

## A Research Study on the Identification, Characterization, and Gelatinase Enzyme Activities of the Halotolerant Bacteria Isolated from Salinized Sheep Skins

Hamdullah SEÇKİN\*, Nursel DOSTBİL

Department of Biology, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey

Received: 21.02.2018

Accepted: 05.04.2018

Available online: 24.04.2018

Published: 30.06.2018

**Abstract:** This study was carried out in order to determine the production of gelatinase enzyme in isolates by isolating halophilic bacteria from saline-stored sheep skins. Accordingly, optimal temperature stability, optimum salt concentration, and plasmid-coded resistance status of the enzyme were investigated. Feed media that contain salt concentrations increasing periodically (with the rates of 5% , 10% , 15% , 20% , 25% and 30% ) to multiply bacteria isolated from sheep skins were used.

In this study, 280 strains that were isolated according to the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology were examined. In trials of gelatinase enzyme activities, it was determined that the strains that produced positive results were *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. and it was observed that isolates have the best ability of multiplying under the incubation conditions of 30°C in 3 days and that multiplication of bacteria slowed in the case of increasing salt concentration. The rates of 1% , 1.5% , 2% and 3% gelatinase feed media were used to determine the enzyme activities and it was revealed that in media containing 1.5% gelatin produced optimal enzyme activity. Positive gelatinase activity was observed only in 2.8% of the halophilic bacteria isolated from sheep skins. Halophilic strains performing plasmid coded enzyme activity was not observed.

**Keywords:** Sheep skins, Halophilic bacteria, Gelatinase enzyme, Plasmid, Anti-biogram test

### Tuzlanmış Koyun Derilerinden İzole Edilen Halotolerant Bakterilerin Teşhisi, Karakterizasyonu ve Jelatinaz Enziminin Aktivitesinin Araştırılması

**Özet:** Bu çalışma tuzlanarak muhafaza edilmiş koyun derilerinden halofilik bakteri izolasyonu yapılarak, izolatlarda jelatinaz enzim prodüksiyonu belirlemesi amacıyla yapıldı. Buna bağlı olarak enzimin optimal sıcaklık stabilitesi, optimum tuz konsantrasyonu ve plasmid kodlu dirençlilik konumu araştırıldı. Deri örneklerinden izole edilen halofilik bakterilerin çoğaltılmasında, periyodik olarak gittikçe artan oranlarda (% 5, % 10, % 15, % 20, % 25 ve % 30) tuz konsantrasyonu içeren besi ortamları kullanıldı.

Çalışmada Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology'e göre izolasyonu yapılan 280 bakteri suşu üzerinde çalışıldı. Jelatinaz enzim aktivitesi denemelerinde pozitif sonuç veren suşların *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. olduğu tespit edildi ve izolatların optimal olarak % 10 tuz konsantrasyonu içeren besi ortamında 30 °C'de 3 gün inkübasyon koşullarında en iyi çoğalma yeteneğine sahip olduğu, tuz konsantrasyonunun artırılması durumunda bakteri çoğalmasının yavaşladığı gözlemlendi. Jelatinaz enzim aktivitesinin tanımlanmasında ise % 1, % 1.5, % 2 ve % 3 oranlarında jelatin içeren besi ortamı kullanılarak optimal enzim aktivitesinin % 1.5 jelatin içeren besi ortamlarında olduğu tespit edilmiştir. Koyun derilerinden izole edilen halofilik bakterilerin ancak % 2.8'inde pozitif jelatinaz aktivitesi tespit edildi. Plasmid kodlu jelatinaz enzim aktivitesi gösteren halofil suşa rastlanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Koyun derisi, Halofilik bakteri, Jelatinaz enzimi, Plasmid, Antibiyogram testi

### 1. Giriş

Deri, canlıyı soğuğa, sıcağa, mekanik etkilere, zararlı ışınlar ve mikroorganizmalara karşı koruyan, beslenmek amacıyla hayvanların kesiminden sonra ortaya çıkan yan üründür. Geçmişte insanlar hayvanların etlerinden besin olarak yararlanmış, paleolitik çağlarda derinin mikroorganizmik faaliyetler sonucu kolayca bozulabildiğini fark etmişlerdir. Böylece deriyi işlemeye başlayarak, deri sanayisinin ortaya çıkmasını sağlamışlardır. Deri en eski giysi materyallerinden biridir. Günümüzde deri ürünlerinin insan sağlığına uygun olmaları, doğal görünümleri, prestij veya sosyal statü göstermeleri gibi nedenlerden dolayı kullanım alanı genişlemiştir. Kullanım alanının gelişmesi deri üretimini arttırmıştır (Öndoğan, Pamuk, Tama, Yaşatan, & Akman, 2009).

Hayvanlardan yüzüldükten sonra salamura işleminden başka işlem görmemiş deriler ham deri olarak tanımlanır. Ham deri % 60-70 oranında su ve suda çözünen, kolay parçalanabilen protein bulundurduğundan dolayı bakteri üremesi için uygun bir ortam oluşturur. Yapılan araştırmalara göre deriden sıklıkla proteolitik, lipolitik ve sakkarolitik aktiviteye sahip bakteriler izole edildiği bildirilmiş olup bu mikroorganizmalar uygun olmayan taşıma ve depolama koşullarında gelişip, deride bozulmaya neden olmaktadır (Birbir & Ilgaz, 1996). Tuzla koruma yöntemi dericilerin çoğu tarafından tercih edilip, tuza toleransı olmayan mezofil bakterilerin gelişimini kontrol edilebilirken, halofil bakterilerin gelişimi kontrol edilememektedir (Kallenberger, 1984; Bailey & Birbir, 1993).

\*Corresponding author: hamdullahseckin@yyu.edu.tr

Halofilik mikroorganizmaların habitatları tuzcul ortamlardır. Halofilik prokaryotlar içerisinde hem bakterilere hem de arkebakterilere ait türler bulunur. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuz üretim tesislerinde ve tuzlanmış balık ve derilerin yüzeyinde bulunurlar. Hafif derecede halofiller 0.2-0.85M (% -2-5), ılımlı halofiller 0.85-3.4M (% 5- 20) ve ekstremhalofiller ise üremeleri için 3.4-5.1M (% 20-30) NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar (DasSarma & Arora, 2001; Grant, 2004). Tuzlu habitatlarda yaşayan bazı bakteriler tuzu tolere edebilirler ve halotolerant olarak adlandırılırlar.

Mudryk ve Donderski (1982), Polonya'da Gardno Gölü'nden izole ettikleri halofilik bakterilerde metabolik aktivitesi ile ilgili çalışmalarında NaCl konsantrasyonunun artmasıyla substrat kullanımının azaldığını belirlemişlerdir. Bu mikroorganizmalardan biyomolekülleri tuz stresinden koruyan ajanlar, biyopolimerler, izomeraz ve hidrolaz gibi enzimler, karoten, fermente gıdalar ve gıda katkı maddeleri endüstriyel yolla üretilmektedir (Rothschild & Mancinelli, 2001; Oren, 2002, Satyanarayana, Raghukumar, & Shivaji, 2005). Malatdehidrogenaz ve dihidroflatredüktaz, selülaz, akalinfosfataz, ekstrasülülerhidrolitik enzimler halofilik bakterilerden izole edilirler (Zusman, et al., 1989; Mevarech, Eisenberg, & Neumann, 2000; Demirjian, Morís-Varas, & Cassidy, 2001). Halofilik bakterilerin bazıları gıdalarda bozulmalara neden olurlar. Yüksek tuz konsantrasyonları içeren su ürünlerinin (kuru tuzlama uygulanmış veya salamura edilmiş balık) bozulmalarına zorunlu halofilik bakteriler ile gram-negatif, halofilik anaerobik veya aerobik bakteriler, ozmotolerant maya türleri neden olmaktadır (Çaklı & Kışla, 2003). Hayvan derisi kesim sonrası % 60-65 neme sahiptir ve derinin nem içeriği tuzlama ile % 35-40'a kadar düşürülebilmektedir. Bu durum bakteriyel gelişimi sınırlasa da yeterli koruma sağlayamamaktadır. Yapılan araştırmalarda deniz ve göl sularının halofil bakteri içerdiği ve deri konservasyonunda buralardan elde edilen tuzların kullanılmasıyla koruma işleminin gerçekte istenildiği gibi yapılamadığı açıklanmıştır (Birbir & Ilgaz 1996; Birbir, Kalli, & Johannson, 2002). Tuzla korunmaya çalışılan derilerde, tuza toleranslı olmayan mezofil bakterilerin kontrol altına alınabilmesine rağmen halofil bakterilerin geliştiği ve koruma işlemi esnasında deriye geçerek deri üzerinde üreyebildiği belirtilmektedir (Bailey & Birbir, 1993). Bunun yanı sıra kullanılan tuzun çevreye olumsuz etkileri olduğu da bilinmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, deri çürümesine sebep olan jelatinaz enzimini sentezleyen bakterilerin çoğalmasını sağlayan optimal şartları ve jelatinaz enzim üretimi gösteren suşların plazmid kökenli olup olmadığını araştırmaktır.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. Materyal

Bu çalışmanın materyalini Van Erçek Gölü civarındaki dericilerden toplanan, tuzlanarak muhafaza edilmiş deri örnekleri oluşturdu. Deri örnekleri gruplar halinde farklı zaman aralıklarında alındı. 18 adet tuzlanmış koyun derisinden steril eküvyon çubuğu yardımıyla bakteri örnekleri halofil karakterde sıvı besiyerine inokule edildi ve aseptik şartlarda laboratuvara getirilerek çoğaltması

için farklı sıcaklıklarda denemek koşuluyla etüvde inkübasyona bırakıldı.

Alınan koyun derilerinde halofil karakterde halofilik özelliğe sahip başta *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. suşları olmak üzere bir dizi bakteri izolatları kullanıldı.

### 2.2. Tuzlanmış Deri Numunelerinden Bakteri Suşlarının İzolasyonu

1. Koyun derilerinden steril eküvyon çubuğu ile bakteri örnekleri alınarak 1 ml'lik Nutrientbroth'a inoküle edilmiştir. Besiyeri 30 °C'de 3 gün süresince inkübe edilmiştir.
2. Saf halde halofilik bakteri kültürünü hazırlayabilmek amacıyla bir seri sulandırmalar yapılarak ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) adi jelöz'e yayma metoduyla ekim yapılarak 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyondan sonra, besiyerinde tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip koloniler saf kültür olarak seçilmiştir.
4. Seçilen koloniler N1 agar'a çizgi şeklinde ekimi yapıldıktan sonra 3 gün süreyle etüvde inkübe edilmiştir.
5. N1 Agar'da üreyen suşların yatık agar'da stok kültürleri hazırlanmıştır.
6. İzole edilen suşlar HS1, HS2, HS3, HS4,..... şeklinde tanımlanmıştır.
7. Yatık agardaki her saf kültür Nutrientbroth'da üretilerek jelatin hidrolizinin test edilmesi için jelatin besiyerine çizgi ekimi yapılarak inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon sonucunda, besiyerinde olası jelatinin hidrolizi frazier solusyonu ile test edilmiştir.
9. Jelatinaz pozitif suşların, plazmid kodlu olup olmadığını belirlemek için acridineorange'li buyyonda üretilmek üzere inkübasyona bırakılmıştır.
10. Besiyerinde üremesi tamamlanan suşların, jelatinli besiyerine çizgi şeklinde ekimi yapılmıştır.
11. Frazier solusyonu ile tekrar jelatinin hidrolizinin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### 2.3. Disk difüzyon testi

1. Saf olarak seçilen halofil bakteri suşları tuz konsantrasyonu ayarlanmış adi buyyon'da 30 °C'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyon sonunda, test suşları LB agar'a 0.1 ml yayılmıştır. Denenecek antibiyotik diskleri belirli aralıklarla yerleştirilmiş ve 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonucunda, antibiyotik diskinin çevresindeki inhibisyon zon çapları mm olarak ölçülmüştür.
4. Disklerin her birinin birbiri ile aralarındaki aditif, sinerjik ve antagonist etkilerinin olup olmadığı kontrol edilmiştir.
5. Disk çevresindeki bakteri üremesi dirençlilik profilini, üremenin olmaması ise duyarlılık profilini oluşturulmuştur.

### 2.4. Jelatinin hidrolizi

Jelatinaz üretiminin tespiti bakteri identifikasyonunda önemli bir testtir. Jelatin bir hayvansal kollojen türevi olan bir proteindir. Jelatinin hidrolize eden enzim jelatinaz adını alır. Jelatinaz üretimi bazı bakteriler için virülens faktörü olabilmektedir.

Bu amaçla jelatin ile hazırlanmış jeloz besiyerine batırma yöntemi ile bakterinin saf kültüründen platin iğne ile ekim yapılmış 28 °C'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerleri 28 °C sıvı halde olduğundan, buzdolabına konulduğunda besiyeri katılaşma göstermez ise bakteri jelatini hidrolize etmiş demektir. Katılaşma gözlenmişse haftada bir kontrol yapılarak 4 haftaya kadar bekletilir (Çetin, 1968).

### 2.5. Frazier solüsyonunun hazırlanması

Frazier solüsyonu HgCl<sub>2</sub>, HCl ve distile su kompleksi olarak hazırlanıp aseptik koşullarda oda sıcaklığında 7 gün süre ile çalışmada kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Çalışmada Frazier solüsyonu jelatinli besiyerinde bakteri suşları üretildikten sonra test amacıyla uygulanmıştır.

### 2.6. Jelatinaz enzim aktivitesinin plasmid kodlu olup olmadığının saptanması ve eliminasyon testleri

Tuzlanarak muhafaza edilen koyun derilerinden alınan halofilik bakteri suşlarında plasmid kodlu jelatinaz enziminin belirlenmesi amacıyla şu işlemler yapılmıştır.

1. 30 µgr/ml gibi plasmid eliminatörü ajanla hazırlanmış 2'şer ml'lik LB buyyonlara ve plasmid eliminatörsüz LB buyyonlara bakteri suşları inoküle edilerek 30 °C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyon sonucunda, üreten bakteriler 10<sup>-2</sup> sulandırma ile jelatin içeren besi ortamlarına aktararak enzim üretimi için test uygulanmıştır. Aynı şekilde 2 ml'lik 30 µgr/ml akridineorange'li buyyonlarda halofilik karakterdeki bakteri suşları üretilerek jelatin içeren besi ortamlarına ekimi yapılarak 3 gün süreyle 30 °C'de inkübe edilmiştir. Her iki durumda da akridineorange'li ve akridinorange'siz üretilen halofilik bakteri suşlarının jelatinaz üretimini besiyerinde belirlemek amacıyla frazier solüsyonu ile test edilerek karşılaştırma yapılmıştır.

Yapılan test sonucunda, halofilik bakteri suşlarında jelatinaz enziminin plasmid kodlu olmadığı belirlenmiştir. Denenen halofilik bakteri suşlarınsa jelatinaz enzim aktivitesinin farklı düzeylerde olduğu test edilmiştir.

Sonuçta jelatinaz enzim üretimi gösteren suşların farklı bakterilere ait olduğu ve jelatinaz enzim aktivitesi göstermeyen suşlarda da plasmid eliminasyonu olarak test edilmesi dirençlilik fenomeninin olup olmadığının anlaşılması için uygulanmıştır.

### 2.7. Jelatinaz enziminin plasmid ile ilişkisinin saptanması

Koyun derilerinden bakterilerde Jelatinaz enzimini üreten dirençlilik olayının plasmide bağlı olup olmadığının araştırılması için, dirençli örnekler sıvı

besiyerlerine ekilerek inkübasyona bırakılmışlardır. 18 saat üretilen bakteriler 10<sup>-2</sup> sulandırma ile jelatin içeren halofilik karakterdeki agar ortamına yayma yöntemiyle ekilmiştir.

Başlangıçta antibiyotik dirençliliği ve jelatinaz dirençliliği taşıyıp taşımadığı test edildikten sonra, dirençlilik mekanizmasının plasmid kodlu olmadığı saptanmıştır.

Alternatif yöntem olarak çizgi şeklinde ekilerek üretilen suşlardan steril toplu iğne kullanılarak jelatin içeren besi ortamına ekim yapıldıktan sonra jelatinaz üretimine karşı hassasiyet aranmıştır.

### 2.8. Jelatinaz üretimi ve antibiyotiklere hassas suşların izolasyonu

Jelatinaz üretimine hassas olan suşların seçilmesi için akridineorange'li halofilik buyyonlara *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. suşları inoküle edilerek 3 gün 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, halofilik agarlara 10<sup>-2</sup> sulandırma ile her suş için 2'şer örnek petriye yayma şeklinde ekim yapıp 30 °C'de 3 gün etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Yine inkübasyon sonucunda, jelatinaz üretimi pozitif ve negatif suşlarda herhangi bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. Aynı anda jelatinaz pozitif olan halofilik *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. suşlarına antibiyotik testi uygulanarak, jelatinaz pozitif ile antibiyotik hassasiyeti arasındaki ilişki araştırılmıştır.

### 3. Bulgular

Tuzlanmış deri numunelerinde *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. suşları izole edilmiştir. Tuzlanmış koyun derilerinden izole edilen halofil *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. suşlarının uygulanan altı farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları testlerinin hem dirençlilik ve hemde duyarlılık profillerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 1 ve 2). Her iki bakteri çeşidinde de dirençlilik % de oranlar daha yüksek gözlenmiştir. Bakterinin dirençli profil sergilemesi bakteri çoğalmasının ve derideki kontaminasyonun hızını güçlendirmektedir.

Jelatinaz üretimini plasmid eliminasyonu testleri sonucunda denenen suşlarda plasmid kodlu olmadığı bulunmuştur. Çalışma sırasında koyun derilerinden toplam 280 adet olmak üzere 221 adet *Streptococcus* spp. suşları ve 59 adet *Staphylococcus* spp. bakteri suşları izole edilmiştir. 17 adet *Streptococcus* spp. suşlarında jelatinaz pozitif (% 7.69) olduğu ve 204 (% 92.30) suşta ise jelatinaz negatif sonuç bulunmuştur. 3 adet *Staphylococcus* spp. suşlarında jelatinaz pozitif (% 5.08) olduğu ve 56 (% 94.91) suşta ise jelatinaz negatif sonuç bulunmuştur. Jelatinaz pozitif izolatların yapılan plasmid eliminasyon testlerinden sonra plasmid kodlu jelatinaz üretimine rastlanmamıştır.

Tablo 1. Tuzlanmış koyun derilerinden ayrımı yapılan halofil *Streptococcus* spp. suşlarının farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları

Antibiyotikler	Trimetazidin	Ampisilin	İmipenem	Metronidazol	Ceftazidime	Chloramhenicol
Dirençli	% 92	% 76	% 72	% 97	% 67	% 64
Duyarlı	% 8	% 24	% 28	% 3	% 33	% 36

Tablo 2. Tuzlanmış koyun derilerinden ayrımı yapılan halofil *Staphylococcus* spp. suşlarının farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları

Antibiyotikler	Trimetazidin	Ampisilin	İmipenem	Metronidazol	Ceftazidime	Chloramhenicol
Dirençli	% 95	% 86	% 68	% 89	% 72	% 59
Duyarlı	% 5	% 14	% 32	% 11	% 28	% 41

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Hayvan derisinin havada, suda ve toprakta bulunan mikroorganizmaları içerdiği, canlı hayvanlarda bu mikroorganizmaların çoğunun deri üzerinde çok az etkiye sahip olduğu fakat kesim sonrasında ölü hayvandan elde edilen derinin çıkarılmasından sonra bu organizmaların gelişmek için tam bir ortam bulduğu belirtilmiştir. Özellikle hayvandan çıkarılan deri, kan ve pislikler ile bulaşmış, sıcak, ıslak ve ortamdaki mikroorganizmalarla bulaşmış durumda ise kesimden altı saat sonra bakteri üremesinin büyük boyutlara ulaştığı ve derinin yapısına önemli ölçüde zarar verdiği bundan dolayı da yeni yüzülen derilerin kesimden hemen sonra bol su ile yıkanması gerekmektedir (Castro-Escarpullı, et al., 2002).

Ekstrem halofilik bakteriler % 10-15 NaCl konsantrasyonun üzerinde çoğalırlar. Optimal çoğalmaları ise % 20 NaCl konsantrasyonun üzerindedir (Lanyi, 1974). Çalışmamızda tuzlanmış koyun derisinden izole edilen halofilik bakteriler % 10-30 NaCl konsantrasyonu içeren besi ortamlarında çoğaltılarak optimal tuz konsantrasyonunun % 10 olduğu tespit edilmiştir.

Ekstremofilik olarak sınıflandırılan mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12 ) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 5-30) yaşamak için ortama adapte olmuşlardır (Niehaus et al., 1999). Bu şekildeki ortam şartları bakımından farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979).

Ekstrem halofilik mikroorganizmaların özellikle tuz konsantrasyonu yüksek olan ortamlarda yaşam kalitelerinin daha zengin olduğu ve bol buldukları, izolasyonlarında ise basit besi ortamlarında sadece ortamın tuz konsantrasyonu arttırılarak kolayca izole edilebildikleri görülmüştür. Tuzun derilerin mikroorganizma kontaminasyonuna karşı çok etkili bir koruyucu vazifesi gördüğü göz önüne alındığında tuzun koruyucu olarak kullanıldığı ve ekstrem halofilik mikroorganizmaların gelişmesi diğer mikroorganizmalara göre çok daha kolay olacaktır. Dolayısıyla derilerin enzim salgılayarak yer yer çürümelerle beraber parçalanmalarına neden olan bu tip bozulmasında halofilik mikroorganizmalar önemli bir role sahiptir. Bu durum özellikle tuzlanmış derilerde ve deri endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Halofilik mikroorganizmaların derilerde neden olduğu bu bozulmalar özellikle onların hücre dışı enzim aktiviteleri (jelatinaz, kollagenaz) ile ilgilidir. Ancak yüksek tuz konsantrasyonlarında gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik uygulamalar için ise bu mikroorganizmaların jelatinaz ve kollagenazları büyük ilgi çekmektedir.

Halofilik bakteriler ortamdaki tuz konsantrasyonuna göre; tuza toleranslı, az, orta ve kuvvetli halofilik olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmıştır. Bu bakterilerin tuzsuz ortamda gelişmemesi, tuza toleranslı bakterilerle aradaki en önemli farkı oluşturmaktadır (Birbir & Ilgaz, 1996). Bu çalışma kapsamında tuzlanmış olarak muhafaza edilen hayvan derilerinde halofilik bakterilerin varlığı kısmi jelatinaz aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma materyalini oluşturulan koyun derilerinden izole edilen bakterilerin üretilmesinde beş farklı (% 10, % 15, % 20, % 25 ve % 30) ve ara formlarda tuz konsantrasyonu kullanılmıştır. Bakterilerin gelişimi için en uygun tuz konsantrasyonun % 10 olduğu, % 10'un üzerindeki tuz konsantrasyonunda üremenin yavaşladığı, tuz içermeyen besi ortamında bakterilerin çoğalma yeteneğini kaybettikleri gözlenmiştir. Bu bulgu çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının halofilik karakterde olduğunu göstermektedir.

Kesim esnasında hayvan derilerinin zedelenmesi, tuzlanan derilerin kesikli bölgelerinde veya deri yüzeyinde yüzülme hatasından kaynaklanan et kalıntılarının bulunması, halofilik bakterilerin derideki kollojenimsi dokuyu jelatinaz enzimi sayesinde parçalamasına neden olmakta, zamanla deri kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir.

Çalışmada denenen halofilik bakteriler arasında, jelatinaz aktivitesi gösteren suşların beklenen sıklıkta olmadığı gözlenmiştir. Bu konuda muhtemelen derilerin depolama koşulları ve süresi etkili olmuştur.

Jelatinaz, lipaz, sellulaz ve beta-galaktozidaz kimya endüstrisinde, yem katkı maddesi olarak ve gıda sektörü gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (Birbir & Sesal, 2003). Teste tabii tutulan bakterilerin jelatini hidrolize etme yeteneği birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada disk diffüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram testinde pozitif jelatinaz aktivitesi gösteren bakterilerin denenen antibiyotiklere karşı farklı düzeylerde duyarlılık profili gösterdikleri belirlenmiştir. En az duyarlılık *Streptococcus* spp. suşlarında Metronidazol ve Trimetoprimde antibiyotiklerine karşı oluşurken, *Staphylococcus* spp. suşlarında ise Metronidazol ve Amficillin antibiyotiklerine karşı gözlenmiştir.

Jelatinaz, bazı mezofil ve halofilik bakteriler tarafından salgılanan bir enzimdir. Enfeksiyon etkeni olan klinik izolatlar arasında *Enterococcus*'ların % 45'inde farklı düzeylerde jelatinaz aktivitesi tespit edilmiştir (Qin, Singh, Weinstock, & Murray, 2000). Bakterilerin jelatini hidrolize etme yeteneği genellikle jelatin tüp yöntemiyle test edilmektedir (Vera & Demoff, 1974). Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, Castro-Escarpullı et al. (2002) genellikle % 0.5-8'e kadar değişen oranlarda jelatin içeren besi ortamları kullanılmıştır. Bu çalışmada jelatin aktivitesinin tayininde % 1.5 oranında jelatin içeren besi ortamları hazırlanmıştır.

Özellikle koyun derisinden izole edilen halofilik bakterilerin % 1.5 optimum jelatinaz aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. Besi ortamında jelatin oranının azalması veya arttırılması durumunda jelatinaz aktivitesini belirleyen zon çapında azalma gözlenirken bazılarında zon oluşmamıştır.

Çalışmada denenen halofilik bakteriler arasında, jelatinaz aktivitesi gösteren suşların beklenen sıklıkta olmadığı gözlenmiştir. Bu konuda muhtemelen derilerin depolama koşulları ve süresi etkili olmuştur.

Sonuç olarak; çalışmada tuzlanmış koyun derilerinde halofilik bakteri izolasyonu yapılarak derilerin parçalanmasına neden olan jelatinaz enziminin üretimini araştırılırken önemle üzerinde durulması ve dikkat edilmesi gereken hususları şu şekilde özetleyebiliriz.

Van yöresinde küçükbaş (koyun) hayvan kesimi yapılan ve halkın tüketimine sunulan et benzeri ürünlerin yanı sıra, derilerinde işlenebilirliğinin belli zaman sürecinde yapılması hemen deri işletmeciliğinde işlenebilir pozisyona sokulmaması, yörede yeterli ve etkin bir deri işletmeciliğinin olmaması, tuzlanarak muhafaza edilen koyun derilerinin yıllarca uygun olmayan depolama şartlarında bekletilmesi yani kontrollü ve yeterli olmayışı, koyun derilerin teknik personel tarafından değil de halkın doğmatik bilgileriyle yeterli tuz doyunluğunu oluşturacak ön işlemlerinin yapılmaması, koyun derilerin bilinçsiz kişiler tarafından zedelenerek yüzülmesi, yüzülmüş koyun derilerinin yeterli derecede temizlenmeden muhafaza edilmesi ve kokuşmayı sağlayacak bakterilerin üremesine olanak sağlayacak bazı şartların oluşturulması, jelatinaz enzim aktivitesi gösteren halofilik karakterde bakterilerin kontrolsüz çoğalmaları.

Yukarıda belirtilen tüm şartların oluşturulması ile birlikte ülke ekonomisine bu yolla önemli sayılabilecek kayıplar verildiği düşüncesindeyiz.

## Kaynaklar

- Bailey, D. G., & Birbir, M. (1993). A Study of the Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine-cured Cattle Hides. *JALCA*, 88, 285-293.
- Birbir, M., & Ilgaz, A. (1996). Isolation and Identification of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality. *Journal of Society of Leather Technologist and Chemists*, 80, 147-153.
- Birbir, M., & Sesal, C. (2003). Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Türk. J. Biol. TÜBİTAK*, 27, 7-22.
- Birbir, M., Kalli, N., & Johansson, C. (2002). Examination of Salt Quality of Şereflikoçhisar Lake Used in Turkish Leather Industry. *Journal of Society of Leather Technologist and Chemists*, 86, 112-117.
- Çaklı, Ş., & Kışla, D. (2003). Su Ürünlerinde Mikrobiyal Kökenli Bozulmalar ve Önleme Yöntemleri E.Ü. *Su Ürünleri Dergisi*, 20 (1-2), 239-245.
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M. J., Aguilera-arreola, G., Soler, L., Fernandez-rendon, E., Aparicio, G. O., Guarro, J., ... Chacon, M. R. (2002). Characterisation of *Aeromonas* spp. Isolated from Frozen Fish Intended for Human Consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 41-49.
- Çetin, E. T., (1968). Pratik Mikrobiyoloji. İstanbul Üniversitesi. 2. Baskı. Menteş Matbaası. İstanbul.
- DasSarma, S., & Arora, P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., & Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles Current Opinion. *Chemical Biology*, 5, 144-151.
- Grant W. D. (2004). Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B*, 359, 1249- 1267.
- Kalender, D., & Yenigül, B. (2009). Deri Örneklerindeki Cr (VI)'nin Duyar Tayinine İlişkin Voltammetrik Yöntem Geliştirilmesi. 1. *International*

- Leather Engineering Symposium*, April 29th -May 1st, İzmir, Turkey, 335.
- Kallenberger, E. W. (1984). Halophilic Bacteria in Brine Curing. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 79, 104-111.
- Mevarech, M., Eisenberg, H., & Neumann, E. (2000). Malate Dehydrogenase Isolated from Extremely Halophilic Bacteria of the Dead Sea. 1. *Purification and Molecular Characterization. Biochemistry*, 16 (17), 1977.
- Mudryk, Z., & Donderski, W. (1991). Effect of Sodium Chloride on the Metabolic Activity of Halophilic Bacteria Isolated From the Lake. *Gardno Estuary Estuaries*, 14 (4), 495-496.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 711-729.
- Öndoğan, Z., Pamuk, O., Tama, D., Yaşatan, İ., & Akman, E. Z. (2009). CAD Sistemleri Yardımıyla Deri Materyalinde Yüzey Kullanım Verimliliğinin Arttırılmasına Yönelik Giysi Modeli Önerilmesi, Hammaddede Olarak Deri Materyalinden ve Dokuma Kumıştan Gömlek Üretim Sürecinin Karşılaştırılmasına Yönelik Bir Çalışma. 1. *International Leather Engineering Symposium*, April 29th May 1st, 2009, İzmir, Turkey.
- Oren, A. (2002). Halophilic Microorganisms and their Environments (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology). *Springer*, 1 edition, August 31, 600 pages
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. *Infection and Immunity*, 68, 2579-2586.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409, 1092-1101.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., & Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89, 78-90.
- Vera, H. D., & Demoff M. (1974). Culture media, p. 881-929. In E. H. Lennette, E. H. Spaulding, and J. P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- Zeikus, J.G. (1979). Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enzyme Microb Technol*, 1, 243-252.
- Zusman, T., Rosenshine, I., Boehm, G., Jaenicke, R., Leskiw, B., & Mevarech, M. (1989). Dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (32), 18878-18883.