °C ve pik sıcaklığına ulaşmış termofilik fazda en uzun süre kalan sistemler arasında yer almıştır. Sıcaklığa bağlı ilk bulgular en iyi performansın Sistem BC’de elde edildiğini ortaya koymuştur.

Sistemlerin pH ve nem performansları birarada tablo 4.13'te verilmiştir. Sonuçlar pH değerlerinin 9-9.5 aralığında değiştiğini gösterirken nem miktarları % 40-50 arasında değişmektedir. Kompost sistemlerinde yer alan gübre miktarı düşünüldüğünde pH için elde edilen değerler beklenen bir sonuçtur. Karışımların nem oranları ilk hazırlandıkları anda ölçüldüğünde % 40-50 aralığındadır. Bu nedenle kompostlama işlemi süresinde sistemlere herhangi bir su takviyesi gerçekleştirilmemiştir. Sistemlere tek müdahale 3 gün aralıklarla yapılan aktarma işlemleridir. Sistemlerle ilgili ilk bulgular nem içeriklerinin büyük oranda korunduğunu göstermektedir.

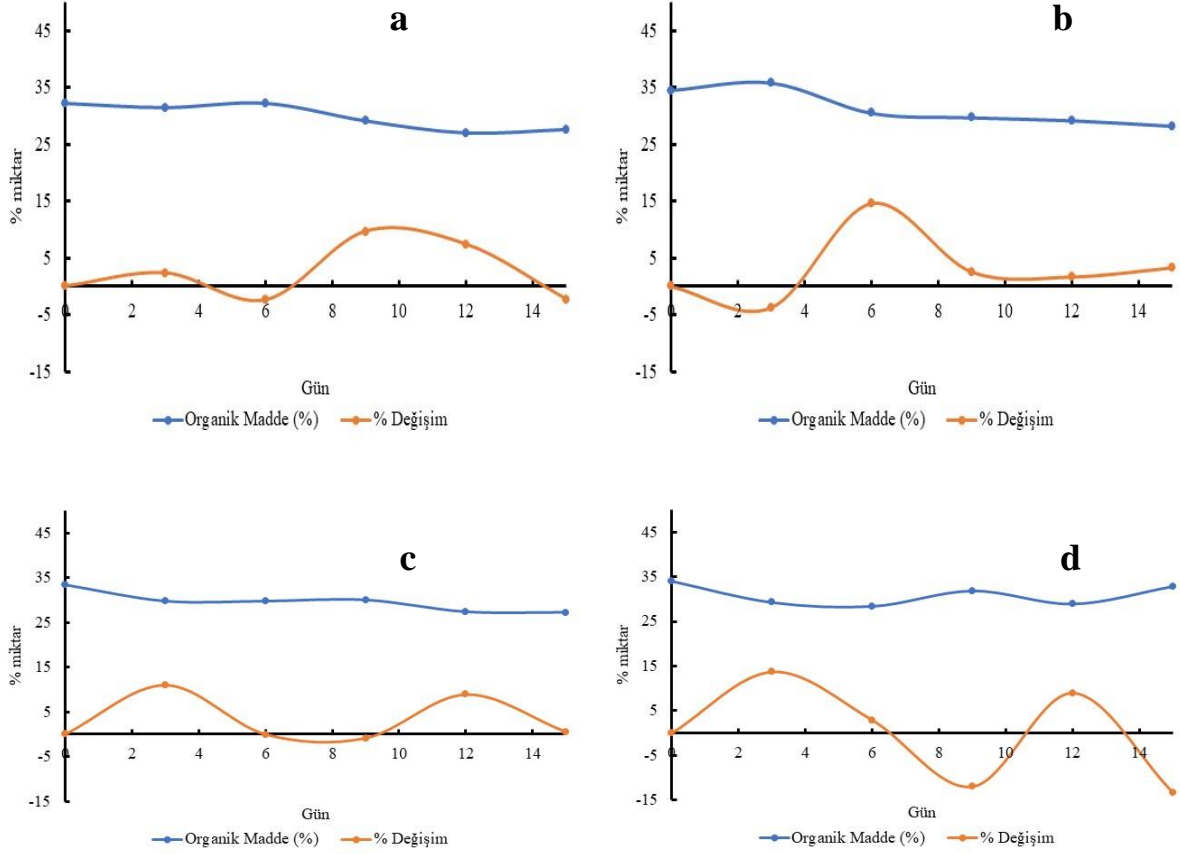
Tablo 4.13. Tez Çalışması Kapsamında Hazırlanan Sistemlerin pH ve Nem (%) Performansları

	Sistem Kontrol		Sistem A	
Gün	Ph	Nem (%)	Ph	Nem (%)
0	9.03	37	8.93	42
3	9.24	45	9.20	42
6	9.23	35	9.37	37
9	9.17	39	9.37	40
12	9.22	37	9.41	27
15	9.34	39	9.34	28
	Sistem B		Sistem C	
Gün	Ph	Nem (%)	Ph	Nem (%)
0	9.25	51	9.44	48
3	9.42	43	9.39	46
6	9.54	43	9.57	44
9	9.39	40	9.48	46
12	9.39	42	9.45	41
15	9.37	40	9.59	38
	Sistem AB		Sistem AC	
Gün	Ph	Nem (%)	Ph	Nem (%)
0	9.32	41	9.40	47
3	9.36	46	9.46	47
6	9.22	40	9.35	46
9	9.51	42	9.39	43
12	9.50	40	9.31	44
15	9.53	40	9.50	50
	Sistem BC		Sistem ABC	
Gün	Ph	Nem (%)	Ph	Nem (%)
0	9.10	41	9.09	43
3	9.08	38	9.45	40
6	9.31	40	9.40	39
9	9.41	41	9.35	39
12	9.30	34	9.42	36
15	9.41	36	9.46	28

Kompostlama süresi boyunca 3 günlük periyotlarda alınan numuneler ile elde edilen Organik Madde miktarları ve bir önceki ölçüme göre organik maddede meydana gelen % değişim oranları Şekil 4.25. ve 4.26.'da verilmiştir. İlk bulgular mikroorganizmaların tekli kullanımlarında daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlar ile ilgili detaylı değerlendirme “Tartışma” kısmında verilmiştir.



Şekil 4.25. a) Sistem Kontrol b) Sistem A c) Sistem B ve d) Sistem C için Organik madde ve % değişim oranları



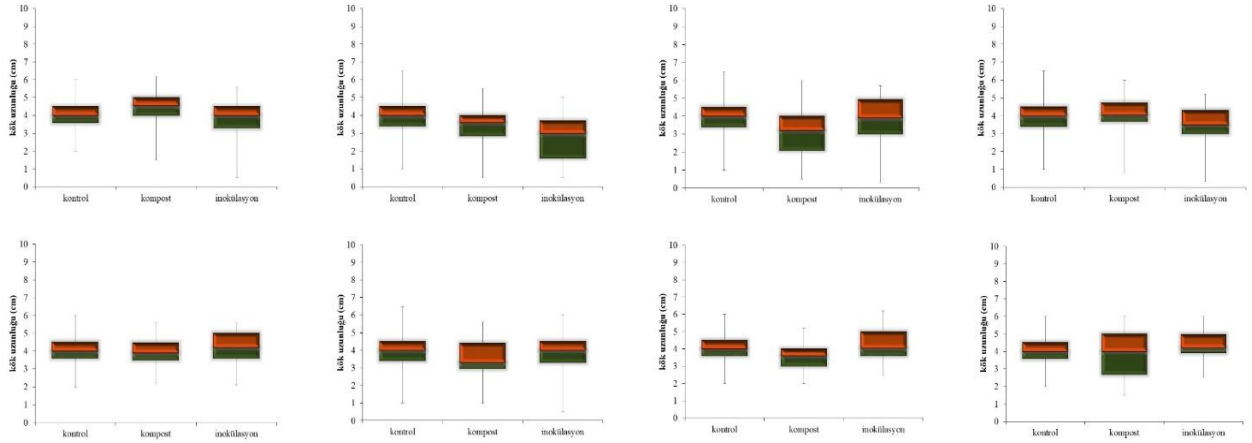
Şekil 4.26. a) Sistem AB b) Sistem AC c) Sistem BC ve d) Sistem ABC için Organik Madde ve % Değişim oranları

Çimlenme indeks testi (GI %) kompost olgunluğunun belirlenmesinde bitki temelli gerçekleştirilen analizler arasında en önemlilerinden biridir. Tez çalışması kapsamında GI % değerleri salatalık ve buğday bitkileri için 3 tekrarlı 2 set şeklinde gerçekleştirilmiştir. Yine tez çalışması kapsamında kompost sıvısıyla inoküle edilen (2 saat) tohumlar ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde amaç kompost sıvısında işlem sonrasında kalan mikrobiyal floranın bitki üzerinde olası olumsuz etkilerinin belirlenmesidir. Değerler tüm sistemler için tablo 4.14’te verilmiştir. Sistemler genel olarak incelendiğinde Sistem C ile hem buğday hem de salatalıkta iyi performans elde edildiği ilk etapta dikkat çekmektedir. Kontrol, C ve ABC sistemleri ile de tüm denemelerde % 80’in üzerinde sonuç elde edilmiştir.

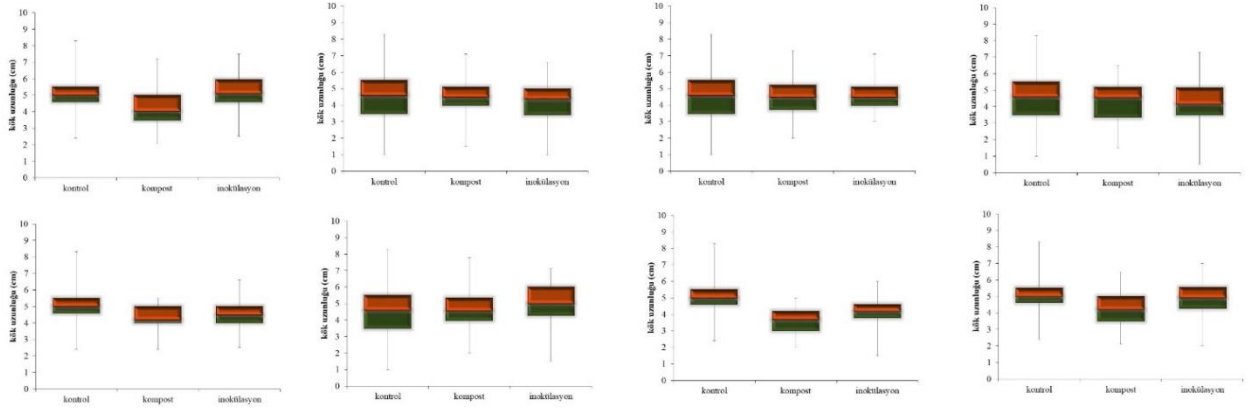
Tablo 4.14. Buğday ve Salatalık Bitkileriyle Elde Edilen Çimlenmede Değerlerinin Sistemlere Göre Değişimi

Sistem	Buğday (Kompost)		Buğday (inoküle)		Salatalık (kompost)		Salatalık (inoküle)	
	1.ölçüm	2.ölçüm	1.ölçüm	2.ölçüm	1.ölçüm	2.ölçüm	1.ölçüm	2.ölçüm
Kontrol	84	80	104	101	108	115	83	95
A	98	93	105	90	75	84	72	76
B	102	80	125	79	68	72	82	83
C	89	87	87	115	101	103	85	82
AB	83	72	93	85	89	98	91	112
AC	129	67	148	94	81	89	80	88
BC	68	69	69	75	70	89	89	104
ABC	80	86	87	96	101	90	110	98

GI % değerlerinin belirlenmesi kapsamında salatalık ve buğday bitkisinin kök uzunluklarına kompost sıvısı ve inokülasyonun etkileri de ayrıca incelenmiştir. Kök uzunluklarındaki değişimler sırasıyla Şekil 4.27. ve 4.28.'de verilmiştir. Sonuçlar birkaç sistem haricinde kök uzunluklarında kompost sıvısına veya tohumların kompost sıvısı içinde inokülasyonuna bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim göstermemektedir. Bitkinin kompost sıvısından etkilenmemesi toksik etki göstermediği anlamına gelmektedir. Bu sonuç tez kapsamında elde edilen önemli bulgular arasındadır.



Şekil 4.27. Kök Uzunluklarında Kompost ve İnoküle Salatalık Bitkisinde Meydana Gelen Değişimler. Üst soldan sağa: Kontrol, Sistem A, Sistem B, Sistem C; Alt soldan sağa: Sistem AB, Sistem AC, Sistem BC ve Sistem ABC.



Şekil 4.28. Kök Uzunluklarında Kompost ve İnoküle Buğday Bitkisinde Meydana Gelen Değişimler. Üst soldan sağa: Kontrol, Sistem A, Sistem B, Sistem C; Alt soldan sağa: Sistem AB, Sistem AC, Sistem BC ve Sistem ABC.



5. TARTIŞMA

Yapılan tez çalışmasında, kompost numunelerinden alınan toprak ve aktif çamur kaynaklarından Aktinobakteria çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla örnekler farklı sıcaklıklarda alınmıştır. Örnekleme sırasında aralarındaki sıcaklık farkı 5 °C'nin altında olan numuneler birleştirilmiştir. Aktinobakteria gruplarını izole etmek ve tanımlamak amacıyla dilüsyon plaka tekniği, Aktinobakteria dışında diğer türlerin üremesini inhibe eden besiyeri ve antibiyotikler varlığında uygulanmıştır. Petri plaklarında gelişim gösteren Aktinobakteria benzeri 84 tane mikroorganizma morfolojik özelliklerine göre seçilmiştir. Seçilen mikroorganizmalara saflaştırma işlemi yapılmış ve enzim test sonuçlarına göre seçilen 21 mikroorganizmanın detaylı morfolojik analizleri yapılmıştır. Morfolojik analizlerde ve enzim test sonuçlarına göre benzer olan izolatlardan biri seçilerek 16S rRNA analizlerine geçilmiştir.

Kompost deneylerinde kullanılacak olan Termofilik *Streptomyces* sp. suşlarının seçiminde 16S rRNA dizileme analizi ile enzim test sonuçları birarada değerlendirilmiştir. Enzim testleri kompost içeriğinde en fazla görülen selüloz, nişasta ve ksilan degradasyonlarının belirlenmesine yöneliktir. Bu kapsamda mikroorganizmaların selülozu, nişastayı ve ksilani degrade edip etmedikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 15 izolat nişasta pozitif, 20 izolat selülaz pozitif ve 2 izolat ksilan pozitif sonuç vermiştir.

İzolatların enzim testleri ve morfolojik tanımlama analizleri tamamlandıktan sonra seçilen izolatlara DNA izolasyonu ve PCR işlemleri uygulanmıştır. 21 izolatın 6'sında PCR ürünleri yeterli kalitede bulunmamış, bütçe yetersizliğine de bağlı olarak 15 izolatın 16S rRNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçlarına göre 10 tane izolatın *Streptomyces griseorubens*, 2 tane izolatın *Streptomyces matensis*, diğer 3 izolatın *Streptomyces albogriseolus*, *Streptomyces thermovulgaris* ve *Streptomyces griseoincarnatus* ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Streptomyces cinsi ile ilişkili olan izolatlardan *Streptomyces* sp. FG59 sp. suşu *Streptomyces griseoincarnatus* ile % 98.94 benzerlik ve 15/1416 nt farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. S1A15 suşunun da *S. griseorubens* ile yakın akraba olduğu tespit edilmiştir (% 98.76 benzerlik; 18/1447 nt farklılığı). Nükleotit farklılıkları göz önüne alındığında *Streptomyces* sp. FG59 ve S1A15 suşlarının olası yeni tür olma ihtimallerinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Enzim test sonuçlarına göre seçilen 21 izolatın morfolojik incelemeleri ISP Project kapsamındaki besiyerleri ve 4 farklı besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatların tanımlanmasında 16S rRNA analizleri kullanılmış ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. 21 izolatın 6'sında önceden belirtildiği üzere PCR ürünleri yeterli kalitede bulunmamış, bütçe yetersizliğine de bağlı olarak 15 izolat ile analizler gerçekleştirilmiştir. 15 izolatın 10 tanesi *Streptomyces griseorubens* ile %98.76-100 0-18 nt farklılıkları arasında değişen oranlarda benzerliğe sahiptir. Bu nedenle kompost karışımlarında kullanılan 3 mikroorganizmadan ikisinin *Streptomyces griseorubens* ile benzerlik göstermesi tesadüf değildir. 16S rRNA analizi önemli bir tanımlama analizidir. Ancak tek başına yeterli değildir. Bu nedenle tez kapsamında ISP besiyerleri (ISP 2-7 agar) ve Aktinobakterilerin morfolojik tanımlanmasında kullanılan diğer besiyerleri (Nutrient Agar, modifiye Bennett's agar, triptikaz soy agar, Czapek's agar) ile üretilen mikroorganizmaların morfolojik özellikleri incelenmiştir. Besiyerleri karşılaştırıldığında kompost karışımında B ve C kodu ile verilen ve her ikisinin de *Streptomyces griseorubens* ile akraba olduğu düşünülen mikroorganizmaların aynı besiyerlerinde farklı gelişim özelliklerine sahip oldukları görülmüştür. Buna göre T4A05 (B) ISP2'de üremezken N4A13 (C) üremektedir. ISP 4 ve 5 besiyerlerinde de mikroorganizmalar farklı üreme davranışı göstermektedir. Bu nedenle bu iki mikroorganizmanın, her ne kadar aynı tür ile akrabalığa sahip olsalar da farklı türler oldukları düşünülmektedir. ISP 4 hava miselyum rengi, substrat miselyum rengi ve çözünebilir pigment renginin incelenmesini sağlamaktadır. ISP 5 ise difüze pigmentlerin incelenmesini sağlamaktadır. ISP 4 besiyerinde yapılan bir karşılaştırma T4A05'de hava miselyumu var iken N4A13'de olmadığını ortaya koymuştur. Örnek olarak verilen bu tip farklılıklar mikroorganizmalar arasında 16S rRNA ile belirlenemeyen ayrımları ortaya çıkarmaktadır. *Streptomyces griseorubens* ile benzerlik gösteren ancak aynı besiyerlerine farklı tepki gösteren N4A29, S6A03 ve T2A04 gibi başka mikroorganizmalarda çalışma kapsamında belirlenmiştir. Bu nedenle seçim kriteri olarak 16S rRNA analizinin yanısıra morfolojik farklılıklar da dikkate alınmıştır.

Kompost karışımlarında kullanılacak mikroorganizmaların seçimi tezin temel hedefleri arasındadır. Seçim kriteri olarak önceden belirtildiği üzere enzim temelli bir eliminasyon prosedürü izlenmişse de tez çalışması kapsamında mikroorganizmaların farklı parametrelere gösterdiği davranışlar da belirlenmiştir. Bu parametreler arasında yer alan sıcaklık performansı karşılaştırıldığında A koduyla kompost karışımlarında kullanılan N3C07'nin 4-60 °C arasında tüm sıcaklık değerlerinde ürettiği görülmüştür. Buna karşılık T4A05 (B) 55 ve 60 °C'de üreme göstermezken N4A13 (C) 50 °C'den itibaren ürememektedir.

Sıcaklık performanslarıyla ön plana çıkan *Streptomyces* sp. FG71, T6A12, T4A09, N2041, N1A19 mikroorganizmaların enzim testlerindeki performansları genel olarak incelendiğinde FG71 ve TGA12'nin sadece selülozu degrade edebildiği diğer organizmaların selüloz yanında nişastayı da degrade edebildikleri görülmüştür. Sözü edilen mikroorganizmalar enzim performansı olarak N3C07'den önemli bir farklılığa sahip değildirler. Ancak izolatanın seçilen diğer iki izolattan farklı olarak 55 °C 'de elde edilmiş olması önemli görülmüştür. Ayrıca 16S rRNA sonuçları N3C07'nin Termofilik *Streptomyces* olarak 1957 yılında tanımlanmış olan *Streptomyces thermovulgaris* ile yakın akraba olduğunu ortaya koymaktadır. 16S rRNA analizi sonucunda sözü edilen mikroorganizmaya benzerlik gösteren tek izolat N3C07'dir. Literatürden *Streptomyces thermovulgaris*'in gübre, gübreli toprak ve komposttan izole edildiği belirlenmiştir. *S. thermovulgaris*, 37 °C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişemeyen ve daha yüksek sıcaklıklarda organik atık ürünlerin biyodegradasyonunu etkilediğine inanılan termofilik *Streptomyces* olarak literatürde tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında sözü edilen mikroorganizma ile yakın akrabalık gösteren N3C07 izolatu bu mikroorganizmadan farklı olarak 4 °C 'den itibaren üreyebilmekte, 60 °C'ye kadar gelişim gösterebilmektedir. Bu gelişimsel farklılık test izolatanın 16S rRNA analizlerine göre *S. thermovulgaris* tip türü ile %100 benzerlik göstermesine rağmen, 0 nt farklılığına sahip olan tanımlanmış yeni türlerin olması nedeniyle farklı bir tür olabileceğini düşündürmektedir. Fakat tür tanımlama kapsamında gerekli olan tüm çalışmaların yapılması ile yeni tür olabileceğini söylememiz mümkün olacaktır. Morfolojik analizler sonucunda bu izolatanın diğer test izolatlarından farklı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde N3C07 izolatu ile ilişkili *Streptomyces thermovulgaris*'in organik atık ürünlerin biyodegradasyon özelliğine sahip olması önemli bir sonuç olarak değerlendirilmiş ve benzerlik gösteren izolatta aynı özelliğe sahip olabileceği düşünülmüştür (Ekkelenkamp ve ark., 2004: 1883).

Seçilen diğer iki mikroorganizma; T4A05 ve N4A13 ortalama bir sıcaklık performansına sahip olsalar da diğer mikroorganizmalardan farklı olarak ksilani degrade edebilmektedirler. T4A05 selüloz, nişasta ve ksilan degradasyonunda etkili olan tek mikroorganizmadır. Sıcaklık açık sistemlerde aktarma aralıklarının düzenlenmesiyle ve/veya kompost karışımında kullanılan miktarların azaltılmasıyla kontrol edilebilir. Reaktörlerde gerçekleştirilen kompostlama işleminde sıcaklık kontrolü otomasyon sistemiyle çok daha etkin şekilde sağlanabilmektedir.

Bir başka deyişle kompost karışımındaki sıcaklık artışının belirli bir düzeyde tutulması ve mikroorganizmaların aktivitelerinin devam ettirilebilmesi mümkündür. Bu nedenle enzim test sonuçları sıcaklığa göre daha önemli bir seçim kriteri olarak ön plana çıkmış ve tez çalışması kapsamında tercih edilmiştir.

Ksilan degradasyonuna pozitif sonucun elde edilmesi tez çalışması için önemli bir sonuçtur. Ksilan özellikle kara bitkilerinde ligninli dokularda yer alan hemiselüloz grubunun temel bileşenidir. Olgunlaşmış odunlar, otlar ve yumuşak dokuların yaklaşık 1/5'ini oluşturması kompost karışımında kullanılacak organik bileşenler için geniş bir yelpazede seçim imkanı sunmaktadır (Kurtuluş, 2010: 6).

Mikroorganizmaların üremesinde pH performanslarının karşılaştırılması tez kapsamında uygulanan seçim kriterleri arasındadır. Ancak sonuçlar mikroorganizmaların tamamına yakınının pH 4-9 aralığında üreyebildiklerini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuç önemlidir ancak kompost karışımında kullanılacak mikroorganizmaların seçiminde pH ek bir kriter olarak değerlendirilememiştir. Benzer şekilde üre hidrolizi de tez çalışması kapsamında ayırt edici olmamıştır. 16S rRNA analizi ile tanımlanan 15 adet mikroorganizmaya ek olarak tanımlanması yapılmayan 6 adet mikroorganizmanın üre hidroliz testleri pozitifdir. Sonuçlar bu testin de seçim kriteri olarak kullanılamayacağını göstermiştir.

Karbon kaynaklarının kullanımı incelendiğinde seçilen mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarındaki performansları zayıftır. N4A13 sadece glikozda üreyebilmektedir. N3C07 arabinoz, sukroz ve fruktozda üreyememektedir. Sadece T4A05 galaktoz hariç tüm karbon kaynaklarında üreme göstererek olumlu bir performans ortaya koymuştur. N3C07'ye alternatif ve tüm karbon kaynaklarında üreyebilen T4A06, FG59, T2A04 mikroorganizmalarının kompost karışımında kullanılmaları ile ilgili çalışmalar tez çalışması sonrasına bırakılmıştır. Tez çalışması sonrasına bırakılan bir başka inceleme hem tüm karbon kaynaklarında üreyebilen hem de tüm enzim testlerinde pozitif sonuç verebilen mikroorganizmaların belirlenebilmesidir. Kompost karışımlarında mikroorganizma eklenmesine bağlı olarak meydana gelen değişimlerin izlenmesinde sıcaklık, pH ve nem ölçümleri önemli bir paya sahiptir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar sözü edilen ölçümlerin tek başlarına yeterli olmadıklarını ortaya koymuştur. Sıcaklık performansları incelendiğinde en iyi performansın BC sisteminde elde edildiği görülmüştür. B ve C kodlu mikroorganizmaların eşit miktarda kompost karışımına eklenmesiyle hazırlanan sistem 55 °C'nin üzerinde 8 gün süresince kalmıştır. Sistemin pik sıcaklığı diğer sistemlere kıyasla yüksek sayılabilecek bir değerde ve en kısa sürede ulaşılan sistemler arasındadır.

Termofilik evrenin toplam süresi diğer sistemlerle kıyaslanabilecek düzeydedir. Bir başka örnek olarak verilebilecek kontrol sisteminde en yüksek pik sıcaklığı elde edilmiştir. Sistem C incelendiğinde en düşük sıcaklık performansı ile karşılaşılmıştır. Örnek olarak verilen üç sistem üzerinden bir performans değerlendirmesi yapıldığında kontrol ve BC sistemlerinde organik madde kayıpları sırasıyla %15 ve 19 olarak gerçekleşirken en düşük sıcaklık performansının elde edildiği C sisteminde %41 ile en yüksek ikinci organik madde kaybına ulaşılmıştır. Dolayısıyla sıcaklık tek başına bir gösterge olarak değerlendirilmemelidir (Tablo 4.13). Karşılaştırılan sistemlerin pH ve nem performansları incelendiğinde kıyaslanan sistemlerin tümünde 15 gün sonunda pH değerleri artış göstermektedir. Sıcaklık performansları sistemlerin en az 12 gün süresince 30 °C'nin üzerinde sıcaklıklarda olduğunu göstermiştir. pH değerleri gübre için geçerli olan 9-9.5 aralığında değişmektedir ve bu değerlerin elde edilmesi karışımdaki gübre miktarı göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur. Dolayısıyla pH üzerinden net bir değerlendirme yapmak mümkün olmamakla birlikte sonuçlar amonyaklaşmanın devam ettiğini bir başka deyişle termofilik evrenin henüz sonlandığını işaret etmektedir. C ve BC sistemi için nem oranlarında azalma gerçekleşirken kontrol sistemi için nem oranının arttığı görülmüştür. Bu sonuç kontrol sisteminin aktivitesinin mikroorganizma eklenen sistemlere kıyasla daha yavaş olduğunu göstermektedir (Çizelge Tablo 4.14).

Tüm sistemlerde sanitasyon koşulu olan 55 °C sınır değerine ulaşılmıştır. Dolayısıyla sistemlerde büyükbaş hayvanlarının bağırsak florasında bulunan *Escherichia coli* gibi mikroorganizmaların düşük oranda bulunması beklenmektedir. *Escherichia coli*'nin 50°C'nin üzerinde düşük üreme oranına sahip olması ve sistemlere eklenen mikroorganizma(lar) miktarlarının yüksek miktarda olması elde edilen sonuçları desteklemektedir. Kompost sistemlerinde kompostlama sürecinde mikrobiyal floradaki değişimler metagenom analizleri ile belirlenecektir. Metagenom analizi tez çalışması sonrasında gerçekleştirilecektir.

Mikroorganizma eklenmesine bağlı olarak organik madde kayıplarında kontrol sistemine kıyasla 3 kata varan artışlar gözlenmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen en önemli sonuçlar arasındadır ve mikroorganizmanın kompost üzerindeki etkisini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Sistemler incelendiğinde mikroorganizmanın tekli eklenmesi durumunda en yüksek aktivite değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. Sistem A, B ve C üzerinden bir değerlendirme yapıldığında bu sistemlerde nem oranlarında önemli azalmaların olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.14.). Ancak sıcaklık performansları incelendiğinde mikroorganizmaya bağlı olduğu düşünülen önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Sistem A ve B’de sıcaklık ilerleyişi kompost sistemlerinde beklenildiği şekilde gerçekleşmekte her iki sistemde de termofilik evre kontrole kıyasla uzun sürmektedir. Sistem C incelendiğinde termofilik evrenin kısa sürdüğü ve sanitasyon koşulu olan 55 °C sıcaklığa ucu ucuna erişildiği belirlenmiştir.

Sistem C ile düşük sıcaklık performansına rağmen yüksek aktivitenin gözlenmesi tez kapsamında elde edilmiş önemli sonuçlar arasındadır. Mikroorganizma A 60 °C’de dahil tüm sıcaklık değerlerinde üremektedir. Bu nedenle kompost karışımında (Sistem A) elde edilen en yüksek sıcaklık değerinin 63 °C olması mikroorganizmanın sıcaklık toleransı ile uyumlu bir sonuçtur. Benzer şekilde mikroorganizmanın sıcaklık toleransına uygun şekilde B sisteminde 60 °C sıcaklıklara ulaşılırken sistem C’de sıcaklık, C’nin sıcaklık toleransına bağlı olarak 55 °C’ye ulaşabilmiştir. Bu sonuçlar mikroorganizmaların eklendikleri karışımlardaki sıcaklık performanslarını doğrudan etkilediğini göstermektedir. Bir başka deyişle mikroorganizmaların, eklendikleri karışımlarda baskın olmalarını sağlayacak yeterli miktarlarda sistemlere verildiği sonuçlardan anlaşılmaktadır.

Bilindiği üzere kompost aktivitesinin belirlenmesinde 15 günlük süre sonunda organik madde kayıplarından yararlanılmıştır. Tekli sistemlerde ortalama % 40 organik madde kaybı gözlenirken ikili (AB, AC ve BC) ve üçlü sistem (ABC) performansları incelendiğinde sonuçlar ikili sistemlerin kontrole yakın bir performans ortaya koyduğunu, üçlü sistemin ise kontrolün de altında bir performansa sahip olduğunu göstermiştir. Organik madde kaybının ikili ve üçlü sistemlerde azalmış olması tez kapsamında elde edilen önemli sonuçlar arasındadır ve ikili veya üçlü mikroorganizma kullanımının verimi olumsuz etkilediğini göstermektedir.

İkili ve üçlü sistemlerde gözlenen performans kayıplarının nedenlerinin belirlenebilmesi için antogonistik etki testleri uygulanmıştır. Antogonistik etki testi büyük ölçüde fikir sağlamaktadır. A kodlu mikroorganizma B’yi inhibe etmezken C’yi inhibe ettiği, B kodlu organizmanın ise A ve C’yi inhibe ettiği belirlenmiştir. C kodlu organizma her iki mikroorganizmayı inhibe etmektedir. Dolayısıyla ikili sistemler ve üçlü sistemde mikroorganizmaların aynı anda sistemlere verilmeleri sonucunda aktivitede gözlenen kayıplar birbirlerini inhibe etme özelliğinden kaynaklanmaktadır. Tüm izolatlarla yapılan antogonistik etki testlerinde A kodlu mikroorganizmanın, test izolatlarından 18’inin üremesini inhibe eden baskın bir mikroorganizma olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık C mikroorganizması da yakın bir performans göstererek 15 mikroorganizmanın üremesini inhibe etmiştir.

B mikroorganizması daha uyumludur ve 20 mikroorganizmadan sadece 6'sının üremesini inhibe etmektedir. Organik madde kayıpları sırasıyla A>C>B şeklinde değişmektedir. Normal koşullarda antagonistik etki istenen bir durum değilken kompostlamada kullanılan mikroorganizmaların inhibisyon oranının yüksek olmasının kullanılan mikroorganizmanın ortamda baskın olması açısından önemli olduğunu göstermiştir.

Kompost olgunluğunun belirlenmesinde bitki temelli çimlenme indeksinden (GI%) yararlanılmıştır. Buğday ve salatalık tohumları ile yapılan denemeler hem kompost sıvısı ile hem de kompost sıvısında inoküle edilen tohumlar ile gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon denemelerinin amacı, kompost sıvısındaki mikrobiyal floaranın olası zararlı etkilerinin tespit edilmesidir. İnokülasyon sonucunda genel olarak % 80'nin üzerinde GI değerleri elde edilmiştir. Bu sonuç mikrobiyal ortamda bitki gelişimini inhibe edecek patojen mikroorganizmaların olmadığını veya ihmal edilebilecek düzeyde olduğunu gösteren bir ön izlenim olarak değerlendirilmiştir. Kesin bulgular metagenom analizi ile elde edilecektir. Ancak bu aşamada elde edilen yüksek GI değerleri önemli görülmüştür. Mikroorganizmaların farklı bitkilere farklı tepkiler gösterdiği de elde edilen sonuçlar arasındadır. Salatalık bitkisine A ve B kompost sistemlerinin olumsuz etki gösterdiği görülmüştür. Sistem BC için de GI % değerleri sınırdadır. GI % değerlerinin hesaplanmasında kök uzunlukları da belirlenmektedir. Dolayısıyla hem kompost sıvısının hem de inokülasyonun kök uzunluklarına etkilerinin istatistiksel olarak belirlenmesi mümkün olmuştur. Sonuçlar salatalık bitkisi için yalnızca B mikroorganizması ile hazırlanan komposttan elde edilen sıvının kök uzunluğunu istatistiksel olarak azalttığını göstermektedir. İnoküle edilen tohumlarda A mikroorganizması düşük GI % değerlerinin elde edilmesine neden olmuştur. Bununla birlikte kök uzunluklarında istatistiksel bir değişimin olmaması tez kapsamında elde edilen önemli sonuçlar arasındadır.

Buğday bitkisinin sistemlere tepkisi salatalık bitkisinden oldukça farklıdır. Sonuçlar ikili sistemlerden elde edilen kompost sıvılarının salatalıkta herhangi bir etkiye neden olmazken, buğday bitkisinde toksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde salatalıkta tekli sistemlerin gözlemlenebilir bir toksik etkisi varken buğdayda tek mikroorganizma kullanılan sistemler yüksek GI% değerleri elde edilmiştir. Buğday kök uzunlukları da istatistiksel olarak azalmayı göstermektedir. Buğdayda üçlü sistemden elde edilen GI % değeri limitin üzerindedir. Bununla birlikte kök uzunluklarında istatistiksel bir azalma kaydedilmiştir. Her iki bitki için Sistem C ile hazırlanan kompost sıvısı ve inokülasyon sonucunda yüksek değerler elde edilmiştir. Bu sonuç C mikroorganizmasını ön plana çıkarmaktadır.

Buğday ve salatalık bitkilerinin kompost karışımlarına gösterdikleri tepkilerin mikroorganizmalardan ziyade kompost karışımlarında mikroorganizmaların performansı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tekli sistemlerde organik madde kayıpları ortalama % 40 olarak gerçekleşirken, ikili sistemlerde ortalama % 18'dir. Organik madde parçalanmasının büyük ölçüde tamamlandığı sistemlerde salatalık bitkisi hassasiyet göstermiştir.

Bu hassasiyetin organik maddeden değil, kompostlaşma sonucu açığa çıkan amonyaktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Roosta ve Schjoerring, 2007: 1933; Roosta ve Schjoerring, 2008: 1270). pH değerleri bilindiği üzere 15 günlük sürede artış göstermiştir. Sıcaklık performansları Sistem C haricinde termofilik evrenin 13-15 gün arasında sürdüğünü göstermiştir. Yüksek pH değerleri azot döngüsü sırasında amonyağın sistemden tam olarak uzaklaşmadığını göstermektedir. A ve B sistemlerde sıcaklık değerleri 13 gün süresince 35 °C'nin üzerinde kalmıştır. Bu durum amonyaktan nitrat oluşumunu büyük ölçüde azaltmaktadır. Bir başka deyişle amonyağın sistemlerden buharlaşma ve/veya nitrata dönüşüm ile uzaklaşan miktarının tekli sistemlerde düşük olabileceği düşünülmektedir. İkili sistemlerde organik madde kayıpları düşüktür. Dolayısıyla amonyak oluşumu düşük olduğundan salatalığın gösterdiği hassasiyet GI % değerlerine yansımaktadır.

Kompost karışımlardan elde edilen GI % değerleri buğday bitkisinin amonyak ile ilişkisinin salatalık ile taban tabana zıt olduğunu ortaya koymuştur. Buğday azotu kontrollü almaktadır. Bu nedenle azotun yavaş alımının mümkün olduğu amonyaklı gübreleri tercih etmektedir. Öngören tarafından yapılan bir çalışmada Amonyum nitrat ve amonyum sülfat gübrelerinin buğday gelişimine etkileri incelenmiştir. Sonuçlar azotun yavaş salındığı amonyum sülfat gübresi ile daha yüksek veriminin elde edildiğini göstermiştir (Öngören, 2013: 36).

Tekli sistemlerde buğday bitkisinin toksik etki göstermemiş olması amonyağa hassas olmamasından kaynaklanmaktadır. Öte yandan ikili sistemlerde organik madde kaybının düşük olması degradasyonun tam olarak gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu nedenle ikili sistemlerde buğday bitkisi ile elde edilen düşük GI % sonuçları buğdayın kompost degradasyon ürünlerine karşı savunmasız olduğunu ortaya koymuştur. Kompostlaşmanın tamamlanmaması sonucu karışımlarda çözünür tuz ve organik asit birikimleri olabilmektedir (Blewett ve ark., 2005: 67; Araujo ve Monteiro, 2005: 287).

Yapılan literatür araştırması buğday bitkisinin özellikle fenolik asitler varlığında toksik etkiye maruz kaldığını ortaya koymuştur (Ozores-Hampton, 1998: 939).

Benzer bir durumunun tez çalışması kapsamında incelenen tohumlarda da meydana geldiği ve kompostlaşma sırasında açığa çıkan düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin buğday bitkisinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

C kodlu mikroorganizma ile hazırlanan sistem tez kapsamında en sıradışı sonuçların elde edildiği sistemdir. Karışımın sıcaklığı sadece 1 gün süresince 55°C’de kalmıştır ve sanitasyon koşulunu ucu ucuna sağlayabilmiştir. Sistemin termofilik evrede kalma süresi kontrolle aynıdır ve diğer sistemlerden düşüktür. Buna rağmen kontrolün yaklaşık üç katı bir performans gösterdiği organik madde kayıplarından anlaşılmaktadır. Çimlenme indeks sonuçları her iki bitki (salatalık ve buğday) için de yüksek olan tek sistemdir. C kodlu mikroorganizma gübreden izole edilen diğer *Streptomyces* türlerinin çoğunu inhibe edebilmektedir. Kompostlaşma sırasında elde edilen düşük sıcaklık profili de bu bulguyu desteklemektedir. Salatalık için hassasiyet gözlenmemesi kompostlaşma sırasında nitrat oluşumunun da gerçekleşmiş olduğunu ortaya koymaktadır. Termofilik evrede yüksek sıcaklık değerlerine ulaşılması çoğu çalışmanın amacıdır. Ancak yüksek sıcaklıktan ziyade sanitasyon koşullarını sağlayabilecek yeterli sıcaklıklarda kompostlaşmanın devam ettirilmesi ve sürenin kısaltılması isteniyorsa amonyağın sistemden uzaklaştırılması veya amonyak oluşumunun yanında nitrat oluşumunun da teşvik edilmesi gerekmektedir. C mikroorganizması hem kısa sürede organik madde kaybını sağlayabilmiş hem de sistemin sıcaklığını düşük tutarak nitrat oluşumunun da gerçekleşmesini sağlayabilmiştir. Bu nedenle tez kapsamında en iyi organizma olarak seçilmiştir.

6. SONUÇ

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde mikroorganizmaların tek başına kullanımlarının organik madde degradasyonunu olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Denemelerde uygulanan mikroorganizma dozajları mikroorganizmanın ortamda baskın olabilmesi ve kompostlaşmanın gidişatını kontrol edebilmesi bakımından yeterlidir. Antagonistik etki testleri mikroorganizmaların aynı ortamda ve büyük ihtimalle aynı besiyeri için rekabete girdiğini göstermektedir. Bu durum kompostlaşmayı olumsuz etkilemiştir. 15 günlük deneme süresi sonunda kompost olgunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan çimlenme indeks testleri kompostlaşmanın özellikle tekli mikroorganizma kullanımına bağlı olarak büyük ölçüde tamamlandığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte nitrat oluşumu için termofilik evre sonrasında olgunlaşma evresinde karışımların bir süre dinlendirilmesinin ve nitrat oluşumu için beklenmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Kompost denemelerinde kullanılan büyük baş hayvan gübresi ve samandan oluşan sistemlerin başlangıçtaki organik madde miktarları % 30-40 arasında değişmiştir. Bu oranlar gübrenin en az 6 ay dinlendirildiğini göstermektedir. Buna rağmen termofilik evrede elde edilen yüksek sıcaklık değerleri mikroorganizmaların etkin olduklarını ortaya koymuştur.

Streptomyces izolatlarının kullanımı ile kompostlaşmanın hızlandırılabilmesi ve organik madde kaybının arttırılabileceği tez çalışmasında elde edilen en önemli sonuçtur.

Mikroorganizma seçiminde sıcaklık profilininin de etkili olduğu ölçümler sonucunda anlaşılmıştır. Sistem C için organik madde miktarlarında meydana gelen değişimler ve çimlenme indeks değerleri termofilik evrede yüksek sıcaklığın faydalı olabileceğini ancak bir gereklilik olmadığını göstermiştir. İnoküle edilen tohumlar ile yüksek GI % değerlerine ulaşılmış olması kompost sıvısında bitkilerin gelişimini inhibe edecek bir patojenin olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuç Sistem C ile elde edilen bulguları desteklemektedir.

Sistemler üzerinden genel bir değerlendirme yapıldığında öncelikle organik madde degradasyonunun tamamlanması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Düşük organik madde degradasyonuna bağlı olarak kompostlaşmanın tamamlanmadığı sistemlerde açığa çıkan, özellikle organik asit yapısındaki ara ürünler buğday gibi hassas bitkileri olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle tekli mikroorganizma kullanımı veya birbirinin üremesini inhibe etmeyen mikroorganizma gruplarının kullanılması önerilmektedir.

İkili sistemlerden özellikle Sistem BC'nin buğday üzerinde olumsuz etkisi gözlenmiştir. Sistem BC'den alınacak bir numune ile organik asit miktarlarında meydana gelen değişimler

kontrol sistemi ve tek mikroorganizmanın kullanıldığı sistemlerden alınacak numuneler ile karşılaştırılmalı olarak incelenmesi önerilmektedir. Organik asit miktarlarındaki değişim tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçları destekleyeceği düşünülmektedir. Tekli sistemlerden A ve C'nin 0. günden başlayarak toplam azot, amonyum azotu ve nitrat azot miktarlarında meydana gelen değişimlerin analiz edilmesi önerilmektedir.

Kompost karışımında kullanılacak mikroorganizmaların seçiminde ilk olarak karbon kaynağı kullanımına sonrasında enzim aktivitesine bağlı bir eliminasyon prosedürünün geliştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca enzim aktivite testlerinde nicel olarak salınan enzim miktarının ölçümüne bağlı olarak en etkin mikroorganizmanın belirlenmesinin, kompostlama sürecinde daha etkin bir mikroorganizma seçimini sağlayacağı düşünülmektedir. Bu şekilde uygulanacak eliminasyon prosedürleri ile daha etkili mikroorganizmaların belirlenebileceği öngörülmüştür.

Kompost karışımında kullanılan bileşenler mutlaka çeşitlendirilmeli ve bu kullanılan karışımları degrade edebilme özellikleri açısından uygun mikroorganizmaların seçimi ve performansları da daha detaylı incelenmelidir. Elde edilen kompostların özellikle farklı buğday türlerinin gelişimi üzerine etkilerini belirleyebilmek amacıyla denenmesi önerilmektedir. Ahmet (Bey) cinsi buğday ülkemize özgü ve koruma altında olan bir türdür. Bu türün veriminin kompost kullanımına bağlı olarak artırılabilmesi ülkemiz için önemli bir kazanım olacaktır.

Bu nedenle Ahmet cinsi buğdayı da içeren uzun süreli saha denemelerinin yapılması önerilmektedir. Buğday dışında farklı bitkiler üzerinde de denemeler yapılarak kompostun kullanım alanlarının genişletilmesi sağlanabilir.

Tezin amacı kompostlamayı hızlandırabilecek termofilik aktinobakterilerin izolasyonu ve seçimi sonrasında kompostlama üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Bu kapsamda yapılan izolasyon çalışmaları ile elde edilen ve 16S rRNA analizleri ile 15-18 nükleotit farklılıklarına sahip olan ve *Streptomyces* izolatlarında polifazik yöntemler kullanılarak tanımlanması tez sonrasında yapılacak çalışmalar ile sağlanacaktır.

KAYNAKÇA

- Abdulla, J. M., Rose, S. P., Mackenzie, A. M., & Pirgozliev, V. R.** (2017). Feeding value of field beans (*Vicia faba* L. var. minor) with and without enzyme containing tannase, pectinase and xylanase activities for broilers. *Archives of animal nutrition*, 71(2), 150-164.
- Aehle, W. (Ed.).** (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. John Wiley & Sons.
- Aggelides, S. M., & Londra, P. A.** (2000). Effects of compost produced from town wastes and sewage sludge on the physical properties of a loamy and a clay soil. *Bioresource technology*, 71(3), 253-259.
- Amerah, A. M., Romero, L. F., Awati, A., & Ravindran, V.** (2017). Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of broilers fed corn/soy diets. *Poultry science*, 96(4), 807-816.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P.** (2016). An introduction to actinobacteria. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. Intechopen.
- Anderson A. S., & Wellington, E. M.** (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 794-814.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T.** (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 409-415.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., & Balasubramanian, T.** (2012). Purification and characterization of thermostable alkaline cellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01 by utilizing cellulosic wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 3(3), 305-310.
- Aquino, A. C. M. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. L. T. M.** (2003). Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(4), 323-328.
- Attwell, R. W., & Colwell, R. R.** (1982). Use of epifluorescence microscopy in studies of the germination and recovery of thermoactinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), 478-482.
- Avcıoğlu, A., Türker, U., Atasoy, Z. ve Koçtürk, D.** (2011). Tarımsal Kökenli Yenilenebilir Enerjiler Biyoyakıtlar. Nobel yayınları, 493 s., Ankara.
- Avnimelech, Y., Eilat, R., Porat, Y., & Kottas, P. A.** (2004). Factors affecting the rate of windrow composting in field studies. *Compost science & utilization*, 12(2), 114-118.
- Awasthi, M. K., Pandey, A. K., Khan, J., Bundela, P. S., Wong, J. W., & Selvam, A.** (2014). Evaluation of thermophilic fungal consortium for organic municipal solid waste composting. *Bioresource technology*, 168, 214-221.
- Ball, A. S., & McCarthy, A. J.** (1989). Production and properties of xylanases from actinomycetes. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 439-444.
- Baloğlu C.M., Bayraç A.T., Sadi G. ve Bayraç C.,** 2012. *Biyoinformatik. içinde: Karataş M., Ed. Moleküler Biyoloji* (1. Baskı, Bölüm 17). Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 311-339.
- Baltz, R. H.** (2007). Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe-American Society For Microbiology*, 2(3), 125.
- Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blažič, M., Horvat, M., & Cullum, J.** (2013). Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome announcements*, 1(4).
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P.** (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Baştürk, A.** (1976). Kompostlamaya Tesir Eden Faktörler ve Koagülasyon Maddelerinin Reaksiyona Etkisi. Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul Devlet Mühendislik Mimarlık Akademisi Matbaası, 207 s, İstanbul.
- Battistuzzi, F. U., & Hedges, S. B.** (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26(2), 335-343.

- Bayer, Y.** (2008). Ayır Toplamının Kompostlama Üzerindeki Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, 113 ss, İstanbul.
- Beaudin, N., Caron, R. F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L., & Ramsay, B.** (1996). Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Science & Utilization*, 4(2), 37-45.
- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., & Hoondal, G. S.** (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 24(6), 396-402.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S.** (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3-4), 326-338.
- Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G., & Ceccanti, B.** (1999). Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource technology*, 67(3), 297-303.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., & Bateman, A.** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885), 141-147.
- Bentley, S. D., Maiwald, M., Murphy, L. D., Pallen, M. J., Yeats, C. A., Dover, L. G., & von Herbay, A.** (2003). Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*. *The Lancet*, 361(9358), 637-644.
- Berd, D.** (1973). Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Applied microbiology*, 25(4), 665-681.
- Bérdy, J.** (1980). *Handbook of antibiotic compounds*. Crc Press.
- Bérdy, J.** (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385-395.
- Bergquist, P. L., Gibbs, M. D., Morris, D. D., Thompson, D. R., Uhl, A. M., & Daniel, R. M.** (2001). Hyperthermophilic xylanases. *Methods in enzymology*, 330, 301-319.
- Bergquist, P. L., Gibbs, M. D., Morris, D. D., Te'o, V. J., Saul, D. J., & Morgan, H. W.** (1999). Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(2), 99-110.
- Bernal, M. P., Alburquerque, J. A., & Moral, R.** (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource technology*, 100(22), 5444-5453.
- Bhat, M. K., & Bhat, S.** (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*, 15(3-4), 583-620.
- Bhattacharyya, B. K., Pal, S. C., & Sen, S. K.** (1998). Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1. 5: Cultural effect. *Revista de microbiologia*, 29(3).
- Bian, R., Sun, Y., Li, W., Ma, Q., & Chai, X.** (2017). Co-composting of municipal solid waste mixed with matured sewage sludge: The relationship between N₂O emissions and denitrifying gene abundance. *Chemosphere*, 189, 581-589.
- Blanco, J., Coque, J. J. R., Velasco, J., & Martin, J. F.** (1997). Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo- β -1, 4-xylanase of *Thermomonospora alba* UL JB1 with cellulose-binding ability. *Applied microbiology and biotechnology*, 48(2), 208-217.
- Book, A. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Takasuka, T. E., Wendt-Pienkowski, E., Doering, D. T., & Currie, C. R.** (2016). Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. *PLoS biology*, 14(6), e1002475.
- Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., & Wallace, R. J.** (2006). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 259-282.
- Buchanan, R. E.** (1917). Studies in the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the schizomycetes. *Journal of Bacteriology*, 2(2), 155.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G.** (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403.

- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., & Sultan, M. T.** (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 22-31.
- Camcı Çetin, S., Ekinci, K. ve Haktanır, K.,** (2004). Kompost yapım tekniği. Türkiye 3. *Ulusal Gübre Kongresi*, Ed. Karaman, M.R. ve Brohi, A.R., 11-13 Ekim 2004, Tokat. pp 1313 – 1348.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K.** (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D.** (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.
- Chater, K. F., & Losick, R.** (1997). Mycelial life style of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its relatives. *Bacteria as multicellular organisms*, 149-182.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J.** (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology advances*, 33(6), 745-755.
- Chun, J., & Goodfellow, M.** (1995). A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 240-245.
- Cobos, A., & Estrada, P.** (2003). Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 810-818.
- Cockell, C. S., Kelly, L. C., & Marteinsson, V.** (2013). Actinobacteria an ancient phylum active in volcanic rock weathering. *Geomicrobiology Journal*, 30(8), 706-720.
- Coenye, T., Gevers, D., De Peer, Y. V., Vandamme, P., & Swings, J.** (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS microbiology reviews*, 29(2), 147-167.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G.** (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.
- Crabb, W. D., & Mitchinson, C.** (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, 15(9), 349-352.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., & Ousley, M. A.** (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3899-3905.
- Crawford, S. L., Johnson, G. E., & Goetz, F. E.** (1993). The potential for bioremediation of soils containing PAHs by composting. *Compost Science & Utilization*, 1(3), 41-47.
- Cross, T.** (1982). A continuing source of new metabolites. *Dev. Ind. Microbiol*, 23, 1-8.
- Csiszar, E., Urbánszki, K., & Szakacs, G.** (2001). Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 1065-1072
- Çetin, S.C., K. Ekinci ve K. Haktanır** (2004). Kompost Yapım Tekniği. 3. *Ulusal Gübre Kongresi*, Tokat, 11-13 Ekim 2004.
- Çil E.** (2011). Farklı habitatlardan izole edilen *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia* ve *Streptomyces* suşlarının moleküler taksonomisi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Çoşkun, A.** (2010). Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Daniels, L., Hanson, R. S., & Phillips, J. A.** (2007). Chemical analysis. In *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition* (pp. 462-503). American Society of Microbiology.
- Das, S., Lyla, P. S., & Khan, S. A.** (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(2), 166-177.
- Dastager, S. G., Li, W. J., Dayanand, A., Tang, S. K., Tian, X. P., Zhi, X. Y., & Jiang, C. L.** (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African journal of biotechnology*, 5(11).
- Dauphin, R. D., Roblain, D., Guiro, A. T., & Thonart, P.** (2005). Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), 409-421.

- De Azeredo, L. A. I., Freire, D. M. G., Soares, R. M. A., Leite, S. G. F., & Coelho, R. R. R.** (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3-4), 354-358.
- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M.** (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(5), 466-471.
- De Mot, R., & Verachtert, H.** (1987). Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *European journal of biochemistry*, 164(3), 643-654.
- Dede, A., Güven, K., & Şahin, N.** (2020). Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. *Microbial Pathogenesis*, 104134.
- Deeble, V., Fazeli, M., Cove, J., & Baumberg, S.** (2005). Effects of temperature on production of antibiotics in *Streptomyces griseus*. *Journal of antibiotics*, 171-178.
- Demain, A. L., & Solomon, N. A.** (1981). In industrial microbiology and the advent of genetic engineering. *Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco*, 3-14.
- Demirkan, E. S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., & Utsumi, S.** (2005). α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40(8), 2629-2636.
- Diaz, M. J., Eugenio, M. E., Jimenez, L., Madejon, E., & Cabrera, F.** (2003). Modelling vinasse/cotton waste ratio incubation for optimum composting. *Chemical Engineering Journal*, 93(3), 233-240.
- Diaz, L. F., & Savage, G. M.** (2007). Factors that affect the process. *Compost science and technology*, 1.
- Edwards, C.** (1993). Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(2-3), 161-179.
- Ekkelenkamp, M. B., de Jong, W., Hustinx, W., & Thijsen, S.** (2004). *Streptomyces thermovulgaris* bacteremia in Crohn's disease patient. *Emerging infectious diseases*, 10(10), 1883.
- Ensign, J. C.** (1992). Introduction to the actinomycetes. *The prokaryotes*, 1, 811-815.
- Epstein, E.** (1996). *The science of composting*. CRC press.
- Epstein, E.** (2011). Industrial composting, *environmental engineering and facilities management*. CRC Press.
- Felsenstein, J.** (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.
- Finstein, M. S., & Morris, M. L.** (1975). Microbiology of municipal solid waste composting. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 19, pp. 113-151). Academic Press.
- Flärdh, K., & Buttner, M. J.** (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtshuk Jr, P.** (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 166-170.
- Freeman, S., & Herron, J. C.** (1999). Evrimisel Analiz, ed. B. Çıplak, Basıbüyük. H. H., Karaytuğ. S. ve Gündüz. İ., Palme Yayıncılık.
- Fukara G.,** (2007). Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fukushi, S., Kojima, S., Takai, R., Hoshino, F. B., Oka, T., Takeda, N., & Kageyama, T.** (2004). Poly (A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *Journal of virology*, 78(8), 3889-3896.
- Gadkari, D., Schricker, K., Acker, G., Kroppenstedt, R. M., & Meyer, O.** (1990). *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO₂-and H₂-oxidizing obligate chemolithoautotroph. *Applied and environmental microbiology*, 56(12), 3727-3734.
- Gajalakshmi, S., & Abbasi, S. A.** (2008). Solid waste management by composting: state of the art. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(5), 311-400.

- Gao, B., & Gupta, R. S.** (2005). Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2401-2412.
- Gardner, G.** (1998). Organik Atıkların Geri Dönüşümü. *Dünyanın Durumu. Türkiye Erozyonla Mücadele, Agaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayınları*, 23, 154-182.
- Genois, C.** 1995. Kompost Tesisleri, *Türk-Kanada Katı Atık Yönetimi Sempozyumu*, iller Bankası Genel Müdürlüğü, 17-18 Ekim, Ankara.
- George, M., George, G., & Hatha, A. M.** (2010). Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28(1), 52-57.
- Georis, J., Giannotta, F., De Buyl, E., Granier, B., & Frère, J. M.** (2000). Purification and properties of three endo- β -1, 4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and microbial technology*, 26(2-4), 178-186.
- Gessesse, A.** (1998). Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3533-3535.
- Gilbert, H. J., & Hazlewood, G. P.** (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Microbiology*, 139(2), 187-194.
- Giri, J. G., Newton, R. C., & Horuk, R.** (1990). Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants. Evidence for soluble interleukin-1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17416-17419.
- Golueke, C. G.** (1991). Principles of composting. *The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting. The JG Press Inc., Pennsylvania, USA*, 14-27.
- Goodfellow, M.** (1989). Search and discovery of industrially significant actinomycetes. *Microbial products: new approaches*.
- Goodfellow, M., & Haynes, J. A.** (1984). Actinomycetes in marine sediments. *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*, 453-472.
- Goodfellow, M., & O'Donnell, A. G.** (1994). Chemosystematics: current state and future prospects. *Chemical methods in prokaryotic systematics*, 1-20.
- Goodfellow, M., & Simpson, K. E.** (1987). Ecology of *streptomyces*. *Front Appl Microbiol*, 2, 97-125.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T.** (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 37(1), 189-216.
- Goodfellow, M., Lacey, J., & Todd, C.** (1987). Numerical classification of thermophilic *streptomyces*. *Microbiology*, 133(11), 3135-3149.
- Graves, R. E., Hattermer Gwendolyn, M., & Stettler, D.** (2000). Composting in Part 637: Environmental Engineering National Engineering Handbook. United States Department of Agriculture. *Natural Resources Conservation Service*.
- Gulve, R. M., & Deshmukh, A. M.** (2012). Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(3).
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B.** (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Gupta, V. K. (Ed.)**. (2016). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Aspergillus system properties and applications*. Elsevier.
- Gül-Güven, R.** (2007). Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*'nin β -galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, DİYARBAKIR.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K.** (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Halistürk, İ., Topcu, B., & Yoldaş, S.** (2006). Atıkların arıtılmasında mikroorganizmaların kullanılması. *Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği*.
- Hameş-Kocabaş, E. E., & Uzel, A.** (2007). Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments. *Annals of microbiology*, 57(1), 71.

- Hasani, A., Kariminik, A., & Issazadeh, K.** (2014). Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities.
- Hassan, A. Ul., Wellington, E.M.,** (2009). Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology 3th edition by Moselio Schaechter*. 26-44, Oxford.
- Haug, R. T.** (1980). Compost Engineering Principles and Praticce. *Ann Arbor Science. ann arbor*.
- Haug, R. T.** (1993). Kinetics of heat inactivation. *The Practical Handbook of Compost Engineering. London: Lewis Publishers*, 161-203.
- Herbert, R. A.** (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in biotechnology*, 10, 395-402.
- Hettiarachi, S., & Penninckx, M. J.** (1990). On the distribution of soil and rhizosphere actinomycetes of a poplar plantation. *Symbiosis*.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., & Lumbsch, H. T.** (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H. G., Zhuang, L., Lin, H. P., & Ruan, J. S.** (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine drugs*, 7(1), 24-44.
- Horikoshi, K.** (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 735-750.
- Hrmová, M., Biely, P., Vršanská, M., & Petráková, E.** (1984). Induction of cellulose-and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. *Archives of microbiology*, 138(4), 371-376.
- Hütter, R., Eckhardt, T., Goodfellow, M., Williams, S. T., & Mordarski, M.** (1988). Actinomycetes in Biotechnology.
- Iqbal, H. M., Asgher, M., Ahmed, I., & Hussain, S.** (2010). Media optimization for hyper-production of carboxymethyl cellulase using proximally analyzed agroindustrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF. *development*, 25, 37.
- İnce, E.,** (2006). Ksılanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jagadabhi, P. S., Wani, S. P., Kaushal, M., Patil, M., Vemula, A. K., & Rathore, A.** (2019). Physico-chemical, microbial and phytotoxicity evaluation of composts from sorghum, finger millet and soybean straws. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8(3), 279-293.
- James, P. D., & Edwards, C.** (1991). Effect of carbon source and oxidative metabolism on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. *Current Microbiology*, 23(4), 227-232.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D. V. R., & Narasimha, G.** (2014). Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. *Biotechnology research international*.
- Jaralla, E. M., Al-Dabbagh, N. N., Hameed, N., & Abdul-Hussain, N.** (2014). Screening for enzymatic production ability and antimicrobial activity of actinomycetes isolated from soil in Hillah/Iraq. *Int. J. Pharm. Biol. Sci*, 9, 42-47.
- Jeffrey, L. S. H.** (2008). Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7(20).
- Jeffrey, L. S. H., Sahilah, A. M., Son, R., & Tosiah, S.** (2007). Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. *Journal of tropical agriculture and food science*, 35(1), 159.
- Jeffries, T.** (1981). Conserved Motifs in Xylanases for Pulp Bleaching. *USDA, Forest Service*.
- Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., McHugh, T. D., & Kibbler, C. C.** (2012). Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of medical microbiology*, 61(4), 483-488.
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P.** (2013). Prokaryote characterization and identification. *The Prokaryotes: Prokaryotic biology and symbiotic associations*, E. Rosenberg, EF DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds, 1, 123-47.

- Keener, H. M., Ekinci, K., & Michel, F. C.** (2005). Composting process optimization—using on/off controls. *Compost science & utilization*, 13(4), 288-299.
- Kekuda, P. T. R., Onkarappa, R., & Jayanna, N. D.** (2015). Characterization and antibacterial activity of a glycoside antibiotic from *Streptomyces variabilis* PO-178. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(4), 116-121.
- Khoo, S. L., Amirul, A. A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., & Azizan, M. N.** (1994). Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia microbiologica*, 39(5), 392-398.
- Kıran, Ö. E., & Çömlekçioğlu, U.** (2003). Zeytinli İlçası (Kahramanmaraş)’ndan termofil alkalifilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2), 41-48.
- KIRAN, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., & Arikan, B.** (2005). Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12. *Turkish Journal of Biology*, 29(2), 99-103.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A.** (2000). *Practical streptomyces genetics* (Vol. 291). Norwich: John Innes Foundation.
- Kikani, B. A., Shukla, R. J., & Singh, S. P.** (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1000-1007.
- Kikani, B. A., Shukla, R. J., & Singh, S. P.** (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1000-1007.
- Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D. E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., & Goodfellow, M.** (1999). Classification of thermophilic *Streptomyces*, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 7-17.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., & Won, S.** (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(3), 716-721.
- Kim, S. B., Falconer, C., Williams, E., & Goodfellow, M.** (1998). *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydrotrophic species from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(1), 59-68.
- Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, R. M., Müller, R. J., & Deckwer, W. D.** (1998). Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Applied and environmental microbiology*, 64(5), 1731-1735.
- Koch, A. L.** (2003). Were Gram-positive rods the first bacteria? *Trends in Microbiology*, 11(4), 166-170.
- Koçak, F.Ö.** (2011). Bazı *Nocardioform* izolatların 16S rRNA, rpoB ve gyrB gen dizi analizleri ile moleküler sistematigi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi
- Korn-Wendish, F.** (1992). The family *streptomycetaceae*. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Identification, Applications*.
- Krishna, S. H., Rao, K. S., Babu, J. S., & Reddy, D. S.** (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering*, 22(5), 467-470.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A.** (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A.** (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res* 2011: 1–10.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M.** (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 23(4), 411-456.
- Kumar, N., Singh, R. K., Mishra, S. K., Singh, A. K., & Pachouri, U. C.** (2010). Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2(2), 12.
- Kumar, R., & Wyman, C. E.** (2009). Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biotechnology progress*, 25(3), 807-819.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K.** (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kurakake, M., Ueki, M., Hashimoto, S., & Komaki, T.** (1997). Adsorption of α -amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. *Carbohydrate polymers*, 34(1-2), 55-59.
- Kurtuluş, M.** (2010). Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T. C., Terashita, T., & Ueda, M.** (2003). Purification and some properties of α -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, 44(4), 311-317.
- Kutzner, K. J.** (1986). The family *Streptomycetaceae* In: Starr, MP, Stolp, H., Triper, HG, Balows, A. and Schlegel, HG (eds). *The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*.
- Külcü, R.** (2002). Bazı Tarımsal Atıkların Kompostlaştırılmasında Optimum Çevresel Şartların Belirlenmesi. Akdeniz Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
- Külcü, R.** (2007). Tarımsal Atıkların Kompostlaştırılmasında Kullanılabilecek Alternatif Sistemlerin İşlem Başarısı ve Uygulama Alanlarının Belirlenmesi. Akdeniz Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Antalya.
- Labes, A., Karlsson, E. N., Fridjonsson, O. H., Turner, P., Hreggvidson, G. O., Kristjansson, J. K., & Schönheit, P.** (2008). Novel members of glycoside hydrolase family 13 derived from environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1914-1921.
- Lam, K. S.** (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 245-251.
- Lane, D. J.** (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
- Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G., & Lee, L. H.** (2017). The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (Pyricularia oryzae). *Frontiers in microbiology*, 8, 3.
- Lechevalier, H., & Lechevalier, M. P.** (1965, January). Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. In *Annales De L Institut Pasteur* (Vol. 108, No. 5, Pp. 662-673). 21 Street Camille Desmoulins, Issy, 92789 Moulinaux Cedex 9, France: Masson Editeur.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Ab Mutalib, N. S., Yin, W. F., & Chan, K. G.** (2014). *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 3297-3306.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W. F., & Chan, K. G.** (2014). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *The scientific world journal*, 2014.
- Lei, D., Huang, W., & Wang, X.** (2011). Effect of moisture content of substance on fermentation and heat production of cattle manure in aerobic composting. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 27(5), 54-57.
- Lepp, P. W., & Relman, D. A.** (2004). Molecular phylogenetic analysis. *Molecular microbiology. Diagnostic principles and practice*, 161-180.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C.** (2016). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. Rijeka, Croatia: InTech*, 59-86.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X.** (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- Li, W., Zhang, W. W., Yang, M. M., & Chen, Y. L.** (2008). Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, 40(2), 195-201.
- Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J. S., & Eriksson, K. E. L.** (2000). Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 89-94.
- Liang, C., Das, K. C., & McClendon, R. W.** (2003). The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource technology*, 86(2), 131-137.
- Linko, I. C. P., Mälkki, Y., Olkku, J., & Larinkari, J.** (1980). Food Process Engineering, Vol. 2, Enzyme Engineering in Food Processing. *Appl. Sci. Publ., London*, 27-39.

- Lleó, T., Albacete, E., Barrena, R., Font, X., Artola, A., & Sánchez, A.** (2013). Home and vermicomposting as sustainable options for biowaste management. *Journal of cleaner production*, 47, 70-76.
- Locci, R.** (1989). *Streptomyces* and related genera. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2451-2508.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B.** (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 1-28). Springer, New York, NY.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S.** (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- MacFaddin, J. F.** (2000). Deoxyribonuclease (DNase) and thermonuclease (Tnase) tests. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd ed.*, ed. by MacFaddin, JF, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 136-159.
- Mahajan, G. B., & Balachandran, L.** (2017). Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochemical Pharmacology*, 134, 35-41.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K.** (2013). Retracted: marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives.
- Mann, J.** (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Natural product reports*, 18(4), 417-430.
- Mccarthy, A. J., & Williams, S. T.** (1990). 17 Methods for Studying the Ecology of Actinomycetes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 22, pp. 533-563). Academic Press.
- Meenambal, T., Uma, R. N., & Saravannan, S.** (2003). Study on biodegradation of fruit waste aerobic composting. *Department of Geography, University of Madras and Faculty of Environmental Studies, York University*, 441-450.
- Menzel, C., Lerch, T., Schneider, K., Weidemann, R., Tollnick, C., Kretzmer, G., & Schüger, K.** (1998). Application of biosensors with an electrolyte isolator semiconductor capacitor (EIS-CAP) transducer for process monitoring. *Process Biochemistry*, 33(2), 175-180.
- Meyers, P. R., Porter, D. S., Omorogie, C., Pule, J. M., & Kwetane, T.** (2003). *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 801-805.
- Michel, F. C., Reddy, C. A., & Forney, L. J.** (1995). Microbial degradation and humification of the lawn care pesticide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid during the composting of yard trimmings. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2566-2571.
- Michener, C. D., & Sokal, R. R.** (1957). A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution*, 11(2), 130-162.
- Minotto¹, E., Milagre¹, L. P., Oliveira, M. T., & Van Der Sand¹, S. T.** (2014). Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*, 5(2).
- Mizrabi-Man, O., Davenport, E. R., & Gilad, Y.** (2013). Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS one*, 8(1), e53608.
- Moreira, F. G., Lenartovicz, V., & Peralta, R. M.** (2004). A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamarii*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(1), 29-35.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P., & Santana, M. H. A.** (2013). A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization, 1*.
- Mount, D. W.** (2001). Bioinformatics Cold Spring Harbor.
- Muthuvelayudham, R., & Viruthagiri, T.** (2010). Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3(2), 97-104.
- Nagar, S., Gupta, V. K., Kumar, D., Kumar, L., & Kuhad, R. C.** (2010). Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(1), 71-83.

- Neelakanta, G., & Sultana, H.** (2013). The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. *Microbiology insights*, 6, MBI-S10819.
- Neklyudov, A. D., Fedotov, G. N., & Ivankin, A. N.** (2006). Aerobic processing of organic waste into composts. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(4), 341-353.
- Nidetzky, B., & Claeyssens, M.** (1994). Specific quantification of *Trichoderma reesei* cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase–cellulose binding studies. *Biotechnology and bioengineering*, 44(8), 961-966.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G.** (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 711-729.
- Nigam, P., & Singh, D.** (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778.
- Niu, G., Chater, K. F., Tian, Y., Zhang, J., & Tan, H.** (2016). Specialised metabolites regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 554-573.
- Odibo, F. J. C., & Ulbrich-Hofmann, R.** (2001). Thermostable α -Amylase and Glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. *Acta biotechnologica*, 21(2), 141-153.
- O'Donnell, A. G., Falconer, C., Goodfellow, M., Ward, A. C., & Williams, E.** (1993). Biosystematics and diversity amongst novel carboxydophilic actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64(3-4), 325-340.
- Ohta, Y., & Ikeda, M.** (1978). Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(3), 487-491.
- OKAMI, Y.** (1988). Search and discovery of new antibiotics. *Actinomycetes in biotechnology.*, 33-67.
- Oksanen, J., Ahvenainen, J., & Home, S.** (1985, January). Microbial cellulase for improving filterability of wort and beer. In *Journal Of The Institute Of Brewing* (Vol. 91, No. 3, Pp. 130-130). 33 Clarges Street, London, England W1y 8ec: Inst Brewing.
- Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A.** (2009). Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine drugs*, 7(2), 210-248.
- Onwosi, C. O., Igbokwe, V. C., Odimba, J. N., Eke, I. E., Nwankwoala, M. O., Iroh, I. N., & Ezeogu, L. I.** (2017). Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 190, 140-157.
- Oskay, A. M., Üsame, T., & Cem, A.** (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 3(9), 441-446.
- Otajewwo, F. D., & Aluyi, H. S. A.** (2011). Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. *Modern Applied Science*, 5(3), 141.
- Öztürk, İ., Demir, İ., Altınbaş, M., Arıkan, O. A., Çiftçi, T., Çakmak, İ., Öztürk, L., Yıldız, Ş., Kiriş, A.,** (2015). *Kompost El Kitabı*. İSTAÇ A.Ş. Teknik Kitaplar Serisi 1, 353s, İstanbul
- Öztürk, M., & Bildik, B.** (2005). Hayvan çiftliklerinde kompost üretimi. *Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara*, 6-8.
- Öztürk, M.H.** (2004). Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated Bacillus Strains, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Öztürk, Ö.** (1999). *Anaerobik Biyoteknoloji ve atık arıtımındaki uygulamaları*. Su Vakfı Yayınları.
- Padmavathi, T., Nandy, V., & Agarwal, P.** (2012). Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*. *European Journal of Experimental Biology*, 2(4), 1161-1170.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., & Suh, J. W.** (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9621-9636.
- Pampuro, N., Bisaglia, C., Romano, E., Brambilla, M., Foppa Pedretti, E., & Cavallo, E.** (2017). Phytotoxicity and chemical characterization of compost derived from pig slurry solid fraction for organic pellet production. *Agriculture*, 7(11), 94.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R.** (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.

- Petrova, D., & Vlahov, S.** (2007). Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21e–producer of thermostable collagenase. *Journal of Culture Collections*, 5(1), 3-9.
- Pietra, F.** (1997). Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Natural product reports*, 14(5), 453-464.
- Pimentel-Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., & Hentschel, U.** (2010). Antiparasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine drugs*, 8(2), 373-380.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S.** (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Porter, T. M., & Golding, G. B.** (2012). Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: classification method, primer choice, and error. *PLoS One*, 7(4), e35749.
- Praveen Kumar, P., Preetam Raj, J. P., Nimal Christhudas, I. V. S., Sagaya Jansi, R., Murugan, N., Agastian, P., & Ali Alharbi, S.** (2015). Screening of actinomycetes for enzyme and antimicrobial activities from the soil sediments of Northern Tamil Nadu, South India. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(1), 58-70.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E.** (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 1088-1092.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V.** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Rasapoor, M., Nasrabadi, T., Kamali, M., & Hoveidi, H.** (2009). The effects of aeration rate on generated compost quality, using aerated static pile method. *Waste Management*, 29(2), 570-573.
- Rashid, S. S., Alam, M. Z., Karim, M. I. A., & Salleh, M. H.** (2009). Optimization of the nutrient supplements for cellulase production with the basal medium palm oil mill effluent. *World Acad. Sci. Eng. Technol*, 60, 809-815.
- Renner, M. K., Shen, Y. C., Cheng, X. C., Jensen, P. R., Frankmoelle, W., Kauffman, C. A., & Clardy, J.** (1999). Cyclomarins A–C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *Journal of the American Chemical Society*, 121(49), 11273-11276.
- Richter, G.** (1990). Handbook of Amylases and Related Enzymes. Edited by the Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press, Oxford 1988. 274 pp., with 57 Figures and 102 Tables. ISBN 0-08-036141-2. Hardcover DM 152,-. *Starch-Stärke*, 42(8), 325-325.
- Rynk, R., Van de Kamp, M., Willson, G. B., Singley, M. E., Richard, T. L., Kolega, J. J., & Hoitink, H. A.** (1992). *On-Farm Composting Handbook (NRAES 54)*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES).
- Sacramento, D. R., Coelho, R. R. R., Wigg, M. D., Linhares, L. F. D. T. L., dos Santos, M. G. M., Semêdo, L. T. D. A. S., & da Silva, A. J. R.** (2004). Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 225-229.
- Saddler, J. N.** (1986). Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. *Microbiol. Sci*, 3(3), 84-87.
- Saha, B., Bothast, R., & Jordan, D.** (2009). Enzymes, Industrial. *Encyclopedia of Microbiology*, 281-294.
- Sahin, N.** (1995). *Selective isolation, characterisation and classification of novel thermotolerant streptomyces* (Doctoral dissertation, University of Newcastle upon Tyne).
- Saini, A., Aggarwal, N. K., & Yadav, A.** (2016). Cellulolytic potential of actinomycetes isolated from different habitats. *Biosciences and Bioengineering*, 4, 88-94.
- Saitou, N., & Imanishi, T.** (1989). Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree.
- Saitou, N., & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

- Sancar, P. Y.** (2017). Türkiye’de Yetişen *Anthriscus Pers.* (Apiaceae) Türlerinin Genetik Yapısının ve Filogenetik Akralılık İlişkilerinin Kloroplast Genomunun Kodlanmayan “trn” Bölgelerine Göre Araştırılması, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ.
- SARGIN, S., & ÖNGEN, G.** (2003). Kanatlı yemi katkı olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(3).
- Sarıkaya, E.** (1995). α -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., Srinivas, V., & Gopalakrishnan, S.** (2016). Plant growth-promoting actinobacteria on chickpea seed mineral density: an upcoming complementary tool for sustainable biofortification strategy. *3 Biotech*, 6(2), 138.
- Schleifer, K. H.** (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.
- Schumacher, R. W., Talmage, S. C., Miller, S. A., Sarris, K. E., Davidson, B. S., & Goldberg, A.** (2003). Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. *Journal of natural products*, 66(9), 1291-1293.
- Sembing, L.** (2000). Selective isolation and characterisation of streptomycetes associated with the rhizosphere of the tropical legume, *Paraserianthes falcataria (L) Nielsen* (Doctoral dissertation, University of Newcastle upon Tyne).
- Sembing, L., & Goodfellow, M.** (2008). Ecological approach to unravel *Streptomyces* diversity as an unsurpassed sources of natural bioactive products. *Microbiology Indonesia*, 2(2), 1-1.
- Sentaosa, E., & Fournier, P. E.** (2013). Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 790-795.
- Shallom, D., & Shoham, Y.** (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 219-228.
- Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M.** (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 801-832.
- Sharma, P., Kalita, M. C., & Thakur, D.** (2016). Broad spectrum antimicrobial activity of forest-derived soil actinomycete, *Nocardia sp.* PB-52. *Frontiers in microbiology*, 7, 347.
- Sharma, V. K., Caudatelli, M., Fortuna, F., & Cornacchia, G.** (1997). Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting. *Energy Conversion and Management*, 38(5), 453-478.
- Singh, G. B.** (2015). Fundamental of bioinformatics and computational biology. *Springer*.
- Singh, S. P., Shukla, R. J., & Kikani, B. A.** (2013). Molecular diversity and biotechnological relevance of thermophilic actinobacteria. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology* (pp. 459-479). Springer, Dordrecht.
- Sneath, P. H. A.** (1993). *Handbook of new bacterial systematics* (pp. 3-56). M. Goodfellow, & A. G. O'Donnell (Eds.). San Diego, CA: Academic Press.
- Sneath, P. H. A.** (1993). *Handbook of new bacterial systematics* (pp. 3-56). M. Goodfellow, & A. G. O'Donnell (Eds.). San Diego, CA: Academic Press.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R.** (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Song, J., Weon, H. Y., Yoon, S. H., Park, D. S., Go, S. J., & Suh, J. W.** (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomyces spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS microbiology letters*, 202(1), 97-102.
- Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A., & Donadio, S.** (2000). Multiple peptide synthetase gene clusters in actinomycetes. *Molecular and General Genetics*, 264(3), 213-221.
- Sousa, C. D. S., Soares, A. C. F., & Garrido, M. D. S.** (2008). Characterization of *streptomycetes* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*, 65(1), 50-55.
- Sprusansky, O., Stirrett, K., Skinner, D., Denoya, C., & Westpheling, J.** (2005). The bkdR gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *Journal of bacteriology*, 187(2), 664-671.

- Srivibool, R., Jaidee, K., Sukchotiratana, M., Tokuyama, S., & Pathom-Aree, W.** (2010). Taxonomic characterization of *Streptomyces* strain CH54-4 isolated from mangrove sediment. *Annals of microbiology*, 60(2), 299-305.
- Stackebrandt, E.** (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152-155.
- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., & Sundh, I.** (2007). Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*, 158(7), 617-624.
- Stelmachowski, M., Jastrzębska, M., & Zarzycki, R.** (2003). In-vessel composting for utilizing of municipal sewage-sludge. *Applied energy*, 75(3-4), 249-256.
- Stoffella, P. J., & Kahn, B. A. (Eds.).** (2001). *Compost utilization in horticultural cropping systems*. CRC press.
- Subramani, R., & Aalbersberg, W.** (2012). Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research*, 167(10), 571-580.
- Suhre, K., & Claverie, J. M.** (2003). Genomic correlates of hyperthermostability, an update. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17198-17202.
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A.** (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges.
- Sunna, A., & Antranikian, G.** (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 17(1), 39-67.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M., & Antranikian, G.** (1997). Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 1(1), 2-13.
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Manivasagan, P., & Kim, S. K.** (2016). Enzymes from rare actinobacterial strains. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 79, pp. 67-98). Academic Press.
- Takeuchi, M., Enokita, R., Okazaki, T., Kagasaki, T., & Inukai, M.** (1991). Helvecardins A And B, Novel Glycopeptide Antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 44(3), 263-270.
- Tanriseven, A., Uludağ, Y. B., & Doğan, Ş.** (2002). A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 406-409.
- Tanuğur, I.** (2009). Besi tavuğu kümes atıklarının farklı katı malzemeleriyle aerobik kompostlaştırılması. Yüksek lisans tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Tatar S.** (2007). Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tchobanoglous, G. and Kreith, F.** (2002) *Handbook of Solid Waste Management*. McGraw Hill Press, USA.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., & Vigil, S.** (1993). *Integrated solid waste management*. McGra-Hill, NewYork. *HA Abu-Qdais et al.*
- Temiz, A.** (1998). Gıdalarda indikatör mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, İzmir, Turkey*, 87-107.
- Temizkan, G., & Arda, N.** (1999). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler: Genel Bakış. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 1*, 1-17.
- Thomas, P. D.** (2012). Exploring Mycological Diversity And Its Biotechnological Potential In The Southern Western Ghats (Doctoral Dissertation, Bharathidasan University).
- Tınmaz, E.** (2002). Çorlu İlçesi İçin Entegre Katı Atık Yönetim Araştırması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P.** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 249-266.

- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., & Morra, M. J.** (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2161-2171.
- Tomme, P., Warren, R. A. J., & Gilkes, N. R.** (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 37, pp. 1-81). Academic Press.
- Tong, B., Wang, X., Wang, S., Ma, L., & Ma, W.** (2019). Transformation of nitrogen and carbon during composting of manure litter with different methods. *Bioresource technology*, 293, 122046.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L.** (2007). Microbial Genetics. *Microbiology, an introduction*. 2010, Pearson Benjamin Cummings: San Francisco. p. 234, 240.
- Tosun, İ.** (2003). Gül işleme posasının evsel katı atıklarla birlikte kompostlaşabilirliği. Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.
- Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., & Crawford, D. L.** (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1-2), 81-90.
- Trejo-Estrada, S. R., Sepulveda, I. R., & Crawford, D. L.** (1998). In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(6), 865-872.
- Tuomela, M.** (2002). Degradation of lignin and other 14C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi.
- Turan, M. K., Günay, Ö. C., Kayış, S. A., & Çörtük, M.** (2018). Mikrobiyotada 16S rRNA ve Basit Biyoinformatik Analizler. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(1), 23-34.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P.** (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292.
- Uygun, S. Y., & Dursun, İ. T. D.** (2012). *Ülkemizde kompost üretimi yapan bazı tesislerdeki mekanizasyon uygulamalarının değerlendirilmesi* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Makinaları Anabilim Dalı).
- Uzel, A. T. A. Ç., & Hames, E. L. İ. F.** (2007). Production of organic solvent-stable alkaline protease from a marine *Streptomyces* strain Marac 1-4.
- Van Beilen, J. B., & Li, Z.** (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in biotechnology*, 13(4), 338-344.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Varank, G.** (2006). Aerobik olarak stabilize edilmiş katı atıklar ile kompost ürününün karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Müh. Anabilim Dalı, İstanbul.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., & Linko, M.** (1986, June). Bleaching with enzymes. In *Proceedings of 3rd international conference on biotechnology in the pulp and paper industry, STFI, Stockholm* (pp. 67-9).
- Voget, S., Steele, H. L., & Streit, W. R.** (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of biotechnology*, 126(1), 26-36.
- Waksman, A.S. (1989).** *Actinomycetes*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi 89, İzmir, 328 (Ward and Goodfellow, 2004).
- Waksman, S. A., & Henrici, A. T.** (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 46(4), 337.
- Waldron, K. W. (Ed.).** (2010). *Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. Elsevier.
- Wanderley, K. J., Torres, F. A., Moraes, L. M., & Ulhoa, C. J.** (2004). Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS microbiology letters*, 231(2), 165-169.
- Wang, X., Selvam, A., & Wong, J. W.** (2016). Influence of lime on struvite formation and nitrogen conservation during food waste composting. *Bioresource technology*, 217, 227-232.

- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D.** (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology*, 176(5), 386-390.
- Williams, S. T.** (1989). Genus *Streptomyces* waksman and henrici 1943. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2452-2492.
- Williams, S. T., & Vickers, J. C.** (1988). Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*, 88, 265-270.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. J.** (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, 129(6), 1743-1813.
- Wiseman, A.** (1985). *Handbook of enzyme biotechnology*. E. Horwood.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N.,** (1988). Multiplicity of Beta-1,4-Xylanase in Microorganisms - Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, 52 (3), 305-317.
- Worrall, J. A., & Vijgenboom, E.** (2010). Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. *Natural product reports*, 27(5), 742-756.
- Xiong, J.** (2006). *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press.
- Xu, L. H., Tiang, Y. Q., Zhang, Y. F., Zhao, L. X., & Jiang, C. L.** (1998). *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1089-1093.
- Xu, P., Li, W. J., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Chen, G. Z., Chen, H. H., & Jiang, C. L.** (2005). *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Oxalobacteraceae' isolated from China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1149-1153.
- Yoon, J. H., & Park, Y. H.** (2000). Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 1081-1086.
- Yoon, J. H., Shin, Y. K., & Park, Y. H.** (2000). DNA-DNA relatedness among *Thermoactinomyces* species: *Thermoactinomyces candidus* as a synonym of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Thermoactinomyces thalophilus* as a synonym of *Thermoactinomyces sacchari*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(5), 1905-1908.
- Zarandi, M. E., Bonjar, G. S., Dehkaei, F. P., Moosavi, S. A., Farokhi, P. R., & Aghighi, S.** (2009). Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *American Journal of Applied Sciences*, 6(1), 194-199.
- Zhao, K., Guo, L. Z., & Lu, W. D.** (2012). Extracellular production of novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable carboxymethyl cellulase by marine bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(3), 550-567.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E.** (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 589-608.
- Zhou, X., Huang, H., Chen, Y., Tan, J., Song, Y., Zou, J., & Ju, J.** (2012). Marthiapeptide A, an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60 L scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospira* thermotolerans SCSIO 00652. *Journal of natural products*, 75(12), 2251-2255.
- Zibilske, L. M.** (1998). Composting of organic wastes. *Principles and applications of soil microbiology*.
- Zoppas, F. M., Meneguzzi, Á., & Tramontina, F.** (2013). Alternatives for cellulase production in submerged fermentation with agroindustrial wastes. *Int. J. Mod. Eng. Res*, 3, 2374-2381.

EKLER

EK-1: Besiyeri Ortamları ve Hazırlanışı

SM3 Agar (Gauze's medium 2)

Bileşen Adı	Miktar
Glukoz	10 g
Pepton	5 g
Tripton	3 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamin Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Starch Casein Agar (SCA)

Bileşen Adı	Miktar
KNO ₃	0.3 g
NaCl	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
CaCO ₃	0.02 g
Çözünebilir nişasta	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamin Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Tripton Yeast Glukoz Ekstrakt Agar

Bileşen Adı	Miktar
Tripton	3 g
Maya Özütü	5 g
Glukoz	5 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Nutrient Agar

Bileşen Adı	Miktar
Pepton from meat	5 g
Meat extract	3 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Bennet's Agar

Bileşen Adı	Miktar
Yeast extract	1 g
Beef extract	1 g
Kazein enzim hidroliz	2 g
Dekstroz	10 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Glukoz Yeast Extract Agar

Bileşen Adı	Miktar
Glikoz	4 g
Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
CaCO ₃	2 gr
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Triptic Soy Agar

Bileşen Adı	Miktar
Triptic Soy Broth	30 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

CMC Agar

Bileşen Adı	Miktar
Tripton	10 g
Maya Extract	5 g
NaCl	5 g
CMC	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Czapek's Dox Agar

Bileşen Adı	Miktar
Sukroz	30 g
Sodyum nitrat	2 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Magnezyum sülfat	0.5 g
Demir sülfat	0.010 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Ürea Agar

Bileşen Adı	Miktar
Pepton from meat	1 g
Glukoz	1 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Fenol red	0.012 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Ksilan Agar

Bileşen Adı	Miktar
Ksilan	10 g
Pepton	5 g
Maya extract	5 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

Tryptone Yeast Extract Broth

Bileşen Adı	Miktar
Yeast extract	5 g
Glukoz	5 g
Trypton	3 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 2 (Yeast Malt Ekstrakt agar)

Bileşen Adı	Miktar
Yeast extract	4 g
Malt Extract	10 g
Dekstroz	4 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 3 (Oat Meal Agar)

Bileşen Adı	Miktar
Oat Meal	20 g
Agar	18 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı

ISP 4 (Inorganic Salt Starch Agar)

Bileşen Adı	Miktar
Starch	10 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Magnezyum sülfat	1 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	2 g
Demir sülfat	0.001 g
Manganez klorid	0.001 g
Zinc sülfat	0.001 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 5 (Glycerol Asparagine Agar Base)

Bileşen Adı	Miktar
L- asparajin	1 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Trace salt solüsyon	1 ml
Agar	20 g
Distile su	1000 ml
*1 ml trace salt	Solüsyon
*Ferrus sülfat	0.001 g
*Zinc sülfat	0.001 g
*Manganez klorid	0.001 g
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 6 (Peptone Yeast Extract Iron Agar)

Bileşen Adı	Miktar
Pepton	15 g
Proteaz pepton	5 g
Demir amonyum sitrat	0.5 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Sodyum tiyosülfat	0.08 g
Yeast extract	1 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 7 (Tyrosine Agar)

Bileşen Adı	Miktar
L-asparjin	1 g
L-tyrosine	0.5 g
Dipotasyum fosfat	0.5 g
NaCl	0.5 g
Agar	20 g
*1 ml Trace	salt solüsyon
Demir sülfat	1.360 mg
Kopper Klorid	0.027 mg
Kobalt klorid	0.040 mg
Sodyum molybdate	0.025 mg
Zinc klorid	0.020 mg
Borik asit	2.85 mg
Manganez klorid	1.8 mg
Sodyum tartarat	1.77 mg
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

ISP 9 (Carbon Utilization Agar)

Bileşen Adı	Miktar
A) Steril	Karbon
*B) Pridham and Gottlieb	Trace Salts 1 ml
*Bakır sülfat	0.64 g
*Demir sülfat	0.11 g
*Mangan klorür	0.79 g
*Çinko sülfat	0.15 g
*Demir sülfat	1.360 mg
*Distile su	100 ml
C) Basal mineral	salts agar
Amonyum sülfat	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄	5.65 g
Magnezyum sülfat	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000
pH	7.2

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak otoklavlanabilir cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Besiyerini oluşturan bileşenlerin sudaki çözünme durumlarına göre ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

EK 2: Çözeltilerin İçerikleri ve Hazırlanışı

Mikroorganizmaların İzolasyonunda ve Stoklanmasında Kullanılan Çözeltiler Ringer Solüsyonu

Ringer	1 tablet
Distile Su	500ml

Ortamın Hazırlanışı: 500 ml saf su içerisinde çözdürülen ringer tablet otoklavlanabilir ağız kapaklı cam tüplere aktararak 121 °C 1 ATM basınçta 15 dk otoklavlandı.

% 30'lik Gliserol Stok Çözeltisi

Gliserol	30 ml
Distile Su	70 ml

Ortamın Hazırlanışı: Bir beher içerisinde 70 ml saf su ve 30 ml gliserol karıştırılır. Daha sonra 1,5 ml'lik ağız vidalı kapaklı otoklavlanabilir cryo tüplere 1 ml olacak şekilde paylaşılır ve 121 °C 1 ATM basınçta 20 dk otoklavlanır.

Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Lizozim (50 mg/ml)

Lizozim	500 mg
TE Tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: 500 mg lizozim 10 ml TE tampon içerisinde çözülerek hazırlandı. 1,5 ml'lik steril tüplere 1'er ml bölünerek -20 °C 'de kullanım zamanına kadar saklandı.

Tris (1 M, pH:8)

Tris	121,1 g
DDH ₂ O (Double distile saf su)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 800 ml saf su içerisinde 121,1 g tris ilave edilir ve manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C'de berraklaşincaya kadar çözülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. pH 8'de 1 M Tris elde etmek için solüsyon içerisinde 42 ml % 38'lik HCl ilave edilir. Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

EDTA (0,5 M, pH:8)

EDTA	186,1 g
DDH ₂ O (Double distile saf su)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 800 ml saf su içerisinde 186,1 g EDTA ve yaklaşık 20 g NaOH pelleti ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşincaya kadar çözündürülür. Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

TE Tamponu

0.5M EDTA, pH 8	2 ml
1M Tris, pH 8	10 ml
DDH ₂ O (Double distile saf su)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: Tampon 1000 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrolü yapılır. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

TBE (Tris Borik Asit EDTA 10X, pH:8)

Tris	121.1 g
Borik asit	61.83 g
EDTA	5.84 g
DDH ₂ O (Double distile saf su)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: Solüsyon içerikleri hassas terazi ile tartılır ve 1000 ml'lik beher içerisine konulur. İçerisine 500 ml saf su ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmıncaya kadar tutulur. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanıp, % 33'lük HCl kullanılarak pH 8'e ayarlanır ve +4°C'de saklanır.

1X TBE (pH: 8)

10 X TBE tamponu	50 ml
DDH ₂ O (Double distile saf su)	450 ml

Ortamın Hazırlanışı: Solüsyon içerikleri mezürle ölçülüp, ağzı kapaklı 500 ml'lik cam şişe içine konularak oda sıcaklığında tutuldu.

Brom Fenol Mavisi

Brom fenol mavisi	40 mg
Gliserol	5 ml
0.5 M EDTA	1.5 ml
DDH ₂ O (Double distile saf su)	3.5 ml

Ortamın Hazırlanışı: Toplam hacim 10 ml hazırlandıktan sonra eppendorf tüplere 500 µl şeklinde dağıtılıp, +4°C'de saklandı. Agaroz Jel Hazırlanışı (%1'lik)

Agaroz Jel Hazırlanışı (%1'lik)

Agaroz	1 g
1 X TBE	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1 g agaroz 100 ml 1X TBE tamponu bulunan 250 ml'lik erlene ilave edilir. Mikrodalgada 300-450 °C'de 3-6 dk eritilir ve homojenizasyon sağlanır. Sıcaklık yaklaşık 60 °C olunca içerisine 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edilir.

Nalidiksik Asit (10µg/ml)

Nalidiksik Asit	0.4 g
DH ₂ O	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: Nalidiksik asit antibiyotiği hassas terazide tartıldıktan sonra cam behere konularak üzerine bir miktar distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Çözünme işleminde 5M NaOH çözeltisinden 20-30 µl eklenir. Nalidiksik asit tamamen çözüldükten sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. Daha sonra önceden otoklavlanmış ve pastör fırınında kurutulmuş steril otoklavlanabilir cam şişe içerisine steril kabinet ortamında 0,22/0,45 µm'lik filtre ile süzülerek aktarılır. Cam şişenin daha sonra dış tarafı alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabına kaldırılır.

Rifampisin (0,5µg/ml)

Rifampisin	0.02 g
DH ₂ O	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: Rifampisin antibiyotiği hassas terazide tartıldıktan sonra cam behere konularak üzerine bir miktar distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Rifampisin tamamen çözüldükten sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

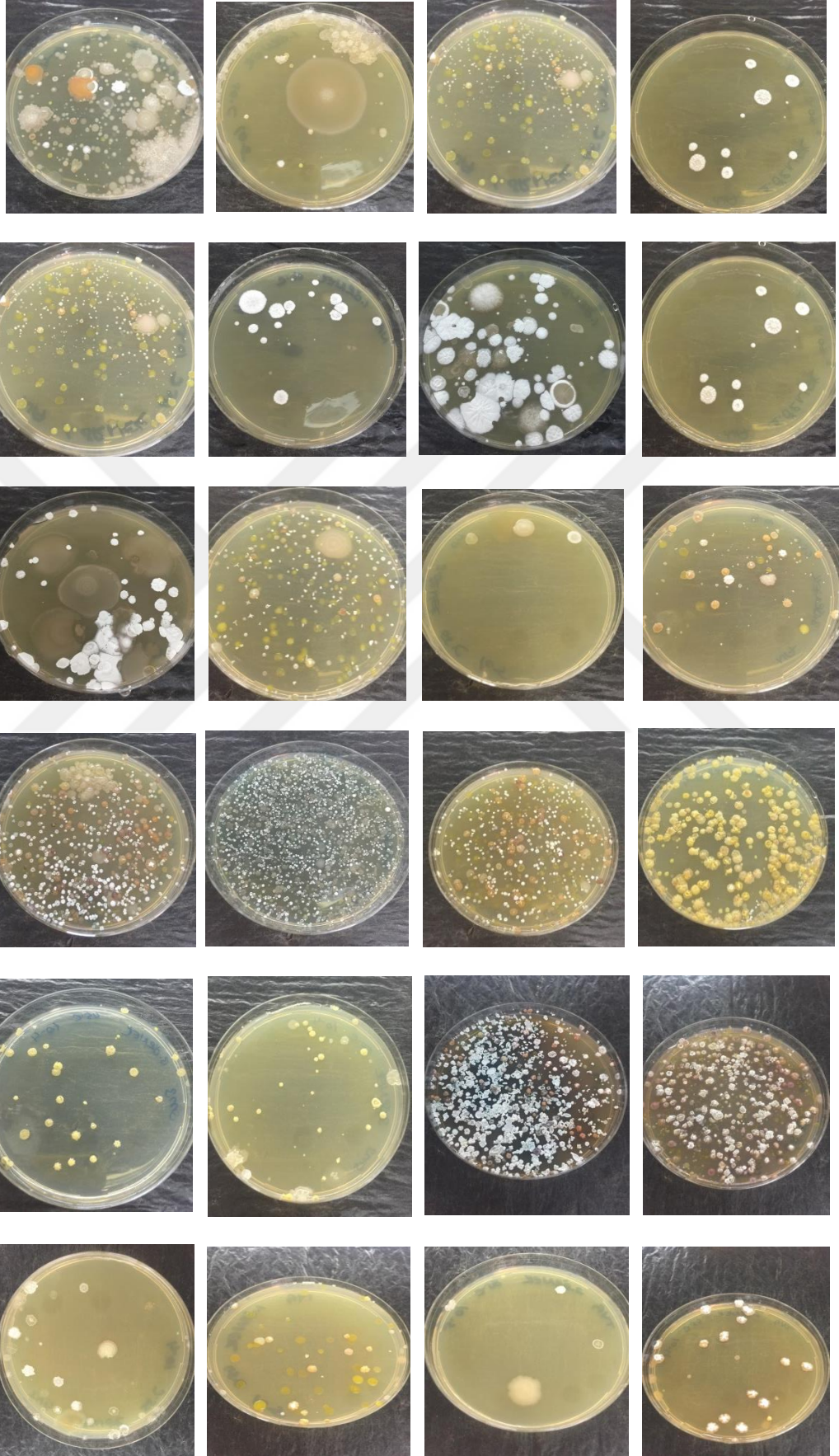
Daha sonra önceden otoklavlanmış ve pastör fırınında kurutulmuş steril otoklavlanabilir cam şişe içerisine steril kabinet ortamında 0,22/0,45 µm'lik filtre ile süzülerek aktarılır. Cam şişenin daha sonra dış tarafı alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabına kaldırılır.

Sikloheksimid (50 µg/ml)

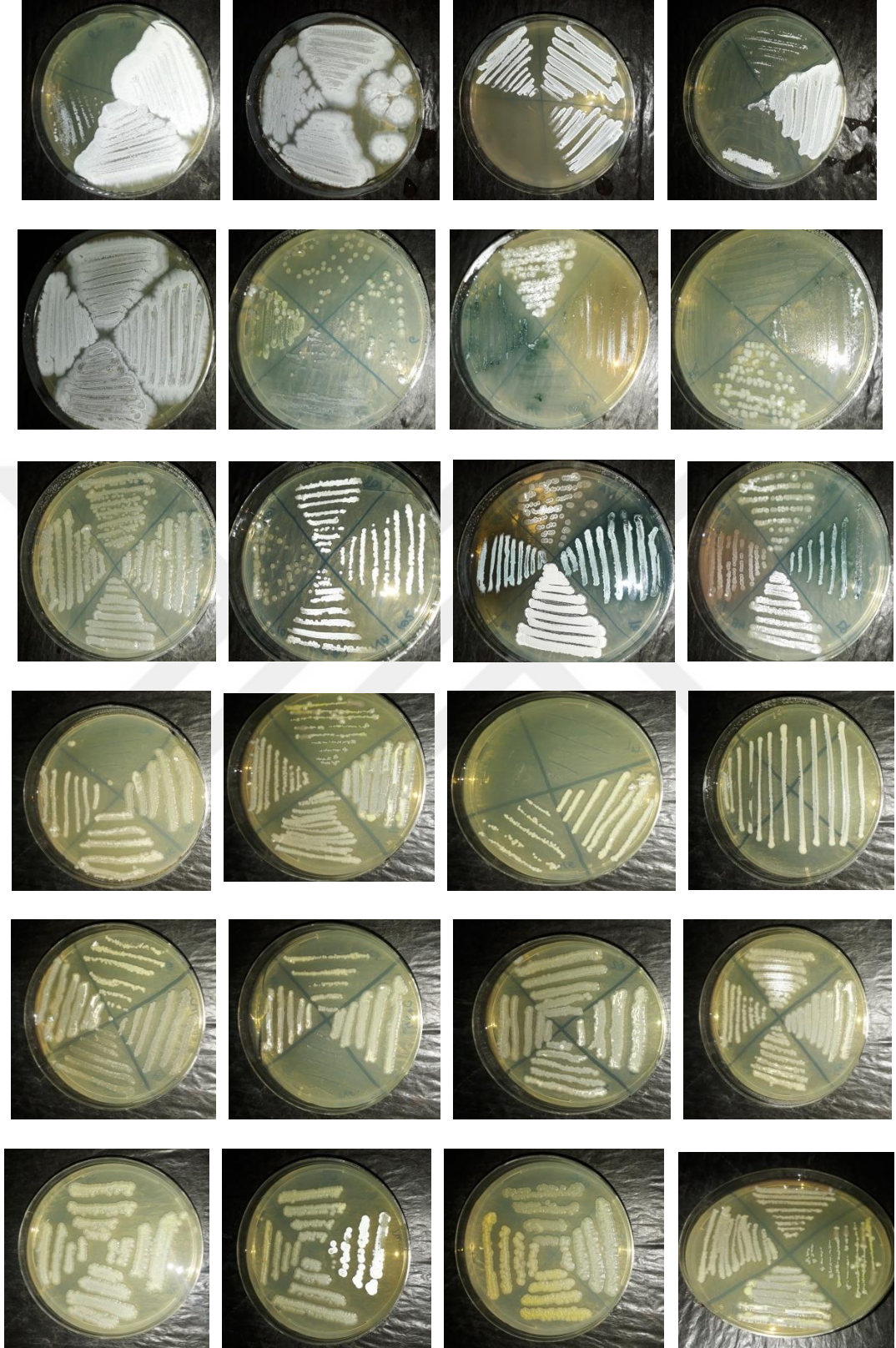
Sikloheksimid	2 g
Etanol	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: Sikloheksimid antibiyotiği hassas terazide tartıldıktan sonra cam behere konularak üzerine bir miktar saf etanol eklenir. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Sikloheksimid tamamen çözüldükten sonra 100 ml'ye saf etanol ile tamamlanır. Daha sonra önceden otoklavlanmış ve pastör fırınında kurutulmuş steril otoklavlanabilir cam şişe içerisine steril kabinet ortamında 0,22/0,45 µm'lik filtre ile süzülerek aktarılır. Cam şişenin daha sonra dış tarafı alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabına kaldırılır.

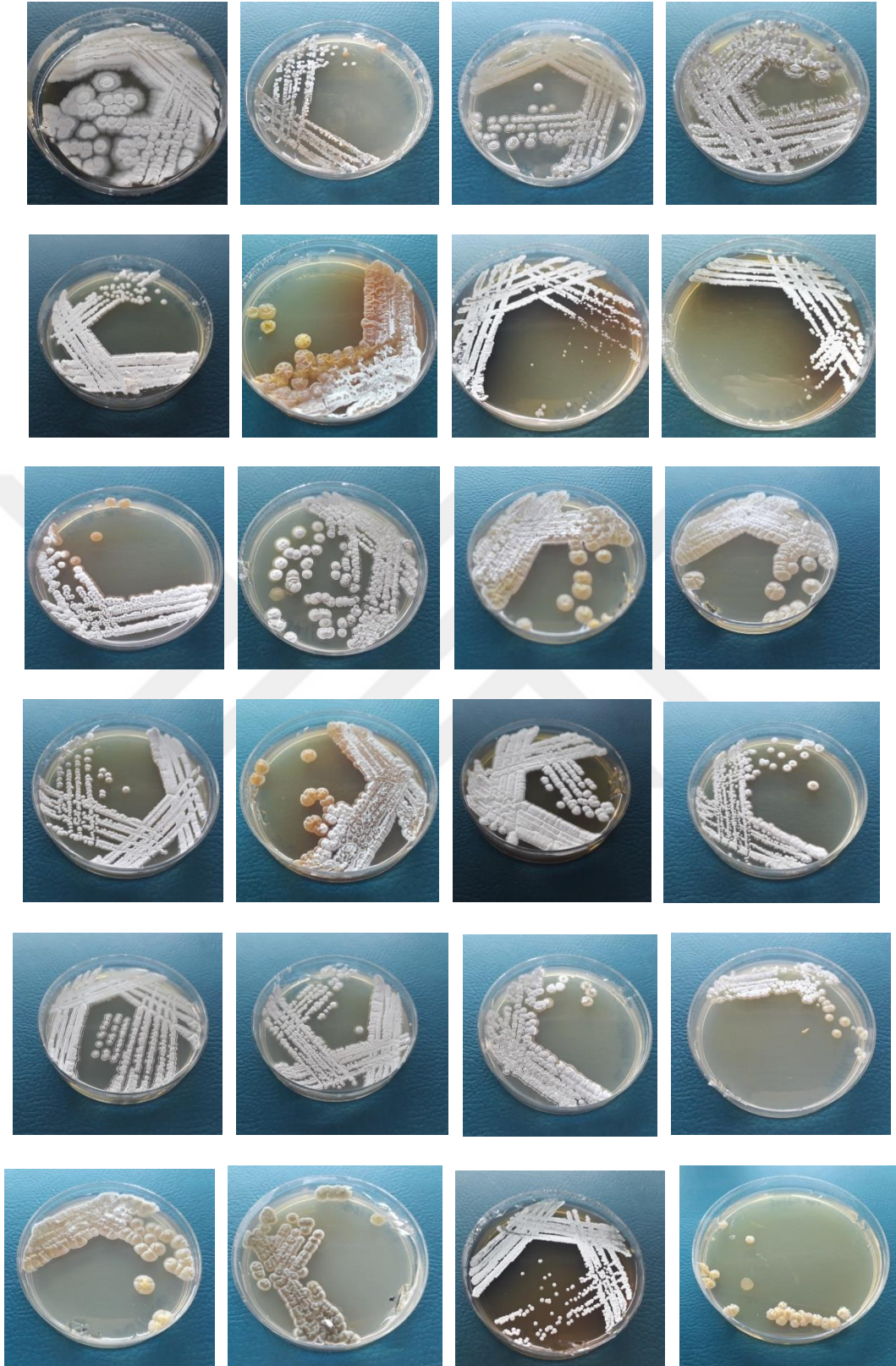
EK-3: Toprak Ve Aktif Çamur İzolasyonu ile Elde Edilen İzolatların Dilüsyon Görüntüleri



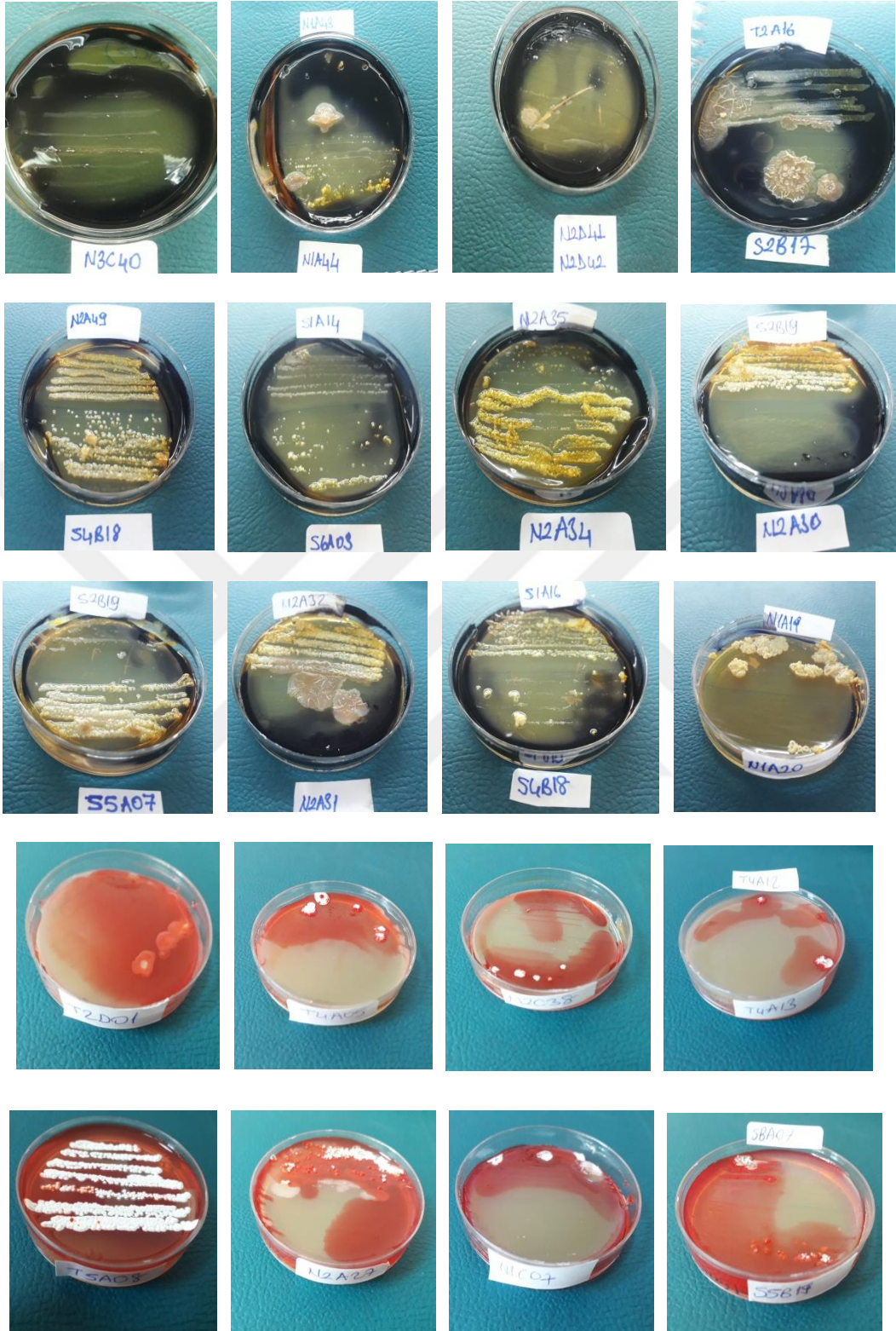
EK 4: İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması Petri Görüntüleri



EK 5: Seçilen izolatların Tek Koloni Seyreltme Plak Ekimleri



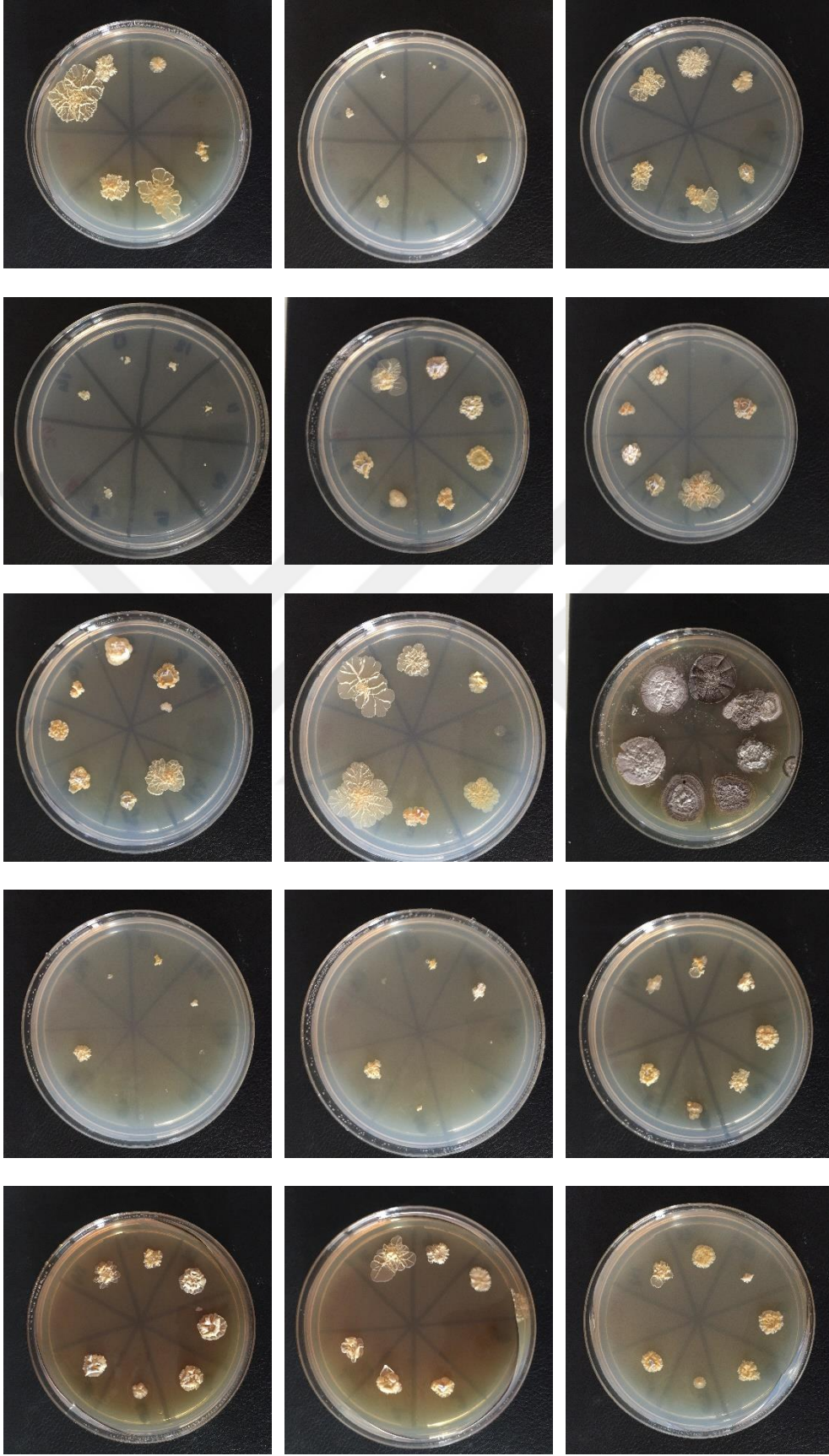
EK 6: Enzim Testi Yapılan İzolatların Görüntüleri



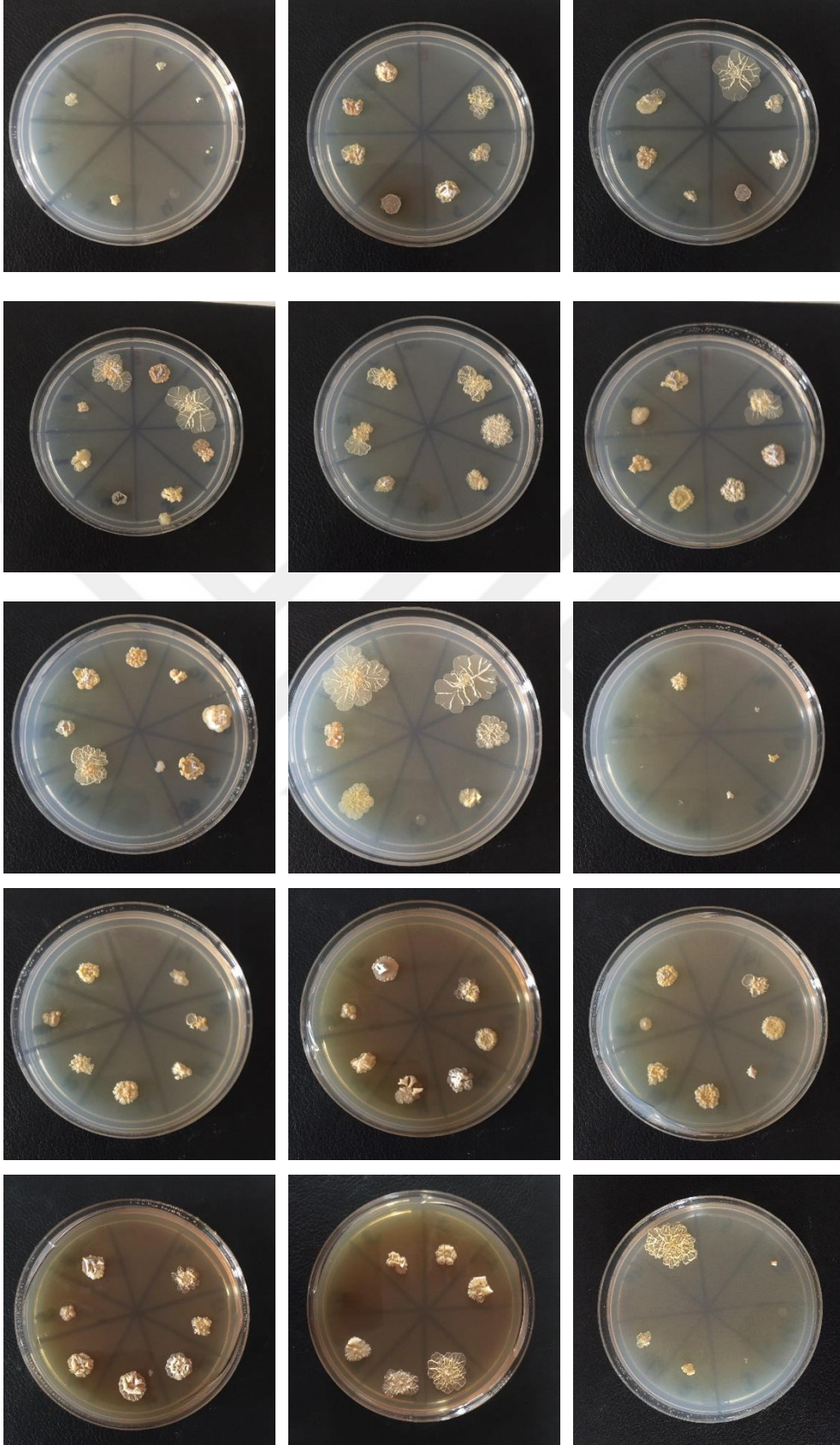
EK 7: Morfoloji Testi Yapılan İzolatların Görüntüleri



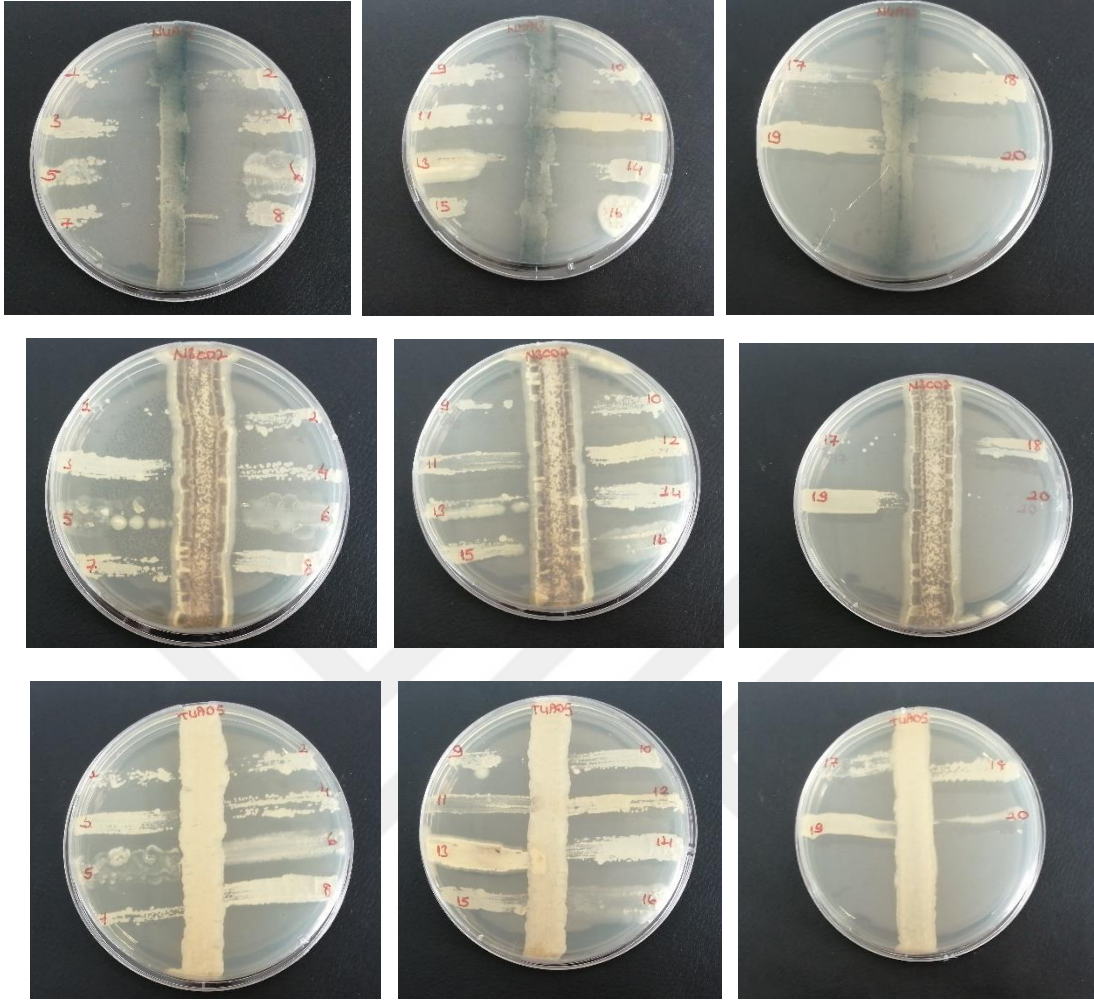
EK 8: Sıcaklık Tolerans Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri



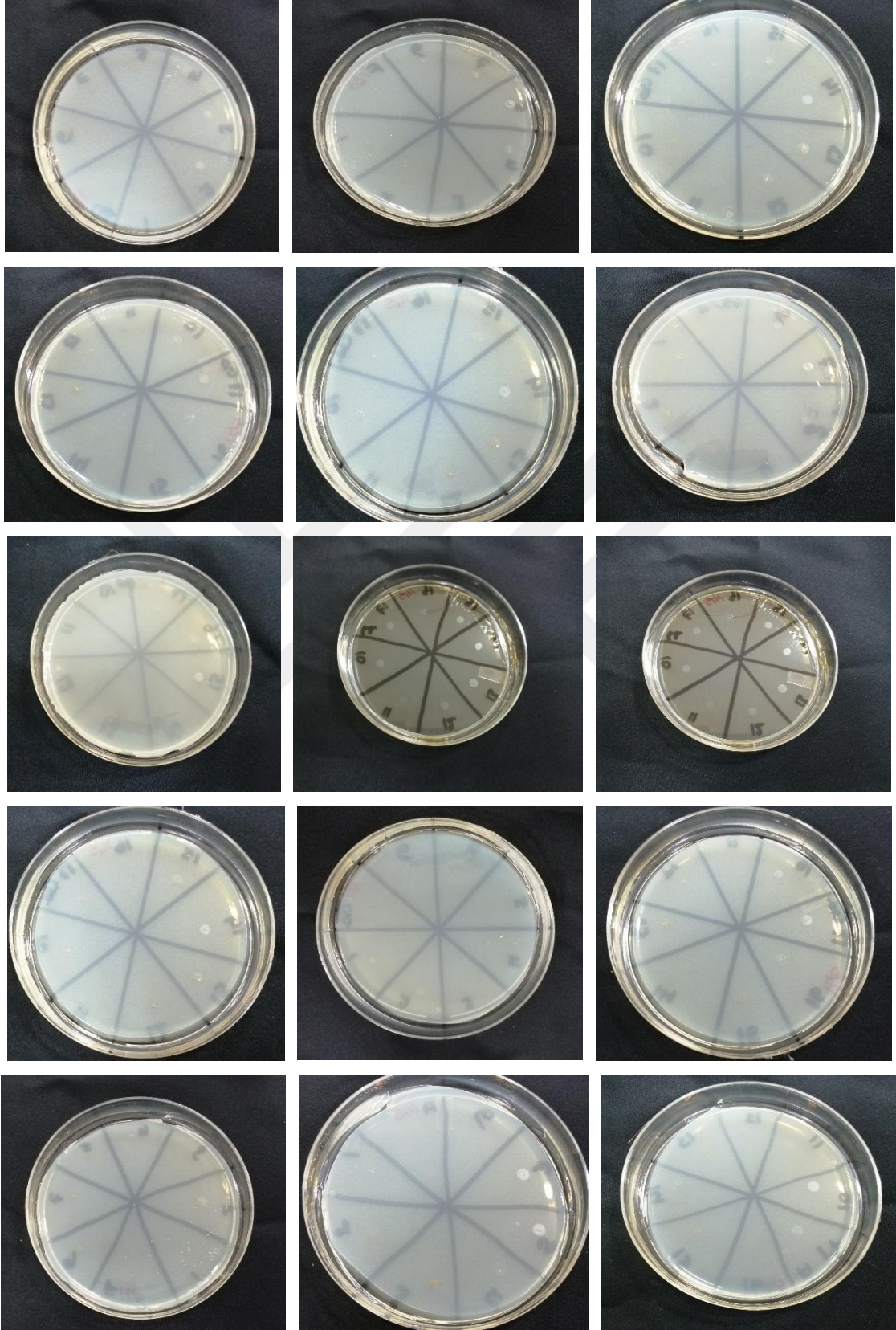
EK 9: pH Tolerans Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri



EK 10: Antagonistik Etki Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri



EK 11: Karbon Kaynakları Testi Yapılan İzolatların Petri Görüntüleri



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Saadet Gizem ERTEKİN

Doğum yeri ve tarihi: Batman/06.09.1996

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi: BŞEÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yabancı Diller: İngilizce

İş Deneyimi

Stajlar: Mersin Üniversitesi, Mikrobiyoloji (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi Genetik A.B. (2.7.12-10.8.12)

Projeler: Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi *Micromonospora* İzolatları Kullanılarak Biber (*Capsicum annuum*) Bitkisinde Bitki Büyümesinin Artırma Olanaklarının Araştırılması

Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi Kompost karışımlarında hızlandırıcı olarak kullanılacak Termofilik Aktinomisetlerin seçimine farklı parametrelerin etkisi

İletişim Bilgileri

Tel: 05059817256

E-Posta Adresi: gizemertekin5656@gmail.com

Sertifikalar

İş Sağlığı Ve Güvenliği Eğitimi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi,

2019 Moleküler Biyoloji Ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi.

2019 AB Projeleri Yazımı Ve Proje Döngüsü Yönetimi Eğiticilerin Eğitimi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi, 2019

Sunumlar

Antifungal activity of Actinomyces identified by 16S rRNA sequencing analysis 2. Uluslararası UNIDOKAP Karadeniz Biyoçeşitlilik Sempozyumu (28.11.2018 - 30.11.2018) TÜRKİYE Samsun İngilizce Özdemir Koçak Fadime, Kumaş Ayten, Ertekin Gizem, Değirmenci Levent

Molecular identification of microorganisms with nitrogen fixing capability 2. Uluslararası UNIDOKAP Karadeniz Biyoçeşitlilik Sempozyumu (28.11.2018 - 30.11.2018) TÜRKİYE Samsun İngilizce Özdemir Koçak Fadime, Kumaş Ayten, Ertekin Gizem, Değirmenci Levent

Yayınlar

"Effect of Streptomyces sp. GBTUV5 on the growth of Solanum lycopersicum (tomato)"

