

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

***recN*, *flaA* ve *ftsY* GENLERİNE GÖRE *Anoxybacillus* CİNSİNİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Dilşat Nigar ÇOLAK

**TEMMUZ 2007
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***recN, flaA* ve *ftsY* GENLERİNE GÖRE *Anoxybacillus* CİNSİNİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

Biyolog Dilşat Nigar ÇOLAK

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.07.2007

Tezin Savunma Tarihi : 24.07.2007

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fahri UÇAR

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2007

ÖNSÖZ

“*recN*, *flaA* ve *ftsY* Genlerine Göre *Anoxybacillus* Cinsinin Moleküler Analizi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve laboratuvar çalışmalarının ve tez yazımının her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Yrd.Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan değerli arkadaşlarım Hakan KARAOĞLU’na, Arş.Gör. Kadriye İNAN’a, Derya YANMIŞ’a, , Murat KAÇAĞAN’a, Esra ERBAŞ’a ve Arş.Gör. Mutlu GÜLTEPE’ye çok teşekkür ederim. Çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a da teşekkür ederim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Dilşat Nigar ÇOLAK
Trabzon 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
TABLO LİSTESİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Özellikleri	3
1.3. Korunmuş Genlerin Filogenetik Analizlerde Kullanılması.....	5
1.3.1. Korunmuş Genlerin Filogenetik Analizlerde Kullanılabilmesi İçin Taşınması Gereken Bazı Özellikler.	6
1.3.2. <i>recN</i>	7
1.3.3. <i>flaA</i>	8
1.3.4. <i>ftsY</i>	9
1.4. Filogenetik Analizlerde Kullanılan Bazı Programlar	10
1.4.1. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	10
1.4.2. CLUSTALW (Clustal W Multiple Sequence Alignment Program)	10
1.4.3. BIOEDIT	11
1.4.4. FastPCR	11
1.5. Bakteri Sistematğinde Kullanılan Diğer Bazı Yöntemler	11
1.5.1. Genotipik Yöntemler	11
1.5.1.1. DNA Baz Kompozisyonu	12
1.5.1.2. DNA-DNA Hibridizasyonu)	13
1.5.1.3. DNA Parmak İzi Analizleri.....	15
1.5.1.3.1. PCR'a Dayalı Yöntemler	15

1.5.1.3.1.1.Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	15
1.5.1.3.1.2.Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR)	16
1.5.1.3.1.3.Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP).....	16
1.5.1.3.2. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi	17
1.5.1.4. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması	17
1.5.1.5. 16S-23S Genleri Arasındaki "Spacer" Bölgeler	18
1.6. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler	23
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri	23
2.2. Metotlar	24
2.2.1. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu	24
2.2.2. İzolatların DNA Dizini Analizleri	25
2.2.2.1. Primer Sentezi	25
2.2.2.2. <i>recN</i> Geninin PCR Yardımı İle Artırılması	25
2.2.2.3. <i>flaA</i> Geninin PCR Yardımı İle Artırılması	26
2.2.2.4. <i>ftsY</i> Geninin PCR Yardımı İle Artırılması	26
2.2.2.5. <i>recN</i> , <i>flaA</i> ve <i>ftsY</i> Genlerinin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Genbank'taki Sıralarla Karşılaştırılması	25
3. BULGULAR.....	29
3.1. <i>recN</i> Geni Analizleri.....	29
3.2. <i>flaA</i> Geni Analizleri.....	31
3.3. <i>ftsY</i> Geni Analizleri	36
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇLAR	47
6. ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49
8. EKLER.....	58
Ek 1. <i>Anoxybacillus contaminans</i> Bakterisinin <i>recN</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları	57
Ek 2. <i>Anoxybacillus puschinoensis</i> Bakterisinin <i>recN</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları	58
Ek 3. <i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> Bakterisinin <i>recN</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları	59
Ek 4. <i>Anoxybacillus amylolyticus</i> Bakterisinin <i>recN</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları..	60

Ek 5.	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.	61
Ek 6.	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları...	62
Ek 7.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.....	63
Ek 8.	<i>Anoxybacillus ayderensis</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.....	64
Ek 9.	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.	65
Ek 10.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> Bakterisinin <i>flaA</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları	66
Ek 11.	<i>Anoxybacillus contaminans</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları. .	67
Ek 12.	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları	68
Ek 13.	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.	69
Ek 14.	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları...	70
Ek 15.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.....	71
Ek 16.	<i>Anoxybacillus ayderensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.....	72
Ek 17.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.	73
Ek 18.	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları...	74
Ek 19.	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i> Bakterisinin <i>ftsY</i> Geninin Baz ve Protein Sıraları.	75
	ÖZGEÇMİŞ.....	76

ÖZET

Bu çalışmada, farklı bölgelerden izole edilerek *Anoxybacillus* cinsi içerisinde dahil edilmiş olan 9 bakteri türünün *recN*, *flaA* ve *ftsY* genleri açısından moleküler analizi yapıldı.

Anoxybacillus flavithermus, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus* bakterilerinin genomik DNA'sı uygun yöntemlerle izole edildi. *recN*, *flaA* ve *ftsY* genleri için dizayn edilen primerler kullanılarak, PCR yoluyla ilgili genler çoğaltıldı. Elde edilen genlerin baz dizileri otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Belirlenen diziler, BLAST (NCBI), "BIOEDIT" (Thompson ve ark., 1997) ve 'Clustal W Multiple Sequence Alignment' programları kullanılarak birbirleri ile ve Genbank'taki diğer sıralarla karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, *recN* genin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin tanımlanmasında uygun bir gen olmadığına karar verildi. *flaA* geninin *Anoxybacillus* cinsine özgü korunmuş bölgeler taşıdığı belirlendi. Buna göre *flaA* geninin, *Anoxybacillus* cinsinin üyelerinin tanımlanmasında tek başına kullanılmasının uygun olmadığı, buna rağmen farklı genotipik yöntemlere ek olarak kullanabileceği belirlendi. G + C içeriği açısından incelenen *ftsY* geninin ortalama % 1,4 farklılıkla tüm genomun G + C içeriğini yansıttığı belirlendi. Buna göre *ftsY* geninin, *Anoxybacillus* cinsi için organizmanın tüm genomunun sahip olduğu bilgiyi yansıtan bir gen olduğuna karar verildi.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus*, *recN*, *ftsY*, *flaA*, PCR.

SUMMARY

Molecular Analysis of The Genus *Anoxybacillus* Based on Sequence Similarity of The Genes *recN*, *flaA* and *ftsY*

Molecular analysis of 9 *Anoxybacillus* species isolated from different regions was carried out based on sequence similarity of the genes *recN*, *flaA* and *ftsY*.

Genomic DNA's of the bacteria *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* and *Anoxybacillus amylolyticus* was isolated by the procedure of Sambrook et al. (1989). Based on available genom sequences in Genbank, the consensus primers were designed and *recN*, *flaA* and *ftsY* genes were amplified by PCR with using these primers. The sequences of the genes *recN*, *flaA* and *ftsY* were determined by automatical sequence analysers (Macrogen, South Korea). Defined sequences were compared with each other and the other bacteria present in Genbank by using the programs BLAST (NCBI), "BIOEDIT" (Thompson et al., 1997) and 'Clustal W Multiple Sequence Alignment Program'. Based on the results obtained from comparisons of the DNA sequences, we conclude that the gene *recN* is not an appropriate gene for determining the species belong to the genus *Anoxybacillus*. The gene *flaA* has conserved regions specific to the genus *Anoxybacillus*. This gene can not be used for determining the species belong to the genus *Anoxybacillus* alone, but can be used as an additional method to the other genotypic methods. The gene *ftsY* was investigated for it's G + C content. A mean difference of 1,4% was observed between the G + C content of the gene *ftsY* and the G + C content of the whole genome. These results showed that the gene *ftsY* can be used to represent whole G + C content of a bacteria.

Key Words: *Anoxybacillus*, *recN*, *ftsY*, *flaA*, PCR.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Şekil 1: RecN_F02 ve RecN_R02 primerleri ile *Anoxybacillus* genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan *recN* genine ait DNA parçaları 30
- Şekil 2. Fla_F1 ve Fla_R1 primerleri ile *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan *FlaA* genine ait DNA parçaları 31
- Şekil 3. Bazı bakteri türlerinin *recN* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç. 32
- Şekil 4. Bazı bakteri türlerinin *flaA* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç 35
- Şekil 5. Bazı bakteri türlerinin *ftsY* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç 38
- Şekil 6. *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin 16S rRNA dizilerine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç 42
- Şekil 7. Flagellin protein dizilerine dayanarak dizayn edilen FlaA_F1 ve FlaA_R1 primerleri. 44

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bu çalışmada kullanılan bakteri türlerinin genel özellikleri.	4
Tablo 2. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar.....	22
Tablo 3. Kullanılan primerler.....	27
Tablo 4. <i>Anoxybacillus</i> türlerinin <i>recN</i> gen dizileri arasındaki benzerliklerinin yüzde değerleri	30
Tablo 5. <i>Anoxybacillus</i> türlerinin <i>flaA</i> geni açısından benzerlik oranları.....	33
Tablo 6. <i>Anoxybacillus</i> cinsine ait olan türler için elde edilen G + C değerleri.....	37

SEMBOLLER DİZİNİ

AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
Rep-PCR	: Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
<i>recN</i>	: DNA tamiri ve genetik rekombinasyon proteinini kodlayan gen
<i>flaA</i>	: Flagellin proteinini kodlayan gen
<i>ftsY</i>	: GTPaz sinyal tanıma proteinini kodlayan gen

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

1966 yılında Thomas Brock, Yellowstone Ulusal Parkı'ndaki sıcak su kaynaklarında bazı mikroorganizmaların yaşayabildiğini keşfetmiştir. Brock'un bu keşfinden sonra dünyanın farklı bölgelerindeki jeotermal kaynaklardan çok sayıda termofilik mikroorganizma izole edilmiştir. *Anoxybacillus* cinsi de bu şekilde sıcak su kaynaklarından izole edilerek sistematığe kazandırılmıştır. Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında tanımlanan bu cins şu ana kadar isimlendirilen 9 tür içermektedir. Bunlar; *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus vainovkiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amyolyticus*'dur.

Anoxybacillus cinsine ait bütün türler termofilik karakterlidir. Termofilik bakteriler, diğer bakterilerin büyüemediği ekstrem sıcaklık şartlarına adapte olabilen mikroorganizmalardır. Bu canlılar özellikle yüksek sıcaklıklara dayanıklı enzimlere sahip olmalarından dolayı biyoteknolojide oldukça önemlidirler.

Mikroorganizmalar ve enzimleri birçok endüstriyel, tıbbi ve çevresel uygulamada kullanılmaktadır. Bu uygulamalar yüksek sıcaklık, basınç, iyonik güç ve pH'lı ortamlarda gerçekleştirildiğinden bu ekstrem şartlara karşı dayanıklı olan enzimlere ihtiyaç vardır. Endüstride kullanılan birçok enzim 50°C'nin üzerindeki sıcaklığa maruz kalır. Yüksek sıcaklıklarda reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve substrat çözünürlüğü artar. Bu şekilde reaksiyon daha hızlı gerçekleşir ve daha fazla ürün oluşumu sağlanmış olur (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001). Ayrıca yüksek sıcaklıklarda kontaminasyon riski de azalır çünkü kontaminasyona neden olan bakterilerin çoğu mezofilik karakterlidir ve yüksek sıcaklıkta gelişme gösteremez (Burg, 2003).

Termofilik enzimlerin yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dur. PCR reaksiyonlarında en çok kullanılan DNA polimeraz olan Taq DNA polimeraz termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiştir. PCR reaksiyonlarında iki DNA zincirini birbirinden ayırmak için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda Taq DNA polimeraz kararlılığını koruyabilmektedir (Aguilar, 1996). Yine

termofilik bakteriler olan *Thermococcus litoralis* ve *Pyrococcus furiosus*'dan elde edilen DNA polimerazlar PCR reaksiyonlarında kullanılmaktadır.

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler sayesinde termofilik enzimlerden bazıları saflaştırılıp klonlanarak mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimler moleküler biyoloji, kağıt endüstrisi, gıda ve nişasta endüstrisi, petrol endüstrisi ve kimya endüstrisi gibi bir çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, kimya endüstrisinde ve farmakolojide kullanılan bazı enzimler, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar ve DNA'yı modifiye edebilen bazı enzimler gösterilebilir.

Endüstriyel öneme sahip enzimleri sentezleyebilen termofilik bakterilerin tanımlanması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki biyoteknolojik öneme sahip bu bakteri grubunun sınıflandırılması ve tanımlanması için hala yapılması gereken çok şey vardır (Ash ve ark., 1991; Lama ve ark., 2004; Lyon ve ark., 2000).

Tüm üyeleri termofilik olan *Anoxybacillus* cinsi Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında Bacillus cinsinden ayrılmıştır (Pikuta ve ark., 2000). Sürekli bir değişim içerisinde olan *Anoxybacillus* cinsine yeni üyeler eklenmeye devam etmektedir. Bu cinse ait olan tüm üyeler 16S rRNA gen dizileri bakımından birbirine %97 veya daha fazla benzerlik göstermektedir. Bu nedenle 16S rRNA gen dizileri bu cinsin üyelerini diğer cinslerden ayırmada yeterli olurken, cins içerisindeki bireyleri birbirinden ayırmada yeterli olamamaktadır. Bakteri sınıflandırılmasında kullanılan diğer bir yöntem olan DNA-DNA hibridizasyonu hala tür tanımında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, çok zaman alan bir yöntem olmasının yanı sıra, farklı araştırmacılar tarafından veya farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların birbirinden farklılık gösterebilmesi nedeni ile *Anoxybacillus* cinsinin sınıflandırılmasında farklı yöntemlerin arayışına gidilmiştir. Bunlardan bir tanesi korunmuş gen dizilerinin karşılaştırılması yöntemidir. Korunmuş genler, bakterilerin filogenetik yakınlıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yapılardır. Bu çalışmada, bazı korunmuş genlere ait dizilerden yararlanılarak *Anoxybacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılan türler arasındaki benzerliklerin ortaya çıkarılması ve bu dizilerin *Anoxybacillus* cinsi üzerindeki sistematik çalışmalarında kullanabilir hale getirilmesi hedeflenmiştir.

1.2. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi 2000 yılında Pikuta ve arkadaşları tarafından *Bacillus* cinsinden ayrılarak sistematikteki yerini almıştır. Pikuta, gübreden elde ettiği bakterinin fenotipik özelliklerinin ve 16S rRNA dizilerinin *Bacillus* cinsinden farklı olduğunu görmüştür. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları da bu bakterinin farklı bir bakteri olduğunu göstermiştir. Buna dayanarak *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T adı verilen bakteri *Bacillus* cinsinden ayrılmış ve yeni bir cins olarak tanımlanan *Anoxybacillus* cinsi içine dahil edilmiştir. *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T türü ile yakın benzerlik gösteren *Bacillus flavothermus*'da *Bacillus* cinsinden ayrılarak *Anoxybacillus* cinsine dahil edilmiş ve *Anoxybacillus flavithermus* adını almıştır. Bu cinsin *Bacillus* cinsinden en önemli farkı 16S rRNA gen dizileridir. *Anoxybacillus* ve *Bacillus* cinslerine ait bireylerin 16S rRNA gen dizileri arasında %95'den az benzerlik vardır.

Anoxybacillus cinsinin tip türü *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T'dir. Cins isminin başına getirilen 'anoksi' eki 'oksijensiz' anlamındadır ve tip tür olan *Anoxybacillus pushchinoensis*'in ilk tanımlandığında anaerob bir bakteri olduğu düşünüldüğünden kullanılmıştır. Fakat daha sonra Pikuta ve arkadaşları (2003) bu bakterinin zorunlu anaerob değil fakültatif anaerob olduğunu belirlemiş ve *Anoxybacillus* cinsinin zorunlu anaerob özelliği, aerotolerant veya fakültatif anaerob olarak değiştirilmiştir.

Anoxybacillus cinsine ait olan bakterilerin çoğu termal kaplıcalardan izole edilmekle beraber, çamurdan (*Anoxybacillus flavithermus*), gübreden (*Anoxybacillus pushchinoensis*) ve jeotermal topraklardan (*Anoxybacillus amylolyticus*) izole edilen türler de mevcuttur. *Anoxybacillus contaminans* türü ise kontamine olmuş jelatinden izole edilmiştir. Optimum büyüme sıcaklıkları ortalama 55°C olan bu bakteriler 37- 60°C arasında hayatta kalabilmektedirler.

Özellikler	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	<i>Anoxybacillus contaminans</i>	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	<i>Anoxybacillus kestabolensis</i>	<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>
DSMZ/ NCIBM numarası	DSM 2641	DSM 12423	DSM 15866	DSM 14988	NCIBM 13933	NCIBM 13971	NCIBM 13972	NCIBM 13956	DSM 15939
Kaynak	Sıcak su Kaynağı, Yeni Zelanda	Pushchino araştırma bölgesi, Rusya	Kontamine olmuş jelatin	Kamchatka Yarımadası, Rusya	Gönen Kaplıcası, Türkiye	Kestanbol Kaplıcası, Türkiye	Ayder Kaplıcası, Türkiye	Voinovskie Kaplıcası, Rusya	Mount Rittmann, Antarktika
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Gram Boyanma	+	+	Gram değişken	+	+	+	+	+	+
Solunum	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob
Hücre Şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Spor Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Büyükük	0,85 x 2,3-7,1µm	0,4-0,5 x 2,5-3,0 µm	0,7-1,0 x 4,0-10,0 µm	1,0 x 2,5-8,8 µm	0,75 x 5,0 µm	0,65 x 4,75 µm	0,55 x 4,60 µm	0,4 -0,6 x 1,5-5,0 µm	0,5 x 2,0-2,5 µm
Sıcaklık Aralığı	30-72°C	37-65°C	50-60°C	38-67°C	40-70°C	40-70°C	30-70°C	30-64°C	45-65°C
Optimum Sıcaklık	60°C	62°C	50°C	60°C	55-60°C	50-55°C	50°C	54°C	61°C
pH aralığı		8,0-10,5	4-5/9-10	5,7-9,9	6,0-10,0	6,0-10,5	6,0-11,0		
Optimum pH	6,0-9,0	9,5-9,7	7,0	6,8-8,5	7,5-8,0	7,5-8,5	7,5-8,5	7,0-8,0	5,6
Optimum NaCl (%)	%2,5	%1	%5		%4	%2,5	%1,5	% ≤ 3	%0,6
Katalaz	+	-	+	-	+	+	+	+	+
DNA G+C (mol %)	41,6	42,2	44,4	42,3	42,8	50	43,6	43,9	43,5

Tablo 1. Bu çalışmada kullanılan bakteri türlerinin genel özellikleri.

Bu cinse ait üyeler Gram pozitif, endospor oluşturan bakterilerdir. Orta dereceli termofilik (37-60°C) olan üyeler hareketli veya hareketsiz olup alkalofilik veya alkalotolerant özellik gösterirler. G+C içeriği % 42-50 arasında değişen bu cinsin tanımlanan türleri *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*'dur.

1.3. Korunmuş Genlerin Filogenetik Analizlerde Kullanılması

Filogenetik analizlerde DNA-DNA hibridizasyonu tüm genomlar arasındaki benzerliğin bir ölçüsünü verir. Ancak, DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları oldukça pahalıdır ve çok zaman alır, çoğunlukla özelleşmiş materyaller veya radyoaktif işaretçiler gerektirir (Johnson, 1994). Bununla beraber DNA-DNA hibridizasyonu bir çok fiziksel faktörden etkilendiği için, elde edilen veriler farklı laboratuvar veya farklı kişiler tarafından yapılan deneylerde farklılık göstermektedir. Bunun için moleküler analizlerde alternatif yöntemlerin arayışına gidilmiştir. Bakterilerin tanımlanmasında tüm genomun karşılaştırılması gerekir. Tüm genom yerine, genomun tüm özelliklerini yansıtacak olan genlerin karşılaştırılması ile bakteri sınıflandırılmasının kolay ve güvenilir bir şekilde yapılabileceği düşünülmüş ve bu amaçla farklı genler incelenmiştir (Stackebrandt ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar ışığında, farklı kromozomal bölgelerde bulunan en az beş genin bir türü yakın akrabalarından ayırmada yeterli olabileceği sonucuna varılmıştır (Stackebrandt ve ark., 2002). Zeigler (2003), 49 bakteri türü kullanarak yaptığı çalışmada 32 farklı geni incelemiştir. Zeigler'in bu çalışması tüm genom arasındaki farklılıkların belirlenmesinde üç genin (*recN*, *thdF* ve *rpoA*) yeterli olacağını göstermiştir. Yine Zeigler 2005 yılında *Geobacillus* cinsi ile yaptığı çalışmada *recN* genine ait dizinin tüm genomu başarı ile yansıttığını ileri sürmüştü ve sınıflandırma çalışmalarında; cins, tür ve alt tür seviyesinde *recN* dizileri arasındaki benzerliklerin 16S rRNA dizilerine oranla daha güvenilir olduğunu göstermiştir.

2006 yılında yaptıkları bir çalışmada Fournier ve arkadaşları, korunmuş genlerin G+C içeriklerinden yararlanılarak tüm genomun G+C içeriğinin tahmin edilebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bunun için farklı cinslere ait 157 prokaryotik genom kullanılarak, 20 farklı gen üzerinde çalışmışlardır. İlgilenilen her bir genin G+C içeriğini tüm genomun

G+C içeriği ile karşılaştırdıklarında, tüm genomun G + C içeriğini en iyi yansıtan genin yüksek oranda korunmuş bir gen olan *ftsY* olduğunu bulmuşlardır. Buna bağlı olarak, *ftsY* gen dizilerinin prokaryot bir hücre genomunun G+C içeriğinin belirlenmesinde son derece güvenilir olduğunu ileri sürmüşlerdir (Fournier ve ark., 2006).

1.3.1. Korunmuş Genin Filogenetik Analizlerde Kullanılabilirliği İçin Taşınması Gereken Bazı Özellikler

DNA-DNA hibridizasyonu yöntemine alternatif olarak taksonomik analizlerde kullanılacak genlerin belirli özelliklere sahip olması gerektiği belirlenmiştir.

- İlk olarak genin ilgilenilen organizmaların tümünde bulunması gerekir. Organizmanın hayatsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için zorunlu olan genler tüm hücrelerde bulunacağından akrabalık derecelerinin belirlenmesinde bu tip genler ile ilgilenilmelidir.

- İlgilenilen genin türler arasında taşınmış olmaması gerekir. Eğer gen farklı organizmalar arasında taşınmışsa, organizmanın orijini belirlenmede yeterli olmayacaktır. Hayatsal faaliyetlerde görevli olan genlerde transfer oranı çok düşük olduğundan bu genler türler arası benzerliklerin belirlenmesi için idealdir.

- Benzer genlerden oluşan gen grupları dizin analizini zorlaştıracığından, sistematikte kullanılacak genin tüm genomda tek bir kopya halinde bulunması, aranan bir diğer özelliktir.

- Genin filogenetik bilgiyi içerecek uzunluğa sahip olması ve dizin analizi yapılabilecek kadar da kısa olması sınıflandırmada kullanılacak genlerin taşınması gereken özelliklerdir. Bu genler tüm genomun özelliğini yansıtacak nitelikte olmalıdır (Zeigler, 2003).

Bu çalışmada; tüm genomdaki nükleotit dizilişini yansıttıkları savunulan *recN* ve *ftsY* genleri ile kamçı oluşumunda rol oynayan *flaA* geninin dizin analizleri yapılarak, *Anoxybacillus* cinsinin sistematikte ne kadar etkili olduklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3.2. *recN*

DNA tamiri ve genetik rekombinasyon proteini adı verilen bir proteini kodlayan *recN* geni, DNA'da hasarlar meydana geldiğinde uyarılarak ilgili proteinin sentezini başlatır. DNA tamirindeki gerçek rolü tam olarak bilinmemektedir. Zeigler (2003) tarafından yapılan çalışmada, iki organizma arasındaki *recN* gen dizileri benzerliğinin, tüm genom benzerliğini yüksek oranda yansıttığı ileri sürülmüştür. 16S rRNA dizileri ile karşılaştırıldığında, *recN*'in cins ve daha alt seviyelerdeki sınıflandırmada 16S rRNA'dan altı kat daha güvenilir bir araç olduğu belirlenmiştir. Fakat cins üstü seviyelerde (sınıf, takım) 16S rRNA gen dizileri daha güvenilirdir. Zeigler, iki organizmaya ait genomun taşıdığı benzer dizileri göstermek amacı ile şu modeli ileri sürmüştür:

$$SI_{\text{genom}} = -1.30 + 2.25 (SI_{\text{recN}})$$

Bu modelde SI_{recN} , *recN* dizilerindeki benzerliği, SI_{genom} 'da tüm genomdaki benzerliği yansıtır. *Geobacillus* cinsine uygulandığında, bu modelin DNA-DNA hibridizasyon verileri ile örtüşen sonuçlar verdiği görülmüştür (Zeigler, 2005).

Zeigler (2003) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; iki bakteri türünün *recN* gen dizileri arasındaki benzerlik %84'den az ise, bakterilerin genomları arasındaki benzerliğin %70'den az olduğundan %95 emin olabiliriz ve buna göre bu bakteriler farklı türe aittir. *recN* DNA dizileri arasındaki benzerlik %96'dan fazla ise bakterilerin aynı türe ait olduğuna %95 emin olabiliriz. *recN* dizileri arasındaki benzerlik %84 ile %96 arasında ise, genom arasındaki benzerliğin %70'den az veya fazla olduğundan emin olamayız, bu nedenle bu bakterilerin benzerliği için kesin bir sonuca varılamaz.

recN gen dizilerinin sistematikteki önemini belirlemek amacı ile bir diğer çalışma Kunhert ve Korczak (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Zeigler (2003) tarafından yapılan çalışmanın ışığında *recN*, *rpoA* ve *thdF* genlerinin *Pasteurella* cinsindeki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ne kadar etkili olduğu incelenmiştir. Buna göre bu üç genin *Pasteurella* cinsindeki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde yüksek oranda güvenilir olduğu anlaşılmıştır. Üç gen içerisinde en iyi sonuçları veren ise $r = 0.978$ uyum kat sayısı ile *recN*'dir. Elde edilen sonuçlara göre *recN* geni *Pasteurella* cinsi içerisinde genom benzerliklerinin incelenmesinde güvenilir bir araç olarak kullanılabilir. Fakat kesin emin olabilmek için elde edilen sonuçların farklı genlerle desteklenmesi gerekir (Kunhert ve Korczak, 2006).

1.3.3. *flaA*

Bakteri hücrelerinde, yüzeyde bulunan proteinlerdeki amino asit dizileri iç kısımda bulunan proteinlerin amino asit dizilerinden daha fazla çeşitlilik gösterirler (Whittam, 1995). Bu nedenle, yüzeye yakın proteinleri kodlayan genler, türler arasındaki genetik çeşitliliği incelemek için ideal araçlardır. Bu tip çalışmalar için flagellin genlerine olan ilgi giderek artmaktadır.

Kamçı (flagellum) bakterilerin çoğunda hareketi sağlayan organeldir. *FlaA* geni kamçı oluşumunu sağlayan genlerden bir tanesidir. Bu gen yaklaşık olarak 552 amino-asitlik bir proteini kodlar. *flaA* geninin eksikliğinde kamçı oluşumu gerçekleşmemektedir (Schultheiss ve ark., 2004). Bu genin kodladığı flagellin adlı proteinde N- ve C- uçları yüksek oranda korunmuşken, orta kısımlar çeşitlilik gösterir (Schultheiss ve ark., 2004; Heuner ve ark., 1995). Antijenik özellikten sorumlu olduğu düşünülen orta kısmın gösterdiği bu varyasyon kamçı oluşumunu etkilemez. Fischer ve Nachamkin (1991) *flaA* genini PCR yöntemiyle çoğaltmış ve türler arasındaki benzerlik derecelerini incelemiştir. *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* türlerine ait *flaA* genlerinin kodladığı proteinleri karşılaştırdıklarında %77 benzerlik olduğunu görmüşlerdir. Sentezlenen proteinde korunmuş bölgeler olan N-ucunda % 94 ve C-ucunda ise %96 benzerlik olduğu görülmüştür. Orta kısmı oluşturan değişken bölgede ise benzerlik %61'dir.

flaA geni sahip olduğu değişken yapı nedeni ile bakteri sistematigi çalışmaları için ideal bir genidir. Günümüze kadar çok sayıda farklı cinse ait *flaA* geni üzerinde çalışılmıştır Oyofu ve Rollins (1993), çevresel sularda bulunan *Campylobacter* cinsine ait bakterileri tanımlamak için *flaA* genini kullanmıştır. *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin tanımlanması bu gen yardımıyla kolaylıkla ve yüksek spesifite ile gerçekleştirilmiştir. Rasmussen ve ark., (1996), tavuk dışkı örneklerinden *C. coli* ve *C. jejuni* bakterilerini *flaA* ve *flaB* genlerini kullanarak tanımlamıştır. Picken (1992), *Borrelia* cinsi üzerinde yaptığı çalışmalarda, flagellin gen dizilerindeki çeşitliliğin yakın akraba olan *Borrelia* türlerini birbirinden ayırmada uygun bir araç olduğunu ileri sürmüştür. Gray ve Kroll (1995), *Listeria* türlerini tanımlamak için *flaA* geni üzerinden dizayn ettikleri oligonükleotit primerleri kullanmışlardır. Denning ve ark. (1997), yine flagellin genini *Pseudomonas* cinsine ait türleri tanımlamak için kullanmışlardır. Sonuçta kodladıkları proteinlerinin hayati öneme sahip olmaması nedeni ile flagellin genlerinin türler arasında oldukça değişken bir yapı

gösterdiği görülmüştür. Bu değişkenlik nedeniyle flagellin genleri tür ve alt tür seviyesinde bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

1.3.4. *ftsY*

GTPaz sinyal tanıma proteinini kodlayan *ftsY* geni, bakteri genomu içerisinde tek bir kopya halinde bulunan (Cao ve Saier, Jr, 2003) ve yüksek oranda korunmuş olan genlerden bir tanesidir (Gribaldo ve Cammarano, 1998). Yaklaşık olarak 1,144 nükleotid içeren bu genin taşıdığı G + C içeriğinin, tüm genomun G + C içeriğini yansıttığı ileri sürülmüştür (Fournier ve ark., 2006).

Bir organizmanın yeni bir tür olarak tanımlanabilmesi için sistematikteki yerinin, DNA-DNA benzerliğinin ve genomdaki G + C içeriğinin belirlenmesi gerekir (Stackebrandt ve ark., 2002). G + C içerikleri birbirinden % 10'dan daha fazla farklılık gösteren bakteriler aynı cins içerisine dahil edilmezken, aynı cins içerisinde bulunan bakterilerin G + C içeriklerinin yakınlıkları ortalama olarak % 5'dir (Goodfellow ve ark., 1997).

G + C içeriğinin belirlenmesi için bulunan çeşitli metodlar içerisinde (De Ley, 1970; Ko ve ark., 1977; Marmur ve Doty, 1962; Mesbah ve Withman, 1989; Owen ve ark., 1969; Schildkraut ve ark., 1962, Xu ve ark., 2000) Marmur ve Doty'nin "Termal Denatürasyon Sıcaklığı (T_m)" metodu en çok kullanılanıdır. Ancak bu metot çok zaman almakla birlikte çok fazla kalıp DNA gerektirir. Bununla birlikte, T_m değerinin hesaplanması için kullanılan formül (Mandel ve ark., 1970) düşük miktarda veya orta derecede G + C içeren prokaryotik organizmalar için uygun değildir (Ezaki ve ark., 1990). Bu nedenle Fournier ve arkadaşları G + C içeriğinin hesaplanması için farklı yöntemlerin arayışına gitmişlerdir ve yüksek oranda korunmuş olan genlerin G + C içeriğinin, tüm genomun G + C içeriğini yansıtacağını ileri sürmüşlerdir.

G + C içeriği tüm genomun G +C içeriği ile yüksek oranda uyum gösteren ($r^2 > \% 95$) 20 genin, organizmanın G + C içeriğinin belirlenmesinde ne kadar güvenilir olduğunu belirlemek amacı ile Fournier ve arkadaşları tarafından 157 bakteri genomu incelenmiştir. İncelenen genler içerisinde tüm genomun G + C içeriğini en iyi yansıtan, yani G + C içeriği tüm genomun G + C içeriğinden %5'den daha fazla farklı olmayan genler aranmıştır. Her bir gen için ayrı olarak G + C içeriğini yansıtan bir değer (GGC) ile tüm genomun G + C içeriğini yansıtan "gerçek" G + C (RGC) değeri belirlenmiştir. GGC ile

RGC arasındaki uygunluk incelendiğinde *ftsY* geni $r^2 = 0.98$ ile en yüksek değeri vermiştir. Ek olarak, GGC'den faydalanmak suretiyle her bir bakteri için bir "hesaplanan" G + C değeri (CGC) elde edilmiştir. CGC'yi elde etmek için;

$$CGC = (0,9509 \times GGC) + 0,4351$$

formülü kullanılmıştır. Kullanılan korunmuş genin, tüm genomun G + C içeriğini yansıtabilmesi için CGC'nin RGC' den %5'den daha fazla farklılık göstermemesi gerekir. Yapılan analizler sonucunda, çalışılan genler içerisinde organizmanın G + C içeriğini en ideal şekilde yansıtacak genin *ftsY* olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre *ftsY* geninin prokaryotların genomik DNA'sındaki G + C içeriğinin belirlenmesinde pratik ve güvenilir bir araç olduğu sonucuna varılmıştır (Fournier ve ark., 2006).

1.4. Filogenetik Analizlerde Kullanılan Bazı Programlar

1.4.1. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

BLAST diziler arasındaki benzer bölgeleri bulmak için kullanılan bir programdır. Bu program protein veya nükleotid dizilerini Genbank'ta bulunan diğer dizilerle karşılaştırır ve bu dizilerin istatistiksel benzerlik oranlarını hesaplar. BLAST diziler arasındaki fonksiyonel ve evrimsel akrabalık derecelerinin belirlenmesinde kullanılabileceği gibi, ilgilenilen bir genin hangi gen grubuna ait olduğunun belirlenmesinde de kullanılır. Bu programa NCBI (National Center of Biotechnology Information)'ın internet sitesinden (www.ncbi.nlm.nih.gov) ücretsiz olarak ulaşılabilir.

1.4.2. CLUSTAL W (ClustalW Multiple Sequence Alignment Program)

ClustalW çok sayıda protein veya nükleotid dizisinin benzer bölgelerine göre aynı hizaya getirilerek karşılaştırılmasını sağlayan bir programdır. Bu program çok sayıda farklı dizideki biyolojik olarak anlamlı bölgelerden yararlanarak bu dizileri hizalamaya çalışır. Diziler arasındaki en uygun eşleşmeler hesaplanır ve buna göre diziler sıraya sokulur. Bu şekilde diziler arasındaki benzerlikler ve farklılıklar görülebilir. Oluşturulan kladogram ve filogramlar vasıtasıyla evrimsel akrabalıklar görülebilir. Bu programa EBI (European Bioinformatics Institute)' nin internet sitesinden (www.ebi.ac.uk) ücretsiz olarak ulaşılabilir.

1.4.3. BIOEDIT

Bioedit programı biyolojik veya tıbbi araştırmalarda kullanılan protein veya nükleotid dizilerini yüksek kalite ile düzenleyen bir programdır. Dizilerin karşılaştırılarak düzenlenmesi için ClustalW programını kullanır. Benzerliklerine göre düzenlenmiş dizileri Phyliip programını (<http://evolution.genetics.washington.edu/phyliip.html>) kullanarak sunar. TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) programı vasıtası ile de filogenetik ağaçların otomatik olarak oluşturulmasını sağlar. Bu programa Department of Molecular Biology at North Carolina State University'nin internet sitesinden (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) ücretsiz olarak ulaşılabilir.

1.4.4. FastPCR

FastPCR Microsoft Windows için oluşturulan ücretsiz bir programdır. Bu program PCR için kullanılacak primerlerin dizaynı için geliştirilmiştir. Bunun yanında dizilerin gruplandırılması için çeşitli bioinformatik araçlar içerir. FastPCR incelenecek dizilerin G + C içeriklerini otomatik olarak verir. Bu programa www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm adresinden ulaşılabilir.

1.5. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Diğer Bazı Yöntemler

Taksonominin amacı organizmaları tanımlamak ve karşılaştırmak için güvenilir yöntemler elde etmektir. Bir diğer amacı da farklı türdeki organizmaların çeşitliliğini ortaya çıkarmaktır. Mikroorganizmaların sınıflandırılması ve karakterizasyonu için çok sayıda fenotipik ve genotipik yöntem bulunmaktadır (Louws ve ark., 1996). Genotipik yöntemler organizmanın genetik materyalini oluşturan nükleik asitler ile ilgilenirken fenotipik yöntemler organizmanın fiziksel ve biyokimyasal özellikleri ile ilgilenir. Güvenilir bir sınıflandırma için genotipik ve fenotipik yöntemlerden elde edilen bilgilerin birleştirilmesi gerekir. Bu çalışmada sadece genotipik yöntemler üzerinde durulacaktır.

1.5.1. Genotipik Yöntemler

Bakteri sistematiği çalışmalarında önceleri organizmaların morfolojileri ve fizyolojileri gibi fenotipik özellikleri kullanılmaktaydı. Ancak bu özellikler birbirine çok yakın olan organizmaların ayırımında yeterli olamayabilirler. 1960'lı yıllarda DNA'nın

kalıtım ve protein sentezi üzerindeki rolünün anlaşılmasıyla, sınıflandırma çalışmalarında moleküler tekniklerin morfolojik tekniklerden daha başarılı olabileceği düşünöldü. Nökleik asitler tüm bakterilerde bulunur ve bu bakteriler üzerinde geniş çaplı karşılaştırmaları sağlar (Logan, 1994). Ayrıca genetik materyalin çevresel şartlardan etkilenmemesi ve evrimsel yayılış göstermesi daha doğru ve kesin bir sınıflandırılmanın yapılmasını sağlar (Vandamme ve ark., 1996).

Bakteriler arasındaki genotipik farklılıkları ölçmek için ilk olarak bakteri genomundaki baz kompozisyonları (% G+C) karşılaştırılmıştır. Fakat bu teknik sadece yüzeysel bir karşılaştırılmanın yapılmasına olanak sağlar. Günümüzde nükleik asitlere dayanarak bakterilerin sınıflandırılmasını sağlayan çok sayıda teknik mevcuttur (Rosello-Mora ve Amann, 2001). Bu teknikler şu şekilde özetlenebilir.

1.5.1.1. DNA Baz Kompozisyonu

DNA dizilerinin en temel özelliklerinden bir tanesi baz kompozisyonudur. Baz kompozisyonu 4 farklı nükleotit ile ifade edilir, bunlar: Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C) ve Timin (T)'dir. DNA'nın çift zincirli yapısında G/C ve A/T karşılıklı bağ yaptığından dolayı genellikle G+C (veya A+T) içeriğinden bahsedilir (Fickett ve ark., 1992). Bir genomdaki G/C ve A/T oranları genellikle sabitken, (G+C) / (A+T) oranı genomdan genoma değişiklik gösterir (Johnson, 1985). Bir DNA molekülündeki baz kompozisyonu genellikle G+C nükleotitlerinin miktarı ile ifade edilir.

Bakteri sistematüğinde kullanılan ilk yöntem G+C baz oranlarının karşılaştırılmasıdır (Lee ve ark., 1956). Bu teknik iki bakteri arasındaki farklılığın derecesini genomdaki G+C oranlarını karşılaştırarak ölçer. Bakteriler arasında G+C içeriği %24-76 arasında değişiklik gösterir (Torsvik ve ark., 1995). İki bakterinin G+C içeriklerindeki farklılık %10'dan fazla ise bu bakteriler aynı cins içerisinde sınıflandırılmaz. Aynı türe ait olan suşlar arasındaki farklılık ise en fazla %5 olabilir (Rosello-Mora ve Aman, 2001). G+C içeriklerine dayanarak bakterileri sınıflandırma yöntemi genellikle tür ve cinslerin ayrımı için kullanılır ve bakteri sistematüğindeki standart tanımlardan biridir.

Bir genomdaki G+C içeriğini belirlemek için; HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), florimetrik boya bağlayıcı yöntemler, buoyant yoğunluk yöntemleri ve termal denatürasyon yöntemi kullanılmaktadır (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2002). Termal

denatürasyon yöntemi bakteri genomundaki G + C içeriğini belirlemek için en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesidir (Marmur ve Doty, 1962; De Ley, 1970). Bu yöntem, DNA'nın sıcaklığa bağlı denatürasyonu boyunca 260 nm'deki yoğunluğunun ölçümüne dayanır. Bu yöntem için termal üniteye sahip spektrofotometreye ihtiyaç duyulur. DNA molekülünün erime sıcaklığı ile G + C içeriği arasında doğru orantılı bir ilişki vardır (Marmur ve Doty, 1962; De Ley ve ark., 1970).

Bir genomun G + C içeriğini belirlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden bir tanesi de yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinden yüksek verim alınmasına rağmen, sadece bu yöntem için kurulan ve oldukça pahalı olan HPLC sistemine ihtiyaç vardır. Ayrıca verim alınabilmesi için yöntemin oldukça yüksek frekansta uygulanması gerekir (Tamaoka ve Komagawa, 1984). Son yıllarda G + C içeriğinin ölçümünde florimetrik boya bağlayıcı yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemde genel olarak çift zincirli DNA florimetrik bir boya (örneğin CYBR Green I) ile boyanır ve DNA'nın termal denatürasyonuna bağlı olarak artan floresan ışık RT-PCR (Real Time PCR) vasıtasıyla ölçülür (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2002).

Son yıllarda, bakteri genomunun G + C içeriğinin hesaplanmasında karşılaşılan güçlükler nedeni ile farklı yöntemlerin arayışına gidilmiştir. Fournier ve arkadaşları (2006), bazı korunmuş genlerin dizilerinden yararlanılarak tüm genomun G + C içeriğinin hesaplanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna göre G + C içeriği, tüm genomun G + C içeriğinden % 5' den fazla farklılık göstermeyen genler bakterilerin G + C içeriklerinin belirlenmesinde güvenli bir şekilde kullanılabilir (Fournier ve ark., 2006). Farklı bakterilerde bulunan çok sayıda korunmuş gen dizileri üzerinde yaptıkları incelemeler sonucunda Fournier ve arkadaşları, *ftsY* geninin organizmanın G + C içeriğini doğru bir şekilde yansıttığını tespit etmişlerdir. Korunmuş genlerin baz dizilerine dayanarak G + C içeriğinin hesaplanması, hem pratik oluşu hem de az zaman alması nedeni ile son yıllarda sistematikçiler tarafından kullanılmaya başlanan bir yöntemdir.

1.5.1.2. DNA-DNA Hibridizasyonu

DNA-DNA hibridizasyon tekniği tür tanımlamasında kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Nükleik asitler arasındaki benzerliklerin ortaya çıkarılmasına

dayanan bu teknikle genomlar arasındaki benzerlikler gerçekçi bir şekilde ortaya çıkarılmaktadır (Stackebrandt ve Goodfellow, 1991).

Bu tekniğin temeli oldukça basittir ve DNA'nın temel yapısal özelliğinden faydalanır. DNA yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığı zaman iki zinciri birbirine bağlayan hidrojen bağları kırılır ve DNA denatüre olarak birbirinin tamamlayıcısı olan iki zincire ayrılır. Bu DNA zincirleri soğutulduktan sonra 50-60°C'de inkübe edildiği zaman her bir tek zincir tamamlayıcısı olan zincir ile birleşerek tekrar çift zincir oluşturur. İki farklı türe ait olan DNA dizileri belirli ölçüde benzerlik gösterir. Bu nedenle iki farklı türün tek zincir DNA'sı bir araya getirilerek inkübe edildiği zaman birbirinin tamamlayıcısı olan bazlar bir araya gelerek çift zincir oluşturmaya çalışırlar. İki türün DNA'sının bir araya gelmesiyle oluşan "hibrid DNA" kademeli bir şekilde ısıtılarak ölçülür. Eğer türler yakın akraba ise birbirini tamamlayan bazların sayısı fazla olur. Oluşan hidrojen bağlarının sayısı ne kadar fazla ise çift zincir o kadar güçlü olur ve bu nedenle iki zinciri birbirinden ayırmak için gerekli ısı da o kadar fazla olur. Birbirine uzak olan türlerin oluşturduğu hibritler ise düşük sıcaklıklarda kolaylıkla birbirinden ayrılabilirler. İki farklı türe ait DNA'nın karışımı (heterodupleks DNA) ile bu iki türün ayrı ayrı saf DNA'ları (homodupleks DNA'lar) ile elde edilen sonuçlar arasındaki karşılaştırma, bu bakteriler arasındaki genomik benzerliğin derecesini verir (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2005). Kural olarak erime sıcaklığındaki bir derecelik fark DNA dizileri arasında %1'lik farka eşittir (Lewin 1997).

DNA-DNA hibridizasyon tekniği 1960'lı yıllardan beri bakteri sistematikçileri tarafından türler arasındaki benzerlikleri ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır ve hala bakteri türlerinin tanımlanmasında en önemli kriterdir. Yeni bir türün tanımlanmasında 'resmi' kriter tüm genomdaki benzerlik derecesidir ve bu benzerlik derecesini ölçmek için kullanılan DNA-DNA hibridizasyonu, iki DNA zincirini birbirinden ayırmak için gerekli olan sıcaklığa (denatürasyon sıcaklığı, ΔT_m) dayanır. Bakteri türlerinin sınıflandırılmasında kullanılacak sınırlar da aynı türe ait bireyler için, 5°C veya daha düşük ΔT_m değerleri ile birlikte, %70 veya daha fazla DNA-DNA benzerliği olarak belirlenmiştir (Wayne ve ark., 1987).

1.5.1.3. DNA Parmak İzi Analizleri

DNA parmak izi analizleri genellikle aynı türe ait bireylerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılır. Genomik DNA'nın parmak izi analizleri; PCR'a dayalı yöntemler ve DNA'nın restriksiyon analizi olmak üzere iki ana yöntemle gerçekleştirilmektedir.

1.5.1.3.1. PCR'a Dayalı Yöntemler

PCR tekniği 1985 yılında Kerry B. Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik basit ve oldukça verimli olması nedeniyle birçok filogenetik yöntemin temel taşı oluşturmuştur (Giovannoni, 1991). PCR ile oluşturulan parmak izleri bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve genetik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

1.5.1.3.1.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA tekniği, PCR teknikleri içerisinde en basit olanıdır. İlk olarak Williams ve arkadaşları (1990) tarafından insan DNA örnekleri üzerinde çalışılırken kullanılmıştır. Bu teknikte genom üzerinde rastgele bölgeler PCR tekniği ile çoğaltılır. 10 baz çiftlik spesifik olmayan primerler genomik DNA üzerinde rastgele bölgelere bağlanır. PCR sonucunda genomik DNA'dan farklı uzunluklara sahip 3-10 arasında farklı DNA parçacığı üretilir (Andersen, 2000a ; Wolfe ve Liston, 1998). Eğer primerin bağlanma bölgesinde bir mutasyon meydana gelmişse RAPD sonucunda elde edilen fragmentlerin uzunluğu da farklı olacaktır. Bu nedenle genomik varyasyonları ölçmek için RAPD analizleri basit ve güvenilir bir metod sağlar. Bu teknikte primerler kısa olduğundan bağlanma (annealing, denatürasyon) sıcaklığı da düşük (35–40°C) olmalıdır.

RAPD tekniğinin diğer genetik analiz yöntemlerine göre birçok avantajı vardır. Bunlardan bazıları genel primerlerin kullanılması, prob izolasyonu gibi ön çalışmaların veya nükleotid dizin analizinin gerekmesidir (Williams ve ark. 1990). Kolaylığı ve sadeliği nedeniyle bu teknik gen haritalarının oluşturulması, DNA parmak izi analizleri ve populasyon genetiğinde yaygın olarak kullanılır. Birçok durumda bakteriler arasındaki polimorfizmi belirlemek için çok az sayıda primere ihtiyaç vardır (Williams ve ark. 1990).

1.5.1.3.1.2. Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR)

Gram negatif bakterilerin çoğunda ve birçok Gram pozitif bakteride, genom üzerinde çok sayıda kopyası bulunan, yüksek oranda korunmuş, tekrarlanan diziler doğal olarak bulunur. Rep-PCR tekniğinde bu tekrarlanan bölgelere uygun primerler hazırlanarak DNA'nın çoğaltılması amaçlanır (Lupski ve Weinstock, 1992). Genom üzerinde bulunan tekrar diziler üç sınıfa ayrılır. Bunlar: 35-40 bç'lik tekrarlanan "ekstrajenik palindromik" (REP) diziler, 124-127 bç'lik enterobakteriyal tekrarlanan "interjenik" korunmuş (ERIC) diziler ve 154 bç'lik BOX elementleridir (Versalovic ve ark., 1994). Bu diziler genom üzerinde farklı interjenik bölgelerde bulunurlar ve her iki oryantasyonda da bulunabilirler. Oligonükleotid primerler PCR sırasında REP ve ERIC bölgelerinin ters çevrilmiş dizilerinin dış kısmından ve BOX bölgesinin boxA alt ünitesinden PCR'ı başlatırlar (Versalovic ve ark., 1994). Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementleri arasında bulunan farklı genomik bölgelerin çoğaltılması sağlanır. Çoğaltılmış DNA parçacıkları jelde yürütülerek organizmaya ait rep-PCR genomik parmak izi profili elde edilir (Versalovic ve ark., 1994). Rep-PCR tekniği ile bakterilerden elde edilen genomik DNA parmak izleri cins, tür ve alt tür seviyesinde farklılıkların ortaya çıkarılmasını sağlar. Bu teknik farklılıkların belirlenmesinin yanı sıra bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında da yaygın olarak kullanılan bir methoddur (van Berkum ve ark. 1994; Louws ve ark. 1996; Versalovic ve ark. 1996).

1.5.1.3.1.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA parçacıklarının rastgele çoğaltılması ile yüksek çeşitliliğe sahip DNA profillerinin oluşumunu sağlar (Vos ve ark., 1995). Bu teknik çok sayıda DNA işaretçi bölgeleri içeren gen haritalarının oluşturulmasında sıklıkla kullanılır. Bu yöntemde bakteri DNA'sı iki farklı restriksiyon enzimiyle kesilir ve oluşan parçacıklar spesifik adaptörlere bağlanır. Bu spesifik adaptörler hem restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini hem de PCR primerlerinin bağlanacağı bölgeleri içerirler. Restriksiyon dizilerine ve adaptöre bağlanma yeteneğindeki primerler kullanılarak DNA parçacıkları çoğaltılır. Bununla beraber, bütün restriksiyon parçacıkları çoğaltılmaz çünkü AFLP primerleri 3' ucunda seçici nükleotidler içerirler. Bu seçici dizilere sahip primerler genomik restriksiyon parçalarının sadece bir

altkümesinin çoğaltılmasını sağlarlar (Lin, 1996; Janssen vd., 1996). AFLP sonucu oluşturulan parmak izleri yüksek polimorfizm gösterdiği için aynı türe ait suşlar arasındaki farklılığı belirlemede oldukça önemlidir (Rademaker vd., 2000; Duim vd., 2001).

1.5.1.3.2. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi

Restriksiyon enzimleri (Restriksiyon endonükleazlar) genomik DNA'yı spesifik bölgelerden tanıyarak kesen enzimlerdir (Dowling ve ark., 1990). Bu enzimler yardımı ile DNA belirli bölgelerden kesilerek çift zincirli parçacıklar elde edilir. Biyokimyasal özelliklerine göre restriksiyon enzimleri Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV olmak üzere dört farklı gruba ayrılır. Genomik DNA analizleri ve genetik mühendisliğinde genellikle Tip II endonükleazlar kullanılmaktadır. Tipik bir restriksiyon bölgesi genellikle 4-6 baz çiftinden oluşur. Bazı DNA molekülleri belirli bir enzim için çok sayıda restriksiyon bölgesi içerirken bazıları bu bölgeleri taşımaz. Genomik DNA restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde, restriksiyon bölgelerinin birbirine olan uzaklığına bağlı olarak farklı uzunlukta DNA parçaları oluşur. Bu parçalar çok büyük olacağından normal agaroz jel ile birbirlerinden ayrılamazlar. Bunun için Pulse Fields Jel Elektrofrezisi (PFGE) kullanılır (Tenover ve ark., 1995). Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu elde edilen fragmentler kullanılarak "DNA parmak izleri" oluşturulur. Bu parmak izlerinin karşılaştırılması suçunda tür içerisindeki benzer gruplar ortaya çıkarılabilmektedir. Bu tekniğin 'Southern Blot' hibridizasyonu ile birlikte kullanılmasıyla genomik DNA'nın büyüklüğü ve organizasyonu incelenebilir (Palleroni, 1993).

1.5.1.4. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması

Son yıllarda 16S rRNA molekülünün bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde oldukça önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Organizmaları sınıflandırmak için kullanılan bu yöntem ilk kez Woese ve arkadaşları tarafından (1987) uygulanmıştır. 16S rDNA geni ribozomların yapı ve fonksiyonunda hayati rol oynayan 16S rRNA molekülünü kodlar ve bu nedenle bütün canlı organizmalarda bulunur. Bununla birlikte, hem bütün organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş 8 adet değişmeyen bölgeye, hem de 9 adet benzersiz ve değişken bölgeye sahiptir (Gray vd., 1984). Bu değişken bölgeler organizmaların filogenetik ilişkilerini belirlemede sıklıkla kullanılır. 16S

rDNA dizilerine uygun olarak dizayn edilen primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmıştır. PCR ile çoğaltılan 16S rDNA baz dizilerinin karşılaştırılması ile türler arasındaki akrabalık dereceleri belirlenebilmektedir. Stackebrandt ve Goebel (1994) tarafından yapılan bir çalışmada; 16S rRNA baz dizileri %97'den daha az benzerlik gösteren suşların, farklı türlere ait olduğu ortaya konmuştur.

Bununla beraber, 16S rDNA dizin analizine dayalı yöntemler bazı dezavantajlara sahiptir. 16S rDNA dizileri yüksek oranda benzerlik gösteren iki organizmanın tüm genomik DNA'sı ve fenotipik özellikleri incelendiğinde farklılıklar görülebilir. Bu nedenle 16S rDNA dizileri farklı cinse ait olan veya birbirinden kolaylıkla ayırt edilen bireyleri birbirinden ayırmada kullanılabilirken, birbirine çok benzeyen türleri ayırmada uygun bir kriter değildir (Tonjum ve ark.,1998; Belduz ve ark., 2003).

1.5.1.5. 16S-23S rRNA Genleri Arasındaki “Spacer” Bölgeler

16S-23S rRNA genleri arasında bulunan “spacer” bölgeler bakterileri cins, tür ve alt tür seviyesinde tanımlamada sıklıkla kullanılan araçlardandır. Bu bölgeler uzunluğu ve baz dizilimi bakımından türler arasında yüksek oranda çeşitlilik gösterir (Jensen ve ark., 1993).

Ribozomal RNA genleri bakterilerde, rRNA operonu (*rrn*) üzerinde 16S, 23S ve 5S rRNA sırası ile bulunurlar. 16S-23S genleri ve 23S-5S genleri arasında intergenik kopyalanan “spacer” bölgeler bulunur. Bu bölgeler sırası ile ITS 1 ve ITS 2 adını alır. ITS 1 bölgesi, tRNA genlerini (tRNA^{Glu} veya tRNA^{Ala} veya her ikisi birden) ve *rrn*'in transkripsiyonunu düzenleyen ve yöneten bölgeleri içerir. rRNA operonlarının sayısı bakterilerde 1-10 arasında değişiklik gösterir. Bu operonların uzunluğu ve baz dizilimi aynı genom üzerindeki farklı bölgelerde değişiklik gösterdiği gibi farklı türler arasında da farklılıklar gösterir (Gürtler, 1996; Condon ve ark., 1995; Naimi ve ark., 1997; Itehan ve ark., 2000). Organizmada fonksiyonel olan tRNA dizileri iyi bir şekilde korunurken, herhangi bir fonksiyona sahip olmayan dizilerde sürekli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle fonksiyonel olmayan bölgeler yakın ilişkili türler arasında dahi yüksek farklılıklar göstermektedir (Nguimbi, ve ark., 2003).

ITS baz dizi analizi yakın ilişkili türler arasındaki akrabalığı çoğunlukla doğru olarak yansıtır. Ancak yakın akraba olan gruplar için ITS baz dizilimindeki küçük farklılıklar tüm genom benzerliğini yansıtamamaktadır. Bu nedenle tür tayini

çalışmalarında ITS dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonunun yerini alamaz, ancak ihtiyaç duyulan hibridizasyon deneylerinin sayısını önemli ölçüde azaltabilir (Willems ve ark., 2001).

1.6. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar üzerindeki ilgi, günümüzde biyoteknolojide geniş çaplı kullanım alanları bulmaları nedeniyle büyük ölçüde artmıştır. Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkalik şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003). Biyoteknolojide termofilik organizmalar, bazı yakıt ve kimyasalların üretilmesinde ve genetik manipülasyonların yapılmasında kullanılır. Bununla beraber, biyoteknoloji açısından en önemli özellikleri biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir.

Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev., 1993; Kumar ve Swati, 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkositesinin azalması da diğer bir avantajdır.

Termofilik organizmalar, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan ekstrem şartlarda fonksiyonlarını muhafaza eden enzimleri üretirler. Bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülozlar, proteazlar, lipazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimya endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu enzimler çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı dirençlidir (Aguilar, 1996).

İlk olarak termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimerazlar (Chien ve ark., 1976) moleküler çalışmalarda büyük öneme sahiptir. DNA'yı çoğaltmaya dayalı bir yöntem olan PCR tekniği ile genetik mühendisliğinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu yöntemde peş peşe gelen üç adım, 90-95°C'de DNA zincirlerinin denatürasyonu, 55-70°C'de renatürasyonu ve 75°C de sentez aşamasıdır (Saiki ve ark., 1988). Bu nedenle bu reaksiyonlarda kullanılan enzimlerin bu sıcaklıklara dayanıklı olması gerekmektedir. PCR yönteminin kullanıldığı ilk zamanlarda, primer DNA zincirinin uzatılmasını katalizleyen DNA polimerazlar *Escherichia coli*'den izole edilirdi. Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda enzimatik aktivitelerini kaybettiklerinden her bir denatürasyon ve renatürasyon aşamasından sonra reaksiyona polimeraz enzimi ilavesi gerekmekteydi. Bu nedenle de PCR, çok fazla zaman harcayan ve pahalı bir yöntemdi (Erlich ve ark., 1988). Termal kararlı polimerazların bulunmasıyla, PCR yöntemi oldukça kolaylaştı ve önemli ölçüde gelişti. *Thermus aquaticus*'un yanı sıra *Phyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* bakterilerinin DNA polimeraz enzimleri de PCR reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu mikorganizmalardan elde edilen DNA polimerazlar, 99°C'de bile aktivitelerinin önemli bir kısmını korumaktadırlar. *Taq* DNA polimeraz enzimi dünya ticaretinde oldukça büyük bir paya sahiptir. *Taq* DNA polimerazların katalizlediği reaksiyonlar biyoteknolojide birçok işlemin gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır. Spesifik DNA dizinleri arası bölgelerin kopya sayısının hızlı ve verimli bir şekilde artırılması bu enzimler sayesinde oldukça kolaylaşmıştır. Besin analizi, klinik tıp ve adli tıp alanlarında önemli araştırmalar ve incelemeler yapılırken de bu enzimlerden yararlanılmaktadır (Aguilar, 1996).

Bacillus stearothermophilus bakterisinden elde edilen termofilik alkalın proteazlar deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır (Ito ve ark., 1998). Deterjanların içerdiği bu enzimler toplam enzim üretiminin yaklaşık olarak %25'ini kapsamaktadır ve bunlar modern biyoteknolojinin çok başarılı bir şekilde geliştirilen uygulamalarındandır. Termal kararlı selülotik enzimler de deterjanların yapısına katılarak yıkama sonucunda çamaşırların yumuşak ve daha parlak renkte olmasını sağlarlar. Ayrıca tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde selülazlar yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bhat, 2000).

Endüstride yaygın olarak kullanılan bir diğer enzim grubu da termofilik bakterilerden izole edilen proteolitik enzimlerdir. *Bacillus stearothermophilus*'un bir suşu olan *Bacillus thermoproteolyticus* (Endo, 1962) tarafından üretilen thermolisın proteolitik

enzimlerin en önemlilerindendir. Bu enzim, 70°C'de 30 saat kaldıktan sonra bile aktivitesini % 86 oranında korumaktadır. Proteazlar ayrıca, gıda, ilaç, deri ve tekstil endüstrisinde de kullanılmaktadır. Optimum olarak 75°C'de aktif hücre dışı bir proteaz, *Bacillus stearothermophilus* TP26 suşundan izole edilmektedir (Gey ve Under, 1995).

Termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlardan biri de nişasta endüstrisidir. Endüstriyel nişasta işleme, nişastanın glukoz, maltoz veya oligosakkarit şuruplarına hidrolizini içerir. Nişastanın tam hidrolizi için pek çok enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler, amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoamilazlar ve ksiloz izomerazlardır (Poonam ve Dalel, 1995). Bu enzimler veya bu enzimleri içeren şuruplar nişastanın işlenmesi yanında içecek endüstrisinde, ekmek yapımında ve peynir yapımı endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca tatlandırıcı üretiminde ve pek çok gıda ürününün koku, yapı ve görünüşünün değişime uğratılmasında da bu enzimler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Nişasta endüstrisi, termofilik enzimlerin yıllık endüstriyel tüketiminin %30'unu oluşturmaktadır (Van der Maarel vd., 2002).

Endüstride geniş kullanım alanı olan lipazlar da termofilik organizmalardan izole edilerek biyoteknolojide kullanılmaktadır. Termal kararlı lipazlar, gıda endüstrisinde tat ve hoş koku bileşeni olarak, kozmetikte yağlayıcı madde ve katkı maddesi olarak, kağıt endüstrisinde kağıt hamurundaki zifti uzaklaştırıcı madde olarak kullanılır ve ayrıca süt endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde ve deri ve tekstil endüstrisinde de kullanılmaktadırlar.

Termal kararlı enzimler, bir çok biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı ekolojik alanlardan termofilik mikroorganizmaların fazla miktarda izolasyonu ve bu mikroorganizmalardan faydalı enzimlerin ekstraksiyonu ile biyoteknoloji alanında daha büyük adımlar atılabilir (Kohilu ve ark., 2001).

Tablo 2. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

Enzim	Sıcaklık Aralığı	Reaksiyonları	Kullanım alanları
Amilolitik enzimler	90-100	Nişasta → dekstroz şurup	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ve içecek endüstrisinde ve tatlandırıcı üretiminde
Ksilanaz	45-65, 105	Kraft hamuru → ksilan+lignin	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde
Kitinazlar	65-75	Kitin → kitobioz Kitin → N-asetil glukozamin Kitin → deasetilaz	Gıda, kozmetik, ilaç, çimento endüstrisinde, kağıt üretiminde, atık su temizlenmesinde
Selülaz	45-55, 95	Selüloz → glukoz	Deterjan ve tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde
Proteaz	65-85	Protein → peptidler ve amino asitler	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ilaç ve deri endüstrisinde
Lipazlar	30-70	Yağ uzaklaştırması, hidrolizis, alkolizis, aminolizis	Süt, deterjan, kağıt, ilaç, kozmetik, deri ve tekstil endüstrisi
DNA polimeraz	90-95	DNA arttırılması	Genetik mühendisliği / PCR

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler

Trypton (1612) ve yeast extract (1702) Conda'dan, sodium chloride (A2942), X-Gal (A1007.0005) ve phenol:chloroform:isoamyl alcohol (A0944) Appllichem'den, 2-propanol (248K18927695), isoamyl alcohol (K30290278) ve sodium acetate (TA624865) Merck'ten, glycerol (7044) ve methanol (TBF01963961499) J.T.Backer'den, TRIS base (T-6066), phenol (P4557), ethidium bromide (E-8751), agarose (A-5093), ethilenediaminetetraacetic acid (EDTA) (E-5134), RNase A (R-5503), ammonium acetate (25006) ve IPTG (I5502) Sigma'dan, Ampicilin Bioanalyse'dan, glucose (1929526) Roche'dan, sodium perchlorate (A0208583001) Acros O.'dan ve sodium dodecyl sulphate (SDS) (0227) Amresco'dan satın alındı. Kullanılan tuz bileşikleri %99 ya da daha saftırlar.

Genomik DNA İzolasyon Kiti (A1125), Plazmit İzolasyon Kiti (A1330) ve p-GEMT Easy Klonlama Kiti (A1860) Promega'dan, DNA'yı Jelden Çıkarma Kiti (K0513) Fermentase'dan satın alındı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Anoxybacillus flavithermus DSM 2641, *Anoxybacillus pushchinoensis* DSM 12423, *Anoxybacillus contaminans* DSM 15866, *Anoxybacillus kamchatkensis* DSM 14988, *Anoxybacillus amylolyticus* DSM 15939 tip bakteri kültürleri Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)'den, *Anoxybacillus gonensis* NCIBM 13933, *Anoxybacillus kestabolensis* NCIBM 13971 ve *Anoxybacillus ayderensis* NCIBM 13972 tip bakteri kültürleri KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalından ve *Anoxybacillus voinovskiensis* NCIBM 13956 tip bakteri kültürü, bu bakteriyi tanımlayıp literatüre kazandıran Isao Yumoto'dan temin edildi.

2.2. Metotlar

2.2.1. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu

İzolatların genomik DNA'ları, PCR uygulamalarında kullanmak amacı ile Sambrook ve arkadaşlarının (1989) prosedürüne göre izole edildi. Bu metod şu şekilde uygulandı.

Termofilik izolatlar, uygun sıcaklıkta "LB Broth (Laura Bertani Broth)" da (%10 Tripton, %5 Yeast, %5 NaCl, pH: 7,4) bir gece inkübe edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. Üzerine 1 µl (10 µg/ml) lizozim solusyonu ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µl %10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5.2) eklendi ve 65°C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir, tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25: 24: 1) ilave edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları atıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37°C'de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µl TE'de çözümlenerek - 20°C'de muhafaza edildi.

2.2.2. İzolatların DNA dizin Analizleri

2.2.2.1. Primer Sentezi

Nükleotid dizilimi önceden belirlenmiş ve Genbank'ta yerini almış olan, 8 adet *Geobacillus* ve 3 adet *Bacillus* cinsine ait bakterinin *recN* geni Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla nükleotid sırası bakımından karşılaştırıldı. Nükleotid dizilimi açısından korunmuş olan bölgeler tespit edilerek bir adet forward (RecN F_02) ve bir adet reverse (RecN R_02) primer dizayn edildi. Sentezlenen primerlerin yanı sıra Zeigler (2005) tarafından *Geobacillus* cinsine ait *recN* genini çoğaltmak için dizayn edilen F2-1 (5'- GGCAAATCGATCATCATCGAC -3') ve R2-2 (5' - AGATGGGAAATGCAAAGCAC – 3') primerleri de bu çalışmada kullanıldı.

Anoxybacillus üyelerinin genomunda bulunan *ftsY* genini çoğaltmak için kullanılan primerler aynı yöntem kullanılarak Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımı ile dizayn edildi.

flaA genini elde etmek amacı ile ilk olarak *Geobacillus pallidus* AC6 bakterisinin flagellin proteini izole edilerek saflaştırıldı. Saflaştırılan bu proteine ait amino asit dizileri belirlendi ve belirlenen amino asit dizilerine dayanılarak flagellin geninin nükleotid dizileri oluşturuldu. *Geobacillus pallidus* bakterisinin flagellin genine ait nükleotid dizileri Clustal W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak *Bacillus subtilis* ve *Geobacillus kaustophilus* bakterilerinin nükleotid dizileri ile karşılaştırıldı. Her üç bakterinin flagellin genindeki korunmuş bölgeler belirlenerek bu bölgelerden bir adet ileri (Fla_F1) ve bir adet geri (Fla_R1) olmak üzere iki adet dejenerat primer sentezlendi.

2.2.2.2. *recN* Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

Her bir termofilik izolatın *recN* geni, Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'dan RecN_F02 (5'- ACGCGATTCATYTGTTGATCG G –3') ileri ve RecN_R02 (5'- TCCAACAGCTCTTTGGCRTGC –3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarında 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP,

170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler'da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü DNA zincirinin denatürasyonu için 94°C'de 1 dakika, primerlerin DNA'ya bağlanması (annealig) için 50°C'de 1 dakika ve yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extention) için 72°C'de 1,5 dakika şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

2.2.2.3. *flaA* Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

flaA genleri, her bir termofilik izolattan izole edilen genomik DNA, Fla_F1 (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve Fla_R1 (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak 'Biometra Personal Cycler'da yürütülen PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. 10X PCR tamponu, 170 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, her bir primerden 0,25 mM, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içeren reaksiyon karışımı ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon; 95°C'de 2 dakikalık ilk denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 50°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 1,5 dakika uzama ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü, etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandı ve "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

2.2.2.4. *ftsY* Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

Her bir termofilik *Anoxybacillus* tip suşundan Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA, *ftsY* genini elde etmek amacı ile FtsY_F1 (5'- RTGAGCTTYTTTAAAAARYTRARAG -3') ileri ve FtsY_R1 (5'- TYBKNAAB ARNCCRTABAC -3') geri dejenerat primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu, 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 10X PCR tamponu, 170 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, her bir primerden 0,25 mM, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon Biometra Personal Cycler PCR cihazı kullanılarak;

95°C’de 2 dakikalık ilk denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C’de 15 saniye denatürasyon, 50°C’de 30 saniye bağlanma ve 72°C’de 1,5 dakika uzama ve son olarak da 72°C’de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

Tablo 3. Kullanılan primerler (R: A ve G, Y:C ve T, K: G ve T, B :C ve G ve T, N:A ve T ve C ve G)

Primerler	Baz Dizisi	Uzunluk (nükleotid)	Tm (°C)
RecN_F02	5’- ACGCGATTCATYTGTTGATCG G -3’	22	56,9
RecN_R02	5’- TCCAACAGCTCTTTGGCRTGC -3’	21	59,7
F2-1	5’- GGCAAATCGATCATCATCGAC -3’	21	55,3
R2-2	5’ - AGATGGGAAATGCAAAGCAC - 3’	20	55,2
FtsY_F1	5’- RTGAGCTTYTTTAAAAARYTRARAG -3’	25	50,1
FtsY_R1	5’- TYBKNAABARNCCRTABAC -3’	20	49,7
FlaA_F1	5’-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3’	24	70,2
FlaA_R1	5’-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3’	27	54,8

2.2.2.5. *recN*, *flaA* ve *ftsY* Genlerinin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank’taki Sıralarla Karşılaştırılması

PCR reaksiyonları ile çoğaltılan *recN*, *flaA* ve *ftsY* genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar (1,2 µg pGEM-T Vektör (50 ng/ µl); 12 µl genomik DNA (4 ng/ µl); 100 U T4 DNA Ligaz; 200 µl 2X Ligasyon Tamponu) ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlama sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler.

Maniatis ve arkadaşlarının (1982) prosedürüne göre klonlama sonucu oluşan koloniler Ampisilin (50 mg/ml) içeren LB broth içerisinde 37°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan kültürler 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 12.000 rpm’de 3 dakika çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 200 µl Solüsyon I (50 mM Glukoz; 25 mM Tris-HCL; 10 mM EDTA,

pH 8,0; 1 ml solüsyon için 4 mg lizozim) ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 400 µl Solüsyon II (0,2 N NaOH; %1 SDS) ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika buzda bekletildikten sonra 7,5 M Amonyum asetat'tan 300 µl ilave edilerek oldukça yavaş bir şekilde alt üst edildi. 10 dakika buzda bekletilen örnekler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 800 µl izopropanol ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37°C'de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 40 µl TE'de çözülerek – 20°C'de muhafaza edildi.

İzole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığını belirlemek amacı ile plazmitler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntülendi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (MacroGen, Güney Kore) belirlendi.

Dizi analizatörleri aracılığı ile elde edilen gen dizileri "Blast" (NCBI) programı kullanılarak Genbank'ta var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırıldı ve aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı. Her bir gen için elde edilen diziler, "ClustalW" ve "BIOEDIT" (Thompson ve ark., 1997) programları kullanılarak birbirleri ile karşılaştırıldı ve aralarındaki benzerlik dereceleri ortaya çıkarıldı. "FastPCR" programı yardımı ile elde edilen dizilerin G + C içerikleri belirlendi.

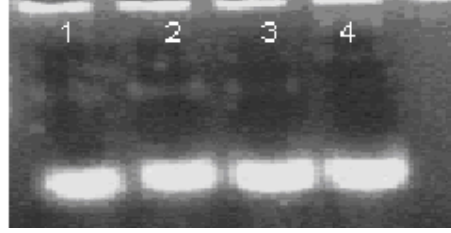
3. BULGULAR

Bu çalışmada, *Anoxybacillus* cinsine ait termofilik bakteriler olan *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*'un *recN*, *ftsY* ve *flaA* genleri PCR yardımı ile çoğaltılarak bu genlerin dizileri belirlendi. Elde edilen diziler birbirleri ile karşılaştırılarak bu genlerin *Anoxybacillus* cinsine özgü bir dizilime sahip olup olmadığı belirlendi.

3.1. *recN* Geni Analizleri

recN genini elde etmek amacı ile *Anoxybacillus* cinsine ait olan 9 bakterinin genomik DNA'sı *RecN_F02* ve *RecN_R02* primerleri ile PCR'a tabi tutuldu. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü. BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülenen sonuçlarda *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus* türlerinin yaklaşık olarak 1700 bp'lik DNA parçasına tekabül eden bantlar verdiği görüldü. *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis* ve *Anoxybacillus gonensis* bakterilerinden ise istenen büyüklükte bantlar elde edilemedi. Zeigler (2005) tarafından dizayn edilen F 2-1 ve R 2-2 primerleri kullanılarak *recN* geni çoğaltılmayan türler tekrar PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Reaksiyon sonucunda *recN* genlerinin çoğaltılması gerçekleştirilemedi.

Dört *Anoxybacillus* türü (*Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*) için elde edilen *recN* geni pGEM-T Easy klonlama vektörü içerisine klonlanarak baz dizilimi (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Elde edilen genin *recN* olduğunu doğrulamak amacı ile baz dizileri Genbank'ta bulunan diğer bakterilerle ait dizilerle karşılaştırıldı. *recN* genine ait olduğu kanıtlanan diziler Clustal W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler Tablo 4'de gösterilmiştir.



Şekil 1. RecN_F02 ve RecN_R02 primerleri ile *Anoxybacillus* genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan *recN* genine ait DNA parçaları (1: *A. contaminans*, 2: *A. pushchinoensis*, 3: *A. kamchatkensis*, 4: *A. amylolyticus*)

DNA baz dizilerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen verilere göre *recN* genleri arasındaki en yüksek benzerlik *Anoxybacillus pushchinoensis* ile *Anoxybacillus contaminans* türleri arasındadır. Bu iki bakterinin *recN* geni % 98 benzerlik göstermektedir. En düşük benzerlik ise % 71 ile *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus* arasındadır.

Tablo 4. *Anoxybacillus* türlerinin *recN* gen dizileri arasındaki benzerliklerinin yüzde değerleri.

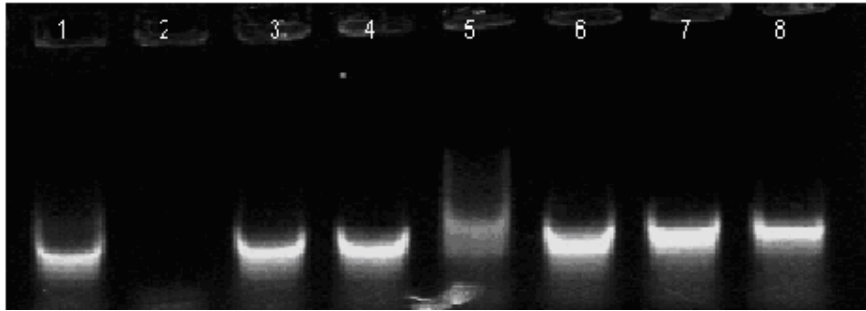
	<i>Anoxybacillus contaminans</i>	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>
<i>Anoxybacillus contaminans</i>	100			
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	73	100		
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	98	74	100	
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	88	71	88	100

Zeigler (2005)'e göre iki bakterinin *recN* genleri arasındaki benzerlik % 84'den az ise bu bakteriler farklı türlere aittir. Buna göre *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus amylolyticus* ve *Anoxybacillus kamchatkensis*'in farklı bakteriler olduğu *recN* geni analizleri ile desteklenmektedir. Zeigler, *recN* genlerine ait dizileri %96'dan fazla benzerlik gösteren bakterilerin aynı türe dahil edilebileceğini ileri sürmüştür. Ancak, daha öce farklı bakteriler olduğu fenotipik ve genotipik testlerle kanıtlanmış olan

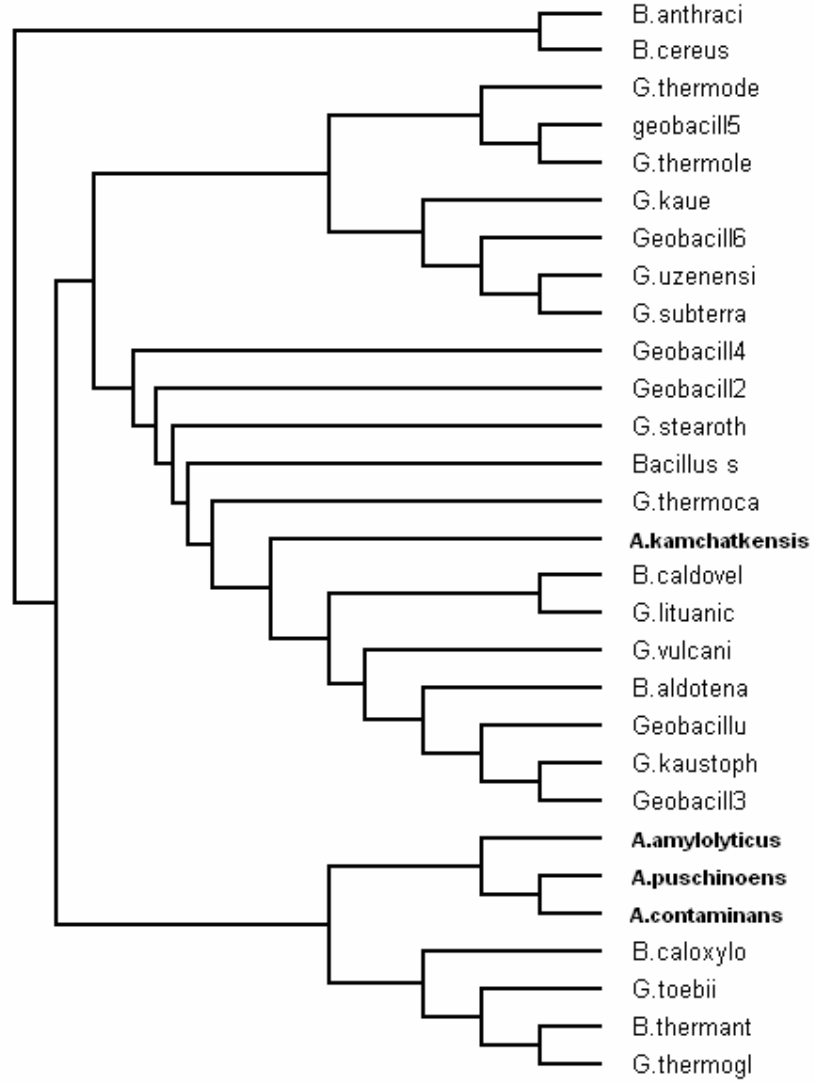
Anoxybacillus contaminans ve *Anoxybacillus pushchinoensis* türlerinin *recN* gen dizilerinin benzerliği % 98 olarak bulunmuştur. Bu değer beklenen değerlerle örtüşmemektedir. Bununla beraber, *Anoxybacillus amylolyticus* türü ile % 71 benzerlik gösteren *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Geobacillus* cinsine ait bakteriler olan *Geobacillus thermocatenulatus* ile % 91 ve *Geobacillus lituanicus* ile % 93 benzerlik göstermektedir (Şekil 3). *Anoxybacillus kamchatkensis*'in farklı bir cinse (*Geobacillus*) ait olan türlere, aynı cins içerisindeki türlere oranla daha yüksek oranda benzerlik göstermesi ve *Anoxybacillus contaminans* ve *Anoxybacillus pushchinoensis*'in Zeigler'in teorisine göre aynı tür olarak kabul edilmesi nedeniyle, *recN* geninin *Anoxybacillus* cinsinin sistematüğinde güvenilir bir araç olarak kullanılamayacağı görülmüştür.

3.2. *flaA* Geni Analizleri

Anoxybacillus cinsi içerisine dahil edilen 9 tip türünün (*Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Anoxybacillus amylolyticus*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus kestabolensis*, *Anoxybacillus ayderensis* ve *Anoxybacillus voinovskiensis*) flagellin genini yakalamak amacıyla, bu bakterilerin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak FlaA_F1 ve FlaA_R1 primerleri ile PCR yapıldı. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve sonuçlar "BioDocAnalyze" jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.



Şekil 2. Fla_F1 ve Fla_R1 primerleri ile *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan *flaA* genine ait DNA parçaları (1: *A. ayderensis*, 2: *A. pushchinoensis*, 3: *A. gonensis*, 4: *A. kestabolensis*, 5: *A. flavithermus*, 6: *A. kamchatkensis*, 7: *A. amylolyticus*, 8: *A. voinovskiensis*)



Şekil 3. Bazı bakteri türlerinin *recN* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

Tablo 5. *Anoxybacillus* türlerinin *flaA* geni açısından benzerlik oranları.

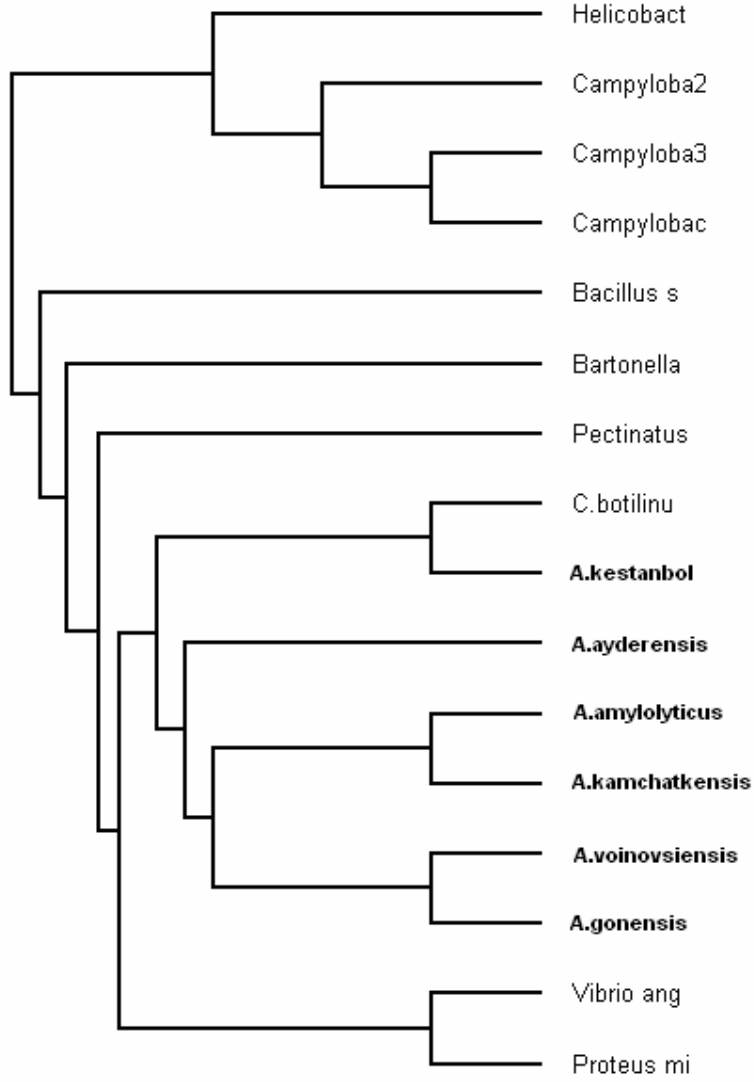
	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	100				
<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	65	100			
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	68	63	100		
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	66	65	73	100	
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	69	65	64	63	100
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	70	62	66	68	66

PCR reaksiyonları sonucunda *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Anoxybacillus amylolyticus*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus kestabolensis*, *Anoxybacillus ayderensis* ve *Anoxybacillus voinovskiensis* türlerinden *flaA* geninin yaklaşık 600 baz çiftlik kısmı elde edilmiştir. *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Anoxybacillus flavithermus* türleri için ise hedeflenen bantlar çoğaltılamamıştır. 6 *Anoxybacillus* türünden elde edilen *flaA* genleri'nin doğruluğu BLAST programı vasıtasıyla Genbank'taki diğer *flaA* genleriyle karşılaştırılmak suretiyle teyit edildikten sonra, Clustal W Multiple Sequence Alignment programı ve BİOEDİT programı kullanılarak bu genlerin benzerlik oranları belirlendi. Her bir *Anoxybacillus* türüne ait *flaA* geninin birbirleri ile olan benzerlik yüzdeleri Tablo 5'de verilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda *flaA* geninin ilk 150 bç'lik bölgesinin yüksek oranda korunduğu görülmüştür. Orta kısım değişkenlik gösterirken son 50 bç'lik bölge yine tür içerisinde yüksek oranda benzerlik gösterir. Altı *Anoxybacillus* türünün *flaA* genleri arasındaki benzerlik % 62 ile % 73 arasında değişmektedir. Kontrol amaçlı olarak *Bacillus subtilis* ve *Proteus mirabilis*'e ait *flaA* gen dizileri *Anoxybacillus* türlerinin *flaA* gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. *Anoxybacillus* türlerinin sırasıyla *Bacillus subtilis*'e olan benzerlikleri % 3-9, *Proteus mirabilis*'e olan benzerlikleri ise % 22-36 arasında değişkenlik göstermektedir.

Genbank'ta bulunan diğer bakterilere ait *flaA* genleri de kullanılarak BIOEDIT programı ile oluşturulan filogenetik ağaçta *Anoxybacillus* cinsine ait türlerin ayrı bir kol oluşturduğu görülmüştür. Bununla beraber, oluşturulan filogenetik ağaçta *Clostridium* cinsine ait bir bakteri olan *Clostridium botulinum* (DSM 2163) da *Anoxybacillus* cinsine ait türler ile aynı grup içerisinde yer almaktadır. Clustal W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak *C.botulinum* bakterisine ait *flaA* geni ile *Anoxybacillus* türlerine ait *flaA* genlerinin benzerlik oranları hesaplanmıştır. Sonuçta, *C.botulinum* bakterisi ile *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin *flaA* genleri arasındaki benzerliğin % 59-62 arasında değiştiği görülmüştür. *C.botulinum* türünün alt türlerine ait *flaA* gen dizilerinin *Anoxybacillus* türlerinin *flaA* gen dizileri ile karşılaştırılması sonucu yine aynı değerler elde edilmiştir. Elde edilen bu değer *Anoxybacillus* cinsi içerisindeki benzerlik yüzdelerine (% 62-73) oldukça yakındır. Fenotipik ve genotipik testlerle *Clostridium* cinsine ait olduğu kanıtlanan *C. botulinum* (van Ermengem, 1896) türünün *flaA* geni açısından *Anoxybacillus* cinsi üyelerine gösterdiği yüksek benzerlik nedeni ile *flaA* geninin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin belirlenmesinde tek başına güvenilir bir araç olmadığı düşünülmektedir.

Bununla beraber, bu çalışmada *flaA* geninin yalnızca üçte birlik kısmı incelenmiştir. Bu nedenle kesin bir yargıya varmak güçtür. Genin geri kalan kısımlarının da dizin analizinin yapılarak incelenmesi ile daha güvenilir sonuçlar elde edilecektir.



Şekil 4. Bazı bakteri türlerinin *flaA* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

3.3. *ftsY* Geni Analizleri

Anoxybacillus cinsine ait 9 bakterinin genomik DNA'sı Sambrook ve arkadaşlarının (1989) prosedürüne göre izole edildikten sonra FtsY_F1 ve FtsY_R1 primerleri kullanılarak PCR yoluyla *ftsY* geni çoğaltıldı. Elde edilen yaklaşık 900 bç'lik DNA parçası pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve klonlanan parçanın baz dizilimi otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile belirlendi. Baz dizilimi belirlenen DNA parçası, Genbank'ta bulunan diğer bakterilere ait *ftsY* genleriyle karşılaştırılarak klonlanan parçanın *ftsY* genine ait olduğu teyit edildi. Her bir tür için *ftsY* geninin G + C içeriği "FastPCR" programı kullanılarak hesaplandı. Bulunan değerler birbirleri ile ve tüm genomun G + C içeriği ile karşılaştırıldı.

Yapılan dizin analizleri sonucunda *ftsY* geninin G + C içeriği; *A. flavithermus* için % 44,6; *A. kestanbolensis* için % 54,3; *A. ayderensis* için % 45,9; *A. pushchinoensis* için % 46,9; *A. voinovskiensis* için % 44,8; *A. gonensis* için % 44,8; *A. contaminans* için % 45,7; *A. kamchatkensis* için % 45,7 ve *A. amylolyticus* için % 48,8 olarak belirlendi.

ftsY geninin G + C içeriğinden yararlanarak her bir bakteri için bir "hesaplanan" G + C değeri (CGC) oluşturuldu [$CGC = (0,9509 \times GGC) + 0,4351$]. Elde edilen GGC (korunmuş genin G + C içeriği), RGC (Tüm genomun gerçek G + C içeriği) ve CGC (hesaplanan G + C içeriği) değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

ftsY geni dizilerinin analizi sonucu elde edilen G + C değerleri incelendiğinde bu değerlerin % 10'dan fazla farklılık göstermediği görülmüştür. Aynı cins içerisinde bulunan bakterilerin G + C içeriğinin % 10'dan daha fazla farklılık göstermemesi beklenir (Goodfellow ve ark., 1997). Buna göre *ftsY* geninden elde edilen G + C değerlerine bakılarak bu bakterilerin aynı cinse ait olduğu söylenebilir. Yine, aynı cins içerisinde bulunan bakterilerin G + C içeriklerinin yakınlıklarının ortalama olarak % 5 olması beklenir (Goodfellow ve ark., 1997). Yapılan incelemede *Anoxybacillus kestanbolensis* haricindeki bakterilerin *ftsY* geninden elde edilen G + C içeriklerinin % 44,6 ile % 48,8 arasında değiştiği görülmüştür. *Anoxybacillus kestanbolensis* türünün *ftsY* geninin G + C içeriği (% 54,3) diğer 8 türden farklılık göstermekle beraber % 10'dan daha fazla farklılık göstermemektedir.

Fournier ve arkadaşları (2006)'na göre korunmuş bir geni organizmanın G + C içeriğinin belirlenmesinde güvenli bir şekilde kullanabilmek için, korunmuş genin G + C değeri ile tüm genomun G + C değeri arasındaki fark % 5'den daha fazla olmamalıdır. Her

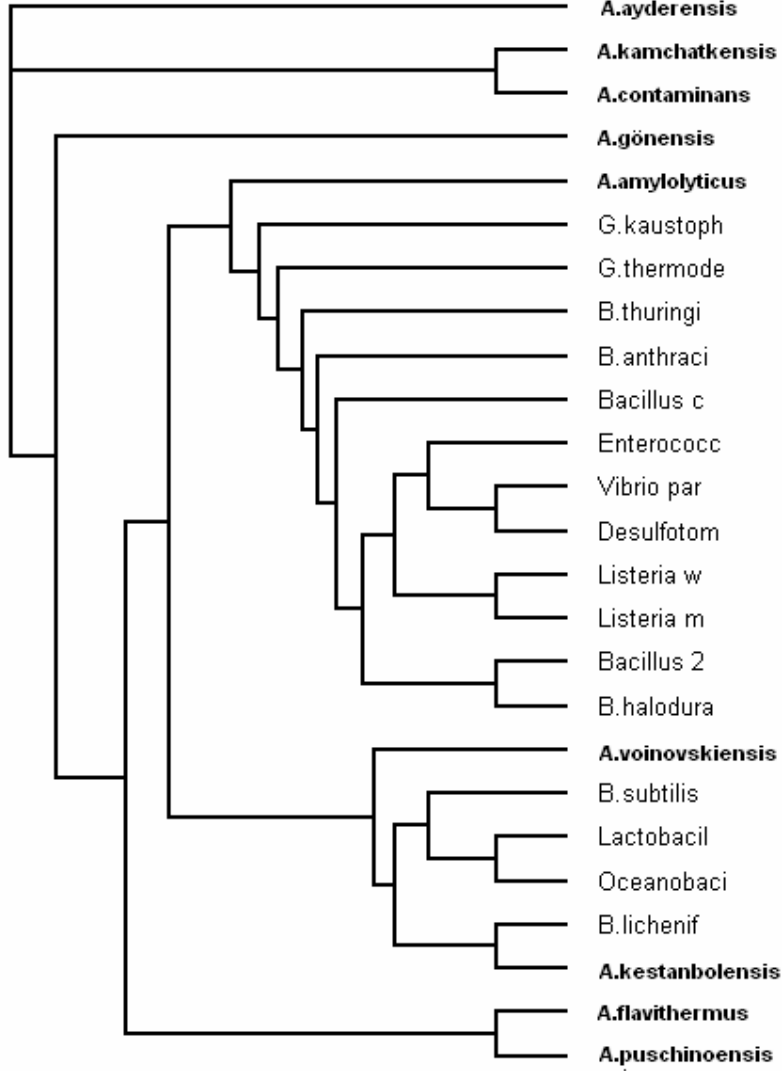
bir *Anoxybacillus* türü için elde edilen *ftsY* geni G + C içeriği ile tüm genomun G + C içeriği arasındaki fark % 5'den azdır. Bununla beraber *ftsY* geninden faydalanılarak elde edilen "hesaplanan" G + C değeri de gerçek G + C değerine oldukça yakındır. Buna göre *ftsY* geninin *Anoxybacillus* cinsi için, genomik DNA'nın G + C içeriğinin belirlenmesinde pratik ve güvenilir bir araç olduğu düşünülmektedir.

Tablo 6. *Anoxybacillus* cinsine ait olan türler için elde edilen G + C değerleri.

Bakteriler	<i>ftsY</i> geni G + C içeriği (%)	Gerçek G + C içeriği (%)	Hesaplanan G + C içeriği (%)
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	44,6	41,6	42,8
<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	45,9	43,6	44,0
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	54,3	50,0	52,0
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	46,9	42,2	45,0
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	44,8	43,9	43,0
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	44,8	42,8	43,0
<i>Anoxybacillus contaminans</i>	45,7	44,4	43,8
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	45,7	42,3	43,8
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	48,8	43,5	46,8

Organizmanın G + C içeriğini yansıtmasının yanı sıra, *flaA* geninin *Anoxybacillus* cinsinin filogenetik analizlerinde kullanımına uygun bir gen olup olmadığını belirlemek amacı ile bu gene ait diziler birbirleri ile ve Genbank'taki diğer dizilerle karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda bu genin *Anoxybacillus* cinsine özgü diziler taşımadığı belirlendi. *Anoxybacillus* cinsi içerisinde *ftsY* gen dizileri için benzerlik oranları % 70 ile %100 arasında değişmektedir. Farklı cinslere mensup bakterilere ait *ftsY* gen dizileri ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen değerler yine aynı sınırlar arasındadır. Örneğin *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus kestanbolensis* ile % 71 benzerlik gösterirken, *Geobacillus thermoleoverans* ile % 78 benzerlik göstermektedir. BIOEDIT programı kullanılarak yapılan filogenetik ağaçta da *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin grup oluşturmadığı ve dağınık bir yerleşim gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, *ftsY*

geninin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerinin G + C içeriğinin belirlenmesinde kullanılabilir bir gen olduğu, ancak filogenetik analizler için uygun olmadığı saptanmıştır.



Şekil 5. Bazı bakteri türlerinin *ftsY* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

4. TARTIŞMA

Termofilik bakteriler, sahip oldukları ısı kararlı enzimlerin biyoteknolojideki önemi nedeni ile son yıllarda birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Termofilik karakterli basil formundaki üyelerden oluşan *Anoxybacillus* cinsi de 2000 yılında Pikuta ve arkadaşları tarafından sistematığe dahil edilen bir bakteri cinsidir. *Anoxybacillus* cinsinin tip türü olan *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T Pikuta ve arkadaşları tarafından anaerobik, termofilik, spor oluşturan, basil formunda bir bakteri olarak tanımlanmıştır. Yapılan 16S rRNA ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda bu bakterinin *Bacillus* cinsinden önemli farklılıklar gösterdiği gözlenmiş ve *Anoxybacillus* adı altında yeni bir cins içerisine dahil edilmiştir. Daha önceden *Bacillus flavothermus* olarak tanımlanan bakterinin 16S rRNA dizileri açısından *Anoxybacillus pushchinoensis* türüne yakın benzerlik gösterdiği görülmüş ve bu bakteri de *Anoxybacillus flavithermus* şeklinde yeniden adlandırılarak *Anoxybacillus* cinsi içerisine dahil edilmiştir. Günümüze kadar farklı kaynaklardan izole edilerek tanımlanan 7 bakterinin de eklenmesiyle *Anoxybacillus* cinsine ait tür sayısı 9'a çıkmıştır.

Bilindiği gibi bakteri sistematığında DNA-DNA hibridizasyonu, tür tanımlaması için hala "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Rosello-Mora ve Aman 2001). Doğruluğu kesin olmakla beraber, DNA-DNA hibridizasyonu oldukça yorucu ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca farklı laboratuarlarda veya farklı deneylerde elde edilen hibridizasyon sonuçları çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu nedenle tür tanımlanmasında farklı yöntemlerin arayışına gidilmiştir (Stackebrandt ve ark., 2002). Genomik DNA üzerindeki yüksek oranda korunmuş bölgelerin sistematikte önemli araçlar olabileceği düşünülmüştür. 16S rRNA geni bütün organizmalarda bulunan ve yüksek oranda korunmuş bir genidir (Woese, 1987). Sahip olduğu bu özellikler nedeni ile 16S rRNA geni filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Stackebrandt ve Goebel (1994)'e göre aynı türe ait olan suşların 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik % 97'den fazladır. Aynı cins içerisindeki farklı türlerin 16S rRNA genlerinin baz dizileri arasındaki benzerlik ise % 97'den daha azdır. İki farklı bakterinin aynı cinsi içerisine dahil edilebilmesi için 16S rRNA geninin baz dizileri arasındaki benzerliğin % 95'den daha fazla olması gerekir (Ludwig ve ark.,1998).

16S rRNA gen dizileri filogenetik analizlerde yıllardır başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen bazı sınırlamaları vardır. Cho ve Tiedje (2001) tarafından 16S rRNA gen dizisi açısından aralarında %97'den daha fazla benzerlik bulunan bakterilerin,

kesin olarak aynı tür bakteriler olmayabileceği belirtilmiştir. Stackebrandt ve arkadaşları (2002), iki bakterinin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerliğin % 97'den fazla olmasının bu bakterilerin aynı tür sayılabilmesi için yeterli olamayacağını ileri sürmüştür. Buna göre 16S rRNA gen dizilerinin bakterilerin sınıflandırılmasında, cins düzeyinde ve daha üst basamaklarda oldukça güvenilir bir araç olduğu ancak tür ve alt tür seviyesinde yeterli olmayacağı görülmüştür.

Farklı türler olduğu DNA-DNA hibridizasyon deneyleriyle kanıtlanan *Anoxybacillus amylolyticus* ile *Anoxybacillus voinovskiensis* bakterilerinin 16S rRNA genine ait baz dizileri arasındaki benzerliğin % 98; *Anoxybacillus ayderensis* ve *Anoxybacillus flavithermus* bakterileri arasındaki benzerliğin % 99 ve yine *Anoxybacillus ayderensis* ile *Anoxybacillus kamchatkensis* bakterilerinin 16S rRNA dizileri arasındaki benzerliğin % 99 olması, birbiriyle yakın akraba olan bakterilerin sınıflandırılmasında 16S rRNA gen dizilerinin yeterli olmadığı görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle bütün bakteri sistematik otoriteleri, birbirlerine aşırı derecede benzeyen türlerin ayrılmasında 16S rRNA gen dizinin analizinin kullanılamaz olduğunu ve 16S rRNA gen dizinin analizinin sadece cinslerin ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayrımında kullanılmasının uygun olduğunu kabul etmişlerdir.

Bakteri sistematğinde, tür tanımlanmasında alternatif olarak kullanılabilen düşünölen yöntemlerden biri de korunmuş genlerin baz dizilerinin incelenmesidir. Bir türün tanımlanabilmesi için tüm genomunun dizinin analizinin yapılması gerekir. Ancak baz dizileri, tüm genomun baz dizinini yansıtan korunmuş genlerin sistematikte kullanılabilen ileri sürölmüştür (Stackebrandt ve ark., 2002). Bu tip genlerin taşınması gereken belirli kriterler vardır. Öncelikle genin yaygın olarak bakterilerin çoğunda bulunması gerekir. Benzer genlerden oluşan gen grupları dizinin analizini zorlaştıracığından, sistematikte kullanılacak genin tüm genomda tek bir kopya halinde bulunması, aranan bir diğer özelliktir. Bununla beraber ilgilenilen genin filogenetik açıdan yeterli bilgiyi taşıyacak kadar uzun olması ve dizinin analizi yapılabilecek kadar da kısa olması gerekir (Zeigler, 2003).

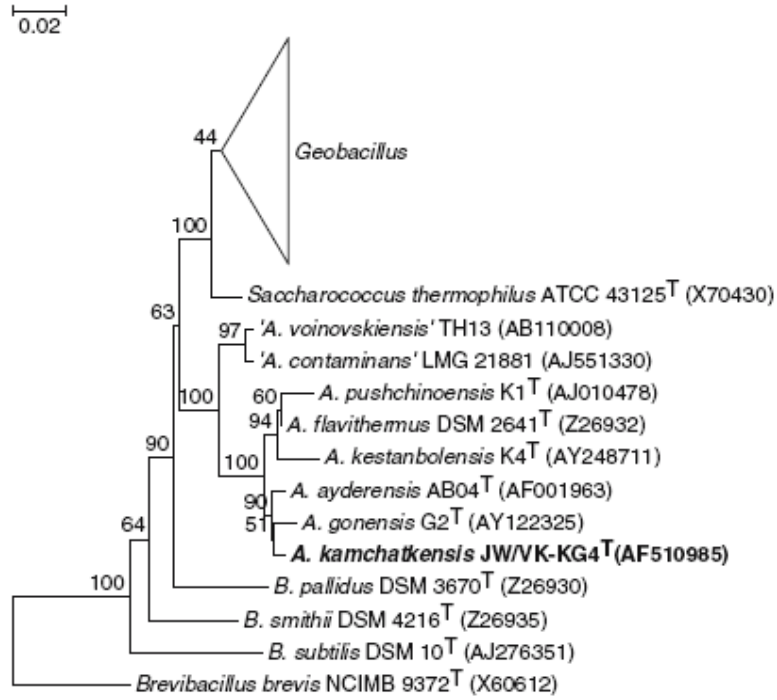
Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılabilen korunmuş genlerin belirlenmesi amacı ile günümüze kadar çok sayıda farklı genin baz dizileri incelenmiştir. Bu çalışmada *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin kolaylıkla tanımlanmasını sağlayacak korunmuş genlerin belirlenmesi amacı ile *recN*, *flaA* ve *ftsY* genlerine ait diziler incelenmiştir.

Dokuz *Anoxybacillus* cinsinden 4 tanesinin (*Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*) *recN* geni başarıyla çoğaltıldı ve bu genlerin baz dizileri belirlenerek birbirleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre en düşük benzerlik % 71 ile *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus* türleri arasındadır. En yüksek benzerliğin ise % 98 ile *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Anoxybacillus contaminans* türleri arasında olduğu görüldü.

Ziegler, 2005 yılında yaptığı çalışmada *Geobacillus* cinsine ait üyelerin *recN* gen dizilerini karşılaştırdı ve bu genin *Geobacillus* cinsi için filogenetik analizlerde kullanılabilir bir gen olduğunu ileri sürdü. Zeigler'e göre iki bakterinin *recN* geni arasındaki benzerlik % 84'den az ise bu bakteriler farklı türlere aittir. *recN* gen dizileri arasındaki benzerlik % 96'dan fazla ise bu bakteriler aynı tür içerisindedir. Eğer benzerlik % 84 ile % 96 arasında ise bu bakteriler için kesin bir şey söylenemez (Zeigler, 2003). Kunhert ve Korczak (2006), *Pasteurellaceae* cinsine ait üyelerin *recN* genleri ile yaptıkları çalışmada Zeigler'in bulgularını destekleyecek sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin *recN* genleri için yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar Zeigler'in bulguları ile çelişmektedir. Cinsin en yeni üyesi olan *Anoxybacillus amylolyticus* (Poli ve ark., 2006), *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Anoxybacillus contaminans*'a % 88, *Anoxybacillus kamchatkensis*'e ise % 71 benzerlik göstermektedir. Buna göre *Anoxybacillus amylolyticus*'un *recN* dizileri, tür içindeki diğer bakterilerin *recN* dizilerine % 96'dan fazla benzerlik göstermediği için ayrı bir tür olduğu bu gen tarafından doğrulanır. Bununla beraber, *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Anoxybacillus contaminans* bakterilerinin *recN* geninin baz dizileri arasındaki benzerlik % 98 olarak bulunmuştur. Zeigler'e göre iki bakterinin farklı türler olarak kabul edilebilmesi için *recN* gen dizileri arasındaki benzerliğin % 96'dan daha az olması beklenir. Buna göre, *recN* geni *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Anoxybacillus contaminans* bakterilerinin farklı türler olduğunu doğrulayamamaktadır.

2005 yılında Kevbrin ve arkadaşları tarafından tanımlanarak *Anoxybacillus* cinsi içerisine dahil edilen *Anoxybacillus kamchatkensis*' in *recN* genine ait baz dizilerinin cinsin diğer üyelerinin *recN* dizilerine olan benzerliği oldukça düşüktür. Ancak bu bakteri *recN* genine göre *Geobacillus* cinsine ait olan bazı türlere yüksek benzerlik göstermektedir. *Anoxybacillus kamchatkensis*' in *Geobacillus thermocatenulatus* ile % 91 ve *Geobacillus lituanicus* ile % 93 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. 16S rRNA dizin analizleri

ile *Anoxybacillus* cinsine ait olduğu kanıtlanan ve *Geobacillus* cinsi ile 16S rRNA geni açısından benzerlik göstermediği (Kevbrin ve ark., 2005) bilinen *Anoxybacillus kamchatkensis*' in, *recN* geninin baz dizileri açısından *Geobacillus* cinsi üyelerine, *Anoxybacillus* cinsi üyelerine oranla oldukça yüksek benzerlik göstermesi, bu genin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin tanımlanmasında güvenilir olmadığını göstermektedir.



Şekil 6. *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin 16S rRNA dizilerine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç (Kevbin ve ark., 2005).

Yapılan bu çalışmalar ışığında *recN* geninin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin tanımlanmasında kullanılabilir bir araç olup olmadığını söylemek güçtür, bunun nedeni yalnızca 4 *Anoxybacillus* türünün *recN* analizi yapılabilmiş olmasıdır. Bu cinse ait olan diğer 5 bakterinin de *recN* geni dizin analizleri yapıldıktan sonra kesin bir kanıya varılacağı düşünülmektedir. Ancak incelenen 4 bakterinin dizin analizleri göz önüne alındığında, *recN* geninin *Anoxybacillus* cinsi üyelerini tanımlamak için güvenilir bir araç olmadığı görülmüştür.

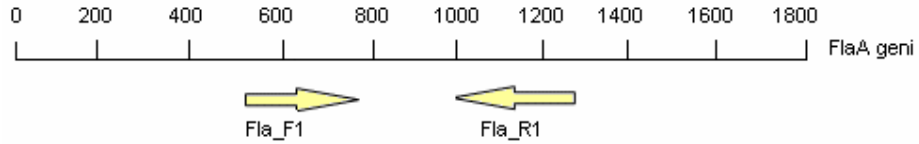
Anoxybacillus cinsine ait olabilecek bakterileri kolaylıkla tanımlayabilmek amacıyla baz dizileri incelenen bir diğer korunmuş gen *flaA* genidir. Bakterilerde kamçı oluşumundan sorumlu olan bu gen, hareketli bakterilerin tümünde bulunur. Günümüze kadar farklı araştırmacılar (Oyofu ve Rollins, 1993; Rasmussen ve ark., 1996; Picken, 1992; Gray ve Kroll 1995; Denning ve ark., 1997) tarafından bu genin bakteri sistematğinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Yapılan bu çalışmada *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus contaminans* ve *Anoxybacillus pushchinoensis* haricindeki *Anoxybacillus* türlerinin *flaA* geninin bir kısmı çoğaltılarak dizin analizi yapılmıştır. Altı *Anoxybacillus* türünün *flaA* geninin baz dizileri birbirleri ile karşılaştırıldığında bu genlerin korunmuş bölgelere sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen yaklaşık 600 bç'lik genin baş kısmındaki yaklaşık 150 bç'lik bölge ile son kısmındaki 50 bç'lik bölge 6 bakteride de yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Genin orta kısmı ise değişkenlik göstermektedir. Buna göre *Anoxybacillus* türlerinin *flaA* gen dizilerinin birbirlerine benzerlikleri % 62 ile % 73 arasındadır.

Farklı cinsler arasında *flaA* geninin benzerlik oranını belirlemek amacı ile *Anoxybacillus* cinsine ait bakteriler farklı cinslere ait bakterilerle karşılaştırıldı. Gram pozitif, basil formundaki bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'e ait *flaA* geninin *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin *flaA* geni baz dizilerine benzerliği % 3-7 olarak bulunmuştur. Bir başka bakteri olan *Proteus mirabilis*'e olan benzerlik ise % 22-38 arasındadır. Elde edilen bu değerlere göre *flaA* geninin *Anoxybacillus* cinsi üyelerini tanımlamada uygun bir araç olduğu düşünülebilir. Ancak, BIOEDIT programı kullanılarak Genbank'ta bulunan diğer bakterilere ait *flaA* genlerini de içeren bir filogenetik ağaç oluşturulduğunda, *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin ayrı bir grup meydana getirdiği, bununla beraber, Gram pozitif, basil formunda bir patojen olan *Clostridium botulinum*'un da bu grup içerisinde yer aldığı görüldü. *Clostridium botulinum*'un *flaA* gen dizilerinin her bir *Anoxybacillus* türünün *flaA* gen dizileri ile karşılaştırılması sonucu bu bakterinin *Anoxybacillus* cinsi üyelerine % 59-62 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bakterinin yanlış tanımlanmış olması ihtimaline karşı aynı bakterinin Genbank'ta bulunan alt türlerine ait *flaA* gen dizileri, *Anoxybacillus* cinsine ait türlerin *flaA* dizileriyle karşılaştırılmış ve yine benzerlik oranlarının % 59-62 oranında olduğu görülmüştür. *Anoxybacillus kamchatkensis*'in *Anoxybacillus ayderensis* ile gösterdiği benzerlik % 62 iken, *Clostridium botulinum* ile gösterdiği benzerlik yine % 62'dir. Aynı cins içerisindeki bakterilerde görülen benzerliğin farklı cinslere ait türlerde de görülmesi, *flaA* geninin türe özgü korunmuş bölgeler taşıdığı

tezini desteklememektedir. Bununla beraber, bu çalışmada *flaA* geninin yalnızca üçte birlik kısmının baz dizilerinin incelendiği göz ardı edilmemelidir.

Flagellin proteininin N- ve C- uçları yüksek oranda korunmuşken, orta kısmı değişkenlik gösterir (Joys, 1988; Wilson ve Beveridge, 1993). Homma ve arkadaşları (1987) flagellin proteini için saç tokası modelini ileri sürmüştür. Buna göre, flagellin monomerleri saç tokası şeklinde dizilim göstermektedir, N- ve C- uçları hücrenin içine gömülüdür ve temel kamçı yapısını oluşturmakla görevlidir, merkezi kısım ise yüzeyde yerleşmiştir. Mutasyon ve X-ray çalışmaları bu yapıyı doğrular niteliktedir (Wilson ve Beveridge, 1993). *E.coli* K-12 suşunun 497 amino asitten oluşan kamçı proteininde, N- ucunda 193, C- ucunda da yaklaşık 117 amino asitin yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir (Kuwayama, 1988). Buna göre, yaklaşık 1700 bç uzunluğundaki *flaA* geninin 5' ucunda 600, 3' ucunda ise 350-400 bç'lik bölge korunmuştur, ortada kalan kısım ise değişken bölgeyi oluşturur.

Yapılan bu çalışmada flagellin protein dizilerine dayanarak dizayn edilen primerler, genin orta kısmındaki daha az korunmuş olan 600 bç'lik bölgeyi çoğaltacak yapıdadır. Kullanılan bu primerlerle elde edilen gen parçası, *Anoxybacillus* cinsi üyeleri içerisinde yüksek oranda benzerlik göstermekte ve bu cinsi diğer cinslerden (*Clostridium* dışında) ayırmada yeterli olmaktadır. Ancak *flaA* geninin sistematiğe kullanılabilirliği açısından kesin bir kaniye varabilmek için, genin tamamına ait dizilerin, özellikle yakın ilişkili olan bakterilerde yüksek oranda korunduğu düşünülen başlangıç ve son kısmı oluşturan dizilerin incelenmesi gerekmektedir.



Şekil 7. Flagellin protein dizilerine dayanarak dizayn edilen FlaA_F1 ve FlaA_R1 primerleri.

Bakteri sistematiğinde, yeni bir türün tanımlanmasında standart olarak kullanılan özelliklerden biri de genomun G + C içeriğidir (Stackebrandt ve ark., 2002). Bakteriler arasında G+C içeriği %24-76 arasında değişmektedir (Torsvik vd., 1995). Bu oran türe

özgüdür fakat seçici değildir, benzer G+C içeriğine sahip iki suş, aynı türe ait olabilir veya olmayabilir. Ancak, bu suşların G+C içerikleri arasındaki farklılık %5'ten fazla ise bu suşlar aynı türün üyeleri olamazlar. G+C içerikleri %10'dan fazla farklılık gösteren bakterilerin aynı cinse ait olmadıkları gösterilmiştir (Rossello-Mora ve Aman, 2001).

Bakterilerde G + C değerini elde etmek için farklı yöntemler mevcuttur (örneğin; denatürasyon sıcaklığı, HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi). Bakteriler için elde edilen G + C değerleri yalnızca türler arasında değil, farklı laboratuvar ve farklı deneylere göre de değişkenlik gösterir. Bu nedenle bir tek türün yayınlanan G + C değeri biyolojik nedenlerle olduğu kadar metoda dayalı nedenlerle de % 5 oranında değişir (Goodfellow ve ark., 1997; Olsen ve ark., 2005).

Yapılan bu çalışmada *ftsY* geninin G + C içeriği hesaplandı ve bu değer yayınlanan gerçek G + C değerleri ile karşılaştırıldı. *ftsY* geninin G + C içeriğine dayanarak hesaplanan değerlere göre *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin G + C değerleri, % 42,8 ile % 52,0 arasında değişmektedir. *Anoxybacillus flavithermus* % 42,8 ile en düşük G + C değerini verirken *Anoxybacillus kestanbolensis* % 52,0 ile en yüksek değeri verir. İki bakteri arasındaki G + C farkı % 10' dan daha fazla olmadığından (% 9,2), aynı cins içerisinde kabul edilirler. Bu iki bakterinin gerçek G + C değerleri arasındaki fark % 8,4'tür.

Anoxybacillus cinsine ait olan bakterilerin *ftsY* geninin G + C içeriğine bağlı olarak hesaplanan G + C değerleri, gerçek G + C değerinden ortalama olarak % 1,4 farklılık göstermektedir. Hesaplanan değerlerle gerçek değerler arasındaki fark % 3,3'ü geçmemektedir (*Anoxybacillus amylolyticus* için hesaplanan G + C değeri % 46,8; gerçek G + C değeri % 43,5'dir). Hesaplanan G + C değerleri ile yayınlanmış olan gerçek G + C değerlerinin birbirine oldukça benzer olması nedeni ile bakterilerin G + C değerlerinin hesaplanmasında korunmuş genlerin kullanılabilmesi düşünülmektedir. Korunmuş genler yatay gen transferinden etkilenmediğinden gerçek genomu iyi bir şekilde yansıtır. *ftsY* geni yüksek oranda korunmuş bir gen dir ve tüm genomun G + C içeriğini yansıtan G + C oranına sahiptir. Bu nedenle *ftsY* geni tüm genomun özelliklerini yansıtan bir gen olarak düşünülebilir.

ftsY geninin tüm genomun G + C içeriğini yansıtmasının yanı sıra filogenetik analizlerde kullanılabilirliğini ölçmek amacı ile *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin *ftsY* gen dizileri birbirleri ile ve Genbank'ta bulunan diğer bakterilere ait dizilerle karşılaştırıldı. Sonuçta *ftsY* gen dizileri arasındaki benzerlik oranlarının *Anoxybacillus* cinsi için % 70 ile

% 100 arasında geniş bir aralığa yayıldığı görüldü. *Anoxybacillus* türlerinin *ftsY* gen dizilerinin farklı cinslere ait bakterilere ait *ftsY* gen dizileri ile karşılaştırılmasıyla benzer sonuçlar elde edildi. Buna göre *ftsY* geni *Anoxybacillus* cinsi için yeni türlerin tanımlanmasında ve bakterilerin akrabalık derecelerinin belirlenmesinde uygun bir gen değildir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Anoxybacillus* cinsi içerisinde tanımlanan bakteriler olan *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*'un *recN*, *flaA* ve *ftsY* genlerinin bakteri sistematikindeki önemleri incelendi.

Sırası ile *recN* geni için 1700 baz çiftlik, *flaA* geni için 600 baz çiftlik ve *ftsY* geni için 900 baz çiftlik DNA parçaları tasarlanan primerler yardımıyla çoğaltıldı ve p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. Her bir gen için belirlenen diziler birbirleri ile ve Genbank'daki diğer bakterilere ait dizilerle karşılaştırıldı.

Anoxybacillus contaminans, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus kamchatkensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*'dan elde edilen *recN* dizilerinin karşılaştırılması sonucu *recN* geninin *Anoxybacillus* cinsine ait üyeleri belirlemek için uygun bir gen olmadığına karar verildi. Ancak kesin bir karara varmak için diğer *Anoxybacillus* türlerine ait *recN* genlerinin de çoğaltılarak incelenmesi uygun görüldü.

Anoxybacillus cinsine ait bakterilerin *flaA* geninin birbirleri ile ve farklı cinslere ait bakterilerle karşılaştırılması sonucu, bu genin *Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerde korunmuş olan özgün dizilere sahip olduğu belirlendi. Ancak, bu çalışmada incelenen *flaA* geninin üçte birlik kısmının tek başına yeterli olmayabildiği, genin geri kalan üçte ikilik kısmının da dizilerinin belirlenmesi ile elde edilecek tam bir *flaA* geninin, *Anoxybacillus* cinsine ait üyeleri tanımlamada uygun bir araç olacağı kanısına varıldı.

Bir başka korunmuş gen olan *ftsY* geninin G + C içeriği incelendi ve tüm genomun G + C içeriği ile karşılaştırıldığında, bu geninin ortalama % 1,4 fark ile bakterinin gerçek G + C içeriğini yansıttığı tespit edildi. Buna göre *ftsY* geninin *Anoxybacillus* bakterilerinin genomunun özelliklerini yansıtan bir gen olduğuna karar verildi.

6. ÖNERİLER

recN geninin *Anoxybacillus* cinsine ait üyelerin tanımlanmasında yeterli bir gen olup olmadığını kesin olarak belirlemek amacı ile tüm *Anoxybacillus* türlerinin *recN* genlerinin dizin analizleri yapılarak incelenmeleri gerekmektedir. *recN* geni açısından *Geobacillus* türlerine yüksek oranda benzerlik gösteren *Anoxybacillus kamchatkensis*'in sistematikte önemli olabilecek farklı korunmuş genler açısından *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* türleri ile karşılaştırılması önerilmektedir.

Anoxybacillus cinsinin sistematığında önemli olabileceği düşünülen *flaA* geni hakkında kesin bir kaniya varmak için bu genin tamamının izole edilip gen dizilerinin belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Termofilik karakterli organizmalar sahip oldukları ısı kararlı enzimler nedeni ile endüstriyel alanda büyük öneme sahiptirler. Bu nedenle, termofilik üyelerin oluşturduğu *Anoxybacillus* cinsinin sınıflandırılması ve bu cinse ait üyelerin tanımlanması da önem arz etmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen ve *Anoxybacillus* cinsine ait olabileceği düşünülen yeni izolatların kolaylıkla tanımlanabilmesi için, farklı korunmuş genlerin incelenerek bu genlerin *Anoxybacillus* cinsi açısından öneminin belirlenmesinin uygun olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aguilar, A., 1996. Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations, FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Andersen, S.B. 2000a. Random Amplified Polymorphic DNA.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. ve Collins, M. D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Lett Appl Microbiol., 13, 202–206.
- Belduz, A.O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1315-1320.
- Belduz, A. O., Lee, E. J. ve Harman, J. G., 1993, Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*: targeting positions 72 and 82 of the cyclic nucleotide binding pocket, Nuc. Acids. Res., 21, 1827-1835.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnol. Adv., 18, 355–383.
- Brock, T., 1994. Yellowstone Association for Natural Science, History & Education, Inc. Yellowstone National Park, Wyoming
- Burg, B.V.D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6, 213-218.
- Chien, A., Edgar, D. ve Trela, J., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophilic *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 127, 1550–1557.
- Cho, J. C. ve Tiedje, J. M., 2001. Bacterial Species Determination from DNA-DNA Hybridization by Using Genome Fragments and DNA Microarrays, Appl. Env. Microbiol., 67, 3677-3682.
- Condon, C., Squires, C. ve Squires, C.L., 1995. Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*, Microbiol. Rev., 59, 623-645.
- Çanakçı, S., 2003, Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- De Clerck E., Rodríguez-Díaz M, Vanhoutte T, Heyrman J, Logan N. A. ve De Vos P., 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 941–946.

- De Ley, J., Cattoir, H. ve Reynaerts, A., 1970. The Quantitative Measurement of DNA Hybridization from Renaturation Rates, Eur. J. Biochem., 12, 133-142.
- Denning, N., Morgan, J. A. W., Whipps, J. M., Saunders, J. R. ve Winstanley, C., 1997. The flagellin gene as a stable marker for detection of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Lett Appl Microbiol., 24, 198-202.
- Duim, B., Vandamme, P. A. R., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J. R. ve Wagenarr, J. A., 2001. Differentiation of Campylobacter species by AFLP fingerprinting, Microbiology, 147, 2729-2737.
- Dulger, S., Demirbag, Z. ve Belduz, A.B., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. ve *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1499-1503.
- Dulger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Endo E., 1962. Studies on protease produced by thermophilic bacteria, J. Ferment. Technol. 40, 346-353.
- Erlich, H., Gelfand, D. ve Saiki, R., 1988. Specific DNA Amplification Product Review, Nature, 33, 461-462.
- Ezaki, T., Saidi, S.M., Liu, S.L., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., ve Yabuuchi, E., 1990. Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amounts of gram positive bacteria. FEMS Microbiol Lett., 55, 127-130.
- Fournier, P.E., Suhre K., Fournous G. ve Raoult D., 2006. Estimation of Prokaryote Genomic G + C Content by Sequencing Universally Conserved Genes, , Int. J. Syst. Evol. Microbiology,
- Gey, M. ve Unger, K., 1995. Calculation of the Molecular Masses of Two Newly Synthesized Thermostable Enzymes Isolated from Thermophilic Microorganisms, J. Chromatogr., 166, 188-193.
- Giovannoni S., 1991. The polymerase chain reaction, Ed. Stackebrandt E. ve Goodfellow M., nucleic acid techniques in bacterial systematics, Wiley publishers, UK.
- Gonzalez, J.M. ve Saiz-Jimenez, C., 2002. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol content in microorganism by thermal denaturation temperature, Environmental Microbiology, 4, 11, 770-773.
- Gonzalez, J. M. ve Saiz-Jimenez,C., 2005. A Simple Fluorimetric Method for the Estimation of DNA-DNA Relatedness between closely Related Microorganisms by Thermal Denaturation Temperatures, Extremophiles, 9, 75-79.
- Goodfellow, M., Manfio, G.P. ve Chun, J., 1997. Species: The Units of Biodiversity, Claridge, M. F. ve Dawah, H. A., Eds., Chapman and Hall, London, 25 s.

- Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nuc. Acids Res., 12, 5837-5852.
- Gray, D. I. ve Kroll, R. G., 1995. Polymerase chain reaction amplification of the *flaA* gene for the rapid identification of *Listeria* spp. Lett Appl Microbiol., 20, 65-68.
- Gurtler, V. ve Stanisich, V.A., 1996. New Approaches to Typing and Identification of Bacteria Using the 16S-23S rDNA spacer, Microbiology, 142, 3-16.
- Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B. C., Lück, P. C., Mann, K.-H., Marre, R., Ott, M. ve Hacker, J., 1995. Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* Serogroup 1. Infect Immun., 63, 2499-2507
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S. ve Iino, T., 1987. Regions of *Salmonella typhimurium* flagellin essential for its polymerization and excretion. J Bacteriol., 169, 291-296.
- Inan, K., 2005, Türkiye'nin Çeşitli Kaplıcalarından *Anoxybacillus* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. ve Herdman, M., 2000. Conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. Microbiology, 146, 1275- 1286.
- Ito, M., 1998. Submarine fan sequences of the lower Kazusa Group, a Plio-Pleistocene forearc basin fill in the Boso Peninsula, Japan, Sedimentary Geology 122, 69-93.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. ve Kersters, K., 1996. Evaluation of the DNA Fingerprinting Method AFLP as A New Tool in Bacterial Taxonomy, Microbiology, 142, 1881-1893.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. ve Strauss, N., 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms, Appl. Env. Microbiol., 59, 945-952.
- Johnson, J.L., 1985. Methods in Microbiology, Volume 18, Academic Press, Inc. Ltd., London.
- Joys, T. M., 1988. The flagellar filament protein. Can J Microbiol., 34, 452-458.

- Kevbrin, V. Zengler K., Lysenko A. M. ve Wiegel J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geysir valley, Kamchatka. *Extremophiles*, 9, 391–398.
- Ko, C.Y., Johnson, J.L., Barnett, L.B., M..., H.M. ve Vercellotti, J.R., 1977. A sensitive estimation of the percentage of guanine plus cytosine in deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 80, 183-192.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, Alkaliphilic and Cellulase Free Xylanases Production by *Thermoactinomyces thalophilus* Subgroup C., *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 606–610.
- Kuhnert, P. ve Korczak B.M., 2006. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G + C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology*, 152, 2537- 2548.
- Kumar, H.D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kuwajima, G., 1988. Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 170, 3305-3309.
- Lee, K.Y., Wahl, R. ve Barbu, E., 1956. Contenu en Bases Purique et Pyrimidiques des Acides Deoxyribonucleiques des Bacteries, *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 212-224.
- Lewin, R. A. 1997. *Saprospira grandis*: a flexibacterium that can catch bacterial prey by “ixotrophy.” *Microbial Ecol.*, 34, 232- 236.
- Lin, J.J., Kuo, J. ve Ma, J., 1996. A PCR-Based DNA Fingerprinting Technique: AFLP for Molecular Typing of Bacteria , *Nucleic Acids Research* , 24, 3649-3650.
- Louws, F.J., M. Schneider, and F.J. de Bruijn. 1996. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *Technomic Publishing Co., Inc.*, Lancaster, 5-30.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. ve Schleifer, K.-H., 1998. Bacterial Phylogeny Based on Comparative Sequence Analysis, *Electrophoresis*, 19, 554-568.
- Lupski, J.R. ve Weinstock, G.M., 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174, 4525- 4529.
- Mandel, M., Igambi, L., Bergendahl, J., Dodson, M.L., Jr., ve Scheltgen, E., 1970. Correlation of melting temperature and cesium chloride buoyant density of bacterial deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.*, 101, 333- 338.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, Newyork.
- Marmur, J., 1961. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms, *J. Mol. Biol.*, 3, 18.
- Marmur, J. ve Doty, P., 1962. Determination of the Base Composition of deoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature, *J. Mol. Biol.*, 5, 109-118.
- Mesbah, M. ve Whitman, W.B., 1989. Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA. *J Chromatogr.*, 479, 297-306.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based Strategies for Protein Thermostabilization, *Trends Biotechnol.*, 11, 88–95.
- Naimi A., Beck G. ve Branlant C., 1997. Primary and Secondary Structures of rRNA Spacer Regions in *Enterococci*. *Microbiology*, 143, 823- 834.
- Nguimbi, E., Li, Y., Gao, B., Li, Z., Wang, B., Wu, Z., Yan, B., Qu, Y. ve Gao, P., 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic *Myxobacteria* ve Differentiation of Closely Related Strain, *System. Appl. Microbiol.*, 26, 262-268.
- Olsen, I. ve Moller, K., 2005. Genus *Actinobacillus* Brumpt 1919, 849^{AL}. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*.
- Oyofa, B. A. ve Rollins, D. M., 1993. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.*, 59, 4090-4095.
- Owen, R.J., Hill, L.R. ve Lapage, S.P., 1969. Determination of DNA base compositions from melting profiles in dilute buffers. *Biopolymers*, 7, 503-516.
- Palleroni, N. J., 1993. Structure of Bacterial Genome, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd, London.
- Picken, R. N., 1992. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J. Clinical Microbiol.*, 30, 99-114.
- Pikuta, E., Cleland, D. ve Tang J., 2003. Aerobic Growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T: Emended Descriptions of *A. pushchinoensis* and the Genus *Anoxybacillus*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1561-1562.

- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. Nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 2109-2117.
- Poli, A., Esposito E., Lama L., Orlando P., Nicolaus G., Appolonia F., Gambacorta A. ve Nicolaus B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). Systematic and Applied Microbiology, 29, 300–307.
- Poonam, N. ve Dalel, S., 1995. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing, Enzyme Microb. Technol., 17, 770–778.
- Rademaker, J.L.W., Hoste B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. ve Bruijn, F.L., 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR Genomic Fingerprinting with DNA-DNA Homology Studies: *Xanthomonas* as a Model System, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 665-677.
- Rasmussen, H. N., Olsen, J. E., Jorgensen, K. ve Rasmussen, O. F., 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. Lett Applied Microbiol., 23, 363-366.
- Rossello-Mora, R. ve Aman, R., 2001. The Species Concept for Prokaryotes, FEMS Microbiology Reviews, 25, 39-67.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffe, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. ve Erlich, H., 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase, Science, 239, 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Volume 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schildkraut, C.L., Marmur, J., and Doty, P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in Cs Cl. J Mol Biol., 4, 430-443.
- Schultheiss, D., Kube, M. ve Schuler, D., 2004. Inactivation of the Flagellin Gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* Results in Nonmagnetotactic Mutants Lacking Flagellar Filaments. Appl. Environ. Microbiol., 70, 3624-3631.
- Stackebrandt, E., Fredericksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kampfer, P., Maiden, M.C.J., Nemse, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A.C. ve Whitman, W.B., 2002. Report of the Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1043-1047.

- Stackebrandt, E. ve Goebel, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, Int. J. Sys. Bacteriol., 44, 846-849.
- Stackebrandt, E. , W.Liesack, R. Webb ve D. Witt, 1991. Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. *Actinomycetes*, 2: 54- 61
- Stackebrandt, E. ve Swiderski, J., 2002. Applications and Systematics of Bacillus and Relatives, Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N.A. ve Vos, P.D., Eds., Oxford: Blackwell Science Ltd.,Canada, USA.
- Tamaoka, J., ve Komagawa, K., 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase highperformance liquid chromatography. FEMS Microbiol Lett., 25, 125–128.
- Tenover F.C. ve Unger E.R., 1995. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. DH Persing, TF Smith, FC Tenover, TJ White (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*, American Society for Microbiology, Washington, 3-25.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewinak, F., Jeanmougin, F. ve Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignmentaided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.*, 25, 4876- 4882.
- Tonjum, T., Welty, D.B., Jantzen, E. ve Small, P.L., 1998. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, ve *M. haemophilum*: Mapping of Their Relationships to *M. tuberculosis* by Fatty Acid Analysis, DNA-DNA Hybridization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis, Journal of Clinical Microbiology, 36, 918-925.
- Torsvik, V., Daae, F.L. ve Goksoyr, J., 1995. Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications, Trevors, J.T. ve Elsas, J.D., Eds., Springer Verlag Berlin, Germany, 29 s.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. ve Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Van Berkum, P., Navarro R. B., ve Vargas A. A. T., 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup⁺) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*Rhizobium tropici. Appl. Environ. Microbiol., 60, 554-561.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and Applications of Starchconverting Enzymes of the α -amylase Family, J. Biotechnol., 94, 137–155.

- Versalovic, J., Scheneider, M., de Bruijn, F.J. ve Lupski, J.R., 1994, Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence Based PCR (rep-PCR), *Meth. Cell. Mol. Biol.*, 5, 25-40.
- Versalovic, J ve Lupski JR., 1996. Distinguishing bacterial and fungal pathogens by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *LabMedica International*, 13, 12-15.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Muiper, M. ve Zabeau, M., 1995. AFLP: A New Concept for DNA Fingerprinting, *Nucleic Acids Res.*, 21, 4407-4414.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. ve Trüper, H.G., 1987. Report of The *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464.
- Whittam, T. S., 1995. Genetic population structure and pathogenicity in enteric bacteria. *Population Genetics of Bacteria* (Society for General Microbiology Symposium). Düzenleme S. Baumberg, J. P. W. Young, E. M. H. Wellington ve J. R. Saunders. Cambridge: Cambridge University Press, 52, 217-245.
- Willems, A., Coopman, R. ve Monique G., 2001. Comparison of Sequence Analysis of 16S-23S rDNA Spacer Regions, AFLP Analysis and DNA-DNA Hybridizations in *Bradyrhizobium*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 623-632.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers, *Nuc. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
- Wolfe, A.D. ve Liston, A., 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, editors. *Molecular Systematics of Plants II*, New York, 43-86.
- Xu, H.X., Kawamura, Y., Li, N., Zhao, L., Li, T.M., Li, Z.Y., Shu, S., ve Ezaki, T., 2000. A rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 50, 1463-1469.
- Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H., Yokota, Y., Nakajima, K. ve Hoshino, T., 2004. *Anoxybacillus voinovskinensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic Bacterium from a Hot Spring in Kamchatka, *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1239-1242.
- Zeigler, D.R., 2003. Gene Sequences Useful for Predicting Relatedness of Whole Genomes in Bacteria, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1893-1900.

Zeigler, D.R., 2005. Application of a recN Sequence Similarity Analysis to the Identification of Species Within the Bacterial Genus *Geobacillus*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,55, 1171-9

8. EKLER

Ek 1. *Anoxybacillus contaminans* Bakterisinin *recN* Geninin Baz Sırası

CAGCTCCGGCCGCCNGGCGGGCCGCGGGAAATTCGATTACGCGATTCATCTGTTGATCGGTG
GGCGAGGTTTCGGCGGGGTTTGTCCGTTATGGCGCAGAGCGAGCAGAAATTGAAGGGCTGTT
TTTATTAAGCGACGACACCCACCCATGTTACGAAAAATGTGCCGACGTTGGCATTGAGATC
AGCGAAGGAATGGTCGTATTGCGCCGCGAGATTTCCGTGAGCGGCAAAAGTGTTCGCGTG
TAAACGAAAACTTGTGACGATGGCGGTCTTGC GCGACATTGGTTCTACGCTTGTGATAT
TCACGGGCAGCACGAACACCAAGA ACTGATGGATCCGACGAAACATTTGCCGCTACTAGAT
GAGTACGGCGGAAAAAGAAATTAGCGCAGCATTAGAAGAATATCGCGCAGTGTATGAAAAAT
ATGAACAAGTGAAAAACAGCTGCAAAAGCTAAGCGAAAACGAACAACAAATGGCGCATCG
GCTCGATTTATTAACGTTTCAGCTCGATGAAATTCAAAAGGCGAACTTGCAACCGTACGAA
GATGAACAGTTAATGGAAGAAAAAGTGAAAATTGTGAACTTCCAAAAAATTTACGACGCGC
TAAAAACGGCTACGATGCATTGTACGGCGAACAACGAGGGCTCGACTGGGTTGGACTAGC
GATGAGCCATTTAGACGATGTTGCCCATATCGACCCGGCGTTAAAAGAAGCGTATGAAACG
ATTGCCAATAGCTATTATTTGCTAGAAGAAACGGCATATAAGCTGCGTGATGAACTCGAAC
AGCTAGAATACGACCCAAGCCGACTAGACTTCATTGAAGGCCGATTGAACGAAATTAGCCA
TTTAAAAACGAAAATACGGGCAGACGGTTCGCGGAAATTTTACAATATGCGGAAAAAATCGCC
GAAGAAATCGATTTCGATTCAAACCCGCGATACGCGAATTCATCAGCTGCAAAAAGAGCTAC
AATCGCTGACAGAAGATTTAGTCATCGAAGCGAAAAACGTCACAAACGTGCGCATGAAGCA
TGCGAAGACGCTCATTACGCATATTCACCAAGA ACTAAAAGATTTATACATGGAAAAAACG
ACGTTTCGATATTGTATTTACGAAGCGCGAAGGAACGCTTGACGCCCGATTATCGACGGTG
TGCCAGTCAAGTTTCAAGCGGATGGCGTTCGATGTCGTGGAATTTTATATCTCGACAAACGT
TGGTGAACCGCTAAAACCGCTCGCCAAAATTGCTTCCGGCGGAGAATTATCGCGCATTATG
CTCGCATTA AAAAGCATTTTTTTCGAAACACCAAGGTGTAACGTGATTATTTTCGATGAAG
TCGACACGGGGGTGAGCGGCCGTGTCGCCAGGCGATTGCTGAAAAAATTTACCGTGTTTC
TGTCGGCTCACAAGTGCTGTGCATTTCCCATTTGCCACAAGTAGCGGCGATGGCAGATACG
CATTTATTTATCTCTAAAGAAACGGACGGAACCCGAACGAAAACGTCGGTGAAAGTGTGTA
CAAAAGAAGAAAAAATTAAGAAATTGGGCGGATGATTTCGGTGTCGAAATTACGGAGTT
AACGAAAGAGCATGCCAAAGAGCTGTTGGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGG
TCGACCATATGGGAGAGCTCCCACCGCGTGANN

Anoxybacillus contaminans Bakterisinin *recN* Geninin Protein Sırası

QLRPXGGRGKFDYAIHLLIGGRGSAGFVRYGAERAEIEGLFLLSDDTHP
CYEKCADVGIEISEGMVVLRRREISVSGKSVCRVNGKLVTMVLRDIGST
LVDIHGQHEHQELMDPTKHLPLLDEYGGKEISA ALEEYRAVYEKYEQV
KKQLQKLSENEQQMAHRLDLLTFQLDEIQKANLQPYEDEQLMEEKVKI
VNFQKIYDALKNGYDALYGEQRGLDWVGLAMSHLDDVAHIDPALKEA
YETIANSYILLEETAYKLRDELEQLEYDPSRLDFIEGR LNEISHLKRKY
GQTVAEILQYAEKIAEEIDS IQNRDTRIHQLQKELQSLTEDLVIEAKNVT
NVRMKHAKTLIQHIHQELKDL YMEKTTFDIVFTKREGTLD APIIDGVPV
KFQADGVDVVEFYISTNVGEPLKPLAKIASGGELSRIMLALKSIFSKHQ
GVTSIIFDEVDVTGVSGRVAQAIAEKIYRVSVGSQVLCISHLPQVAAMAD
THLFISKETDGTTRTKTSVKVLTKEEKIKEIGRMISGVEITELTKEHAKEL
LEITSEFAAACRSTIWESSHRVX

Ek 2. *Anoxybacillus pushchinoensis* Bakterisinin *recN* Geninin Baz Sırası

CCNTCCAGCTCCGGCCGCCAGGCGGCCGCGGGAAATTCGATTACGCGATTTCATTTGTTGAT
 CGGTGGGCGAGGTTTCGGCGGAGTTTGTCCGTTATGGCGCAGAGCGAGCAGAAATTGAAGGG
 CTGTTTTTATTAAGCGACGACACCCACCCATGTTACGAAAAATGTGCCGACGTTGGCATTG
 AGATCAGCGAAGGAATGGTCGTATTGCGCCGCGAGATTTCGTTGAGCGGCAAAAAGTGTTTG
 CCGTGTAAACGAAAACTTGTGACGATGGCGGTCTTTCGCGGACATTGGTTCTACGCTTGTC
 GATATTCACGGGCAGCACGAACACCAAGAACTGATGGATCCGACGAAACATTTGCCGCTAC
 TAGATGAGTACGGCGGAAAAGAAATTAGCGCAGCATTAGAAGAATATCGCGCAGTGTATGA
 AAAATATGAACAAGTGA AAAACAGCTGCAAAAGCTAAGCGAAAACGAACAACAAATGGCG
 CATCGGCTCGATTTATTAACGTTTCAGCTCGATGAAATTCAAAAGGCGAACTTGCAACCGT
 ACGAAGATGAACAGTTAATGGAAAGAAAAAGTGA AAAATGTTGAACTTCCAAAAAATTTACGA
 CGCGCTAAAAACGGCTACGATGCATTGTACGGCGAACAACGAGGGCTCGACTGGGTTGGA
 CTAGCGATGAGCCATTTAGACGATGTTGCCCATATCGACCCGGCGTTAAAAGAAGCGTATG
 AAACGATTGCCAATAGCTATTATTTGCTAGAAGAAACGGCATATAAGCTGCGTGATGAACT
 CGAACAGCTAGAATACGACCCAAGCCGACTAGGCTTCATTGAAGGCCGATTGAACGAAAT
 AGCCATTTAAAACGAAAATACGGGCAGACGGTCGCGGAAATTTTACAATATGCGGAAAAAA
 TCGCCGAAGAAATCGATTGATTCAAAAACCGCGATACGCGAATTCATCAGCTGCAAAAAGA
 GCTACAATCGCTGACAGAAGATTTAGTCATCGAAGCGAAAACGTCACAAACGTGCGCATG
 AAGCATGCGAAGACGCTCATTGAGCATATTCACCAAGAACTAAAAGATTTATACATGGAAA
 AAACGACGTTTCGATATTGTATTTACGAAGCGCGAAGGAACGCTTGACGCCCGATTATCGA
 CGGTGTGCCAGTCAAGTTTCAAGCGGATGGCGTCGATGTCGTGGAATTTTATATCTCGACA
 AACGTTGGTGAACCGCTAAAACCGCTCGCCAAAATTGCTTCCGGCGGAGAATTATCGCGCA
 TTATGCTCGCATTAAAAAGCATTTTTTCGAAACACCAAGGTGTAACGTCGATTATTTTCGA
 TGAAGTCGACACGGGGGTGAGCGGCCGTGTCGCCAGGCGATTGCTGAAAAAATTTACCGT
 GTTTCTGTCCGCTCACAAGTGTGTGCATTTCCCATTTGCCACAAGTAGCGGCGATGGCAG
 ATACGCATTTATTTATCTCTAAAGAAACGGACGGAACCCGAACGAAAACGTCCGGTGAAGT
 GTTGACAAAAGAAGAAAAAATTAAGAAATTTGGGCGGATGATTTCCGGTGTGCAAATTACG
 GAGTTAACGAAAGAGCACGCCAAAGAGCTGTTGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCT
 GCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCACGCGTGATN

***Anoxybacillus pushchinoensis* Bakterisinin *recN* Geninin Protein Sırası**

XSSSGRQAAAGNSITRFICSVGEVRRSLSVMAQSEQKLKGCIFYATTPTH
 VTKNVPTLALRS AK EWSYCAARFPAAKVFAVTENLRWRSCATLVLRLS
 IFTGSTNTKNWIRRNICRYMSTAEK KLAQHKNIAQCMKNMNKKN SCKS
 AKTNNKWRIGSIYRFSSMKFKRRTCNRRTKMNSWKKKLLTSKKFTTRKT
 ATMHCTANNEGSTGLDRAITMLPISTRKKRMRKRLPIAII CKKRHISCV
 MNSNSNTTQADASLKADTKLAINENTGRRSRKFYNMRKKSPKKSIRFK
 TAIREFISCKKSYNRQKISSKRKTSQTCASMRRRSFSIFTKNKIYTWKRR
 RSILYLRS AKERLSTPRLSTVCQSSFKRMASMSWNFISRQTLVNRNRS PK
 LLP AENYRALC SHK AFRNTKVRRLFSMKSTRGAAVSPRLLK KFTVF
 LSAHKCCAFPICHKRRWQIRIYLSLKKRTEPERKRRKCQKKKLLKLLG
 GFPVSKLRSRKSTPKSCWKSLVNSRPPAGRPYGRAPTRDX

Ek 3. *Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *recN* Geninin Baz Sırası

CANTNCAGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTACGCGATTTCATCTGTTGAT
 CGGCGGACGCGGCTCCGCTGAGTTTGTCCGCTTTGGAGCGGAAAAGGCGGAAATCGAAGGG
 CTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCAGACGTTGGCATCG
 ACGCCAGCGACGGCATGATCGTGTGCGCCGCGATATTTTCGCCAACGGCAAAAAGCGTCTG
 CCGCATTAACGGCAAGCTCGTCACGACGGCGGTGCTGCGCGACATCGGGGCGACGCTTGTT
 GATATTCACGGCCAGCATGAACATCAAGAACTGATGGATCCGTCCCGCCATCTGCCGCTTT
 TAGACGAGTTCGGCGGCCTAGAGGGCGGCAGAGGGCGCTTGCTCGCTACCGCGCCGTCTACGA
 GCGGTATGAGGAGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAATGAACAGCAAATGGCG
 CACCGGCTTGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGTGAATCGAGCAGGCGGCGCTCGAGCCGG
 GCGAGGACGAGCGGCTGATGGAGGAAAAAGTTTCGCATCGTCAATTTTCAAAAAATTTATAC
 CGCGCTGCAGAAAAGCTATGAGGCCCTCTCCGGAGAGGGACGCGGGCTTGATTCCATCGGG
 GAGGCGATGCGCCATCTCGATGACGTGCGAGGCATGGATGCAGCGCTCAAAGATGCGCATG
 AAACGACGGCGAACTGCTACTATTTGCTCGAGGAAGTCATGTACAAGCTGCGCGATCAAAT
 TGAGGAGATGGAATACGACCCAGAGCGGCTCGATGCCATTGAAAGCNATCGGGCAGCTCAA
 ACGAAAATACGGGGCGACGATCGCCGATATTTTGCACTATGCCGAGACGATCGCCGAGGAA
 ATCGAGACAATCGAAAATCGCGAAGCGCATGTGCATGAGCTTAAGCAGCAGCTCGCTCTGG
 TGACGGACGAGTTGCTCACGGAGGCGAAAAACGTACCCGCCGTTTCGGCAAACATATGCCCG
 GCGCCTGATTGAGCGCATTTCATCAAGAACTGAAAGACTTGTACATGGACAAAACGAAATTT
 GACATCGTATTTGCCAAGCGCGAAGGATCGCTTGACGCTCCCTTGGTTCGACGGCGTGCCGG
 TTAGGTTCCAAGAAGATGGCATCGGTGTCGTGAGTTTTACATTTTCGACGAACGTCGGCGA
 GCCGTTAAAACCGCTCGTCAAAGTCGCTTCCGGCGGCGAGCTGTCGCGCATTATGCTGGCG
 TTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGAGTGACGTCGATTGTTTTTGATGAGGTCGACA
 CCGGTGTCAGCGGACGCGTCCGCCAGGCAATGGCGGAAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCA
 GTCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCATCTGCCGCAAGTCGCTGCGATGGCGGACACGCACTTG
 TTGATCGCCAAAGAGACGGATGGGGAACGGACGAAAACAGTCGTGAGGAAGCTCAATGAGG
 AGGAGAAAGTAAAAGAAATCGGGCGGATGATTTCCGGCGTTCGAGATGACGGAATTGACGAA
 ACGGCACGCCAAAGAGCTGTTGAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACC
 ATATGGAGAGCTCCCACGCTGATNTT

***Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *recN* Geninin Protein Sırası**

XXSSGRHGGRGNSITRFICSADAAPLSLSALERKRRKSKGCFCLMMTAI
 RAGKNAQTLASTPATASCCAAIFSPAKASAALTASSRRRCCATSGRR
 LLIFTASMNKNWIRPAICRFTSSAARRQRLLATAPSTSGMRSSETNKS
 AKMNSKWRTGLICRFSCVKSSRRRSSRARTSGWRKKFASSIFKKFIPRC
 RKAMRSPERDAGLIPSGRRC AISMTSQA WMQRSKMRMRRRTATICS
 RK SCTSCAIKLRRWNTTQSGSMPLKXIGQLKRKYGATIADILHYAETIA
 EEIETIENREAHVHELKQQLALVTDELLTEAKNVTAVRQTYARRLIERI
 HQELKDLYMDKTKFDIVFAKREGSLDALPLVDGVPVRFQEDGIGVVEFY
 ISTNVGEPLKPLVKVASGGELSRLMLKLTIFSKHQGVTSIVFDEVDTG
 VSGRVAQAMA EKIYRIASQSVLCISHLPQVAAMADTHLLIAKETDGE
 RTKTVVRKLN EEEKVKEIGRMISGVEMTELTKRHAKELLEITSEFAAAC
 RSTIWRAPTLX

Ek 4. *Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *recN* Geninin Baz Sırası

GCNAAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTACGCGATTCATTTG
 TTGATCGGTGGACGAGGTTTCGGCCGAGTTTGTCCGTTATGGCGAAGAGCGGGCAGAAATTG
 AAGGGCTATTTTTATTAAGCGACGACACGCCCGTGTACGAAAAATGCGCGGAGGTAGG
 GATTGATATTAGCGAAGGGATGGTTCGTATTGCGCCGGGAGATTTTCGACGAGCGGAAAAAGC
 GTTTGCCGAGTAAATGGAAAACCTCGTGACGACGGCTGTCTTACGCGACATCGGCTCAACAC
 TTGTTCGATATTCACGGACAGCATGAACACCAAGAAGTGTGATGGATCCGAATAAACATTTGCC
 CCTACTAGACGAATACGGCGGAAAAGAAATTAGCGCCGCTTTAGAAGAATATCGCGCTGTC
 TACGAAAAATATGAACAGCTGAAAAACAGCTGCACAACTAAGCGAAAATGAACAACAAA
 TTGCTCATCGGCTCGACTTATTAACGTTCCAGCTCGACGAAATTCAAAAAGCAAATTTGCA
 GCTGAACGAAGACGAACAACCTGATGGAAGAGAAAGTAAAAATTGTGAACTTTCAAAAAATT
 TACGATGACTAAAAACGGATACGATGCATTGTACGGCGAACAGCGCGCGCTCGATTGGG
 TTGGACTAGCGATGAGTCACTTAGACGATGTTGCCCATATTGATCCAGTGTAAAGAAGC
 GTATGAAACGATTGCTAATAGCTATTATTTGCTAGAGGAGACGGCATATAAGCTGCGTGAC
 GAGCTAGAACAGCTAGAATACGACCCGAGCCGACTGGATGTAATCGAAAGGAGACAGTTGC
 TGAAATTTTACAATATGCCGAAAAAATTACCGAAGAAATCGATTTCGATTCAAAACCGCGAC
 ACCCGAATTCATCAGCTACAAAAAGAGCTGCAATCGGTGACAGAAGATTTAGTCGTGCAAG
 CGAAAAACGTCACAAACGTGCGCATGAAGCATGCGAAAACGCTCATTCAGCATATTCACCA
 AGAACTAAAAGATTTATACATGGAAAAACGACGTTTGATATGGTATTTACGAAGCGCGAA
 GGAACGCTGGATGCGCCAATTATTGACGGAGTGCCAGTAAAATTTCAAGCGGATGGCGTCG
 ATGTCGCGGAATTTTACATTTCAACAAACGTGCGTGAACCGCTAAAACCGCTCGCGAAAAT
 TGCTTCTGGCGGAGAATTGTCGCGCATTATGCTCGCATTAAAAGCATTTTTTTCTAAGCAC
 CAAGGCGTGACGTCGATTATTTTCGATGAAGTCGATACCGGTGTAAGTGGTTCGTGTGGCCC
 AAGCCATTGCCGAAAAAATTTACCGCGTTCGTCGCGTTCGCAAGTGTGTGCATTTCCCA
 TTTGCCGCAAGTAGCAGCGATGGCAGATACACACTTATTCATCGCGAAAGAAACGGACGGA
 ACCCGGACGAAAACGTCGGTAAAAGTGTGACAAAAGAAAGAAAAAATTAAGAAATTGGCC
 GGATGATTTCCGGTGTGCAAATTACGGAGTTAACGAAAAGAGCATGCCAAAGAGCTGTTGGA
 AATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTT
 GATGCTNNTT

***Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *recN* Geninin Protein Sırası**

XKSHAPAAAMAAGIRLRDSFVDRWTRFGRVCPLWRRAGRNRRAIFIKRR
 HAPVLRKMRGGRDYRRDGRIAPGDFDERKKRLPSKWKTRDDGCLTRH
 RLNTCRYSRATAPRTDGSETFAPTRRIRKRNRRFRRISRCLRKITAECT
 AAQTKRKTNCSSARLINVARRNSKSKFAAERRRTTDGRESKNCELS
 KNLRCTKKRIRCIVRRTARARLGWTSDESLRRCCPYSSVKRSVNDCLLF
 ARGDGIARARTARIRPEPTGCNRKETVAEILQYAEKITEEIDSIQNRDT
 RIHQLQKELQSVTEDLVVEAKNVTNVRMKHAKTLIQHIHQELKDLYME
 KTTFDMVFTKREGTLDAPIIDGVPVKFQADGVDVAEFYISTNVGEPLKP
 LAKIASGGELSRIMLALKSIFSKHQGVTSIIFDEVDTGVSGRVAQAIK
 IYRVSVGSQVLCISHLPQVAAMADTHLFIKETDGTRTKTSVKVLTKEE
 KIKEIGRMISGVEITELTKEHAKELLEITSEFAAACRSTIWESSQRVDAX

Ek 5. *Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

CAGCTCCGGCCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCAGGATTCGCGATCTCTGAAAAA
 ATGCGTGGACAAATTCGCGGATTAGAAATGGCTTCTAAAAATGCACAAGATGGTATTTCT
 TTAATCCAAACGGCTGAAGGAGCATTGAATGAAACACATGCAATCCTTCAACGTATGCGT
 GAACTTGCTGTTCAAGGTGCAAATGACACAAATACAACAGCAGATCGTGATGAAATTCAA
 AAAGAAATCGATCAGTTAGTAAGCGAACTCGATCGTATCGGTAATACGACAGAATTCAAT
 ACACAGAAGTTATTGAGTGGTGAATTACAAACACAATTTTCCAAATTGGCGCTAACATT
 TCCCAAACAATCACAATTGCAATTAACGATATGCGCGCAAATGCCTTAGGTGTTGACTCT
 TTAACGGTCGATACTAATGCGAATGCAAACAATGCAATTTCTGCAATTGATCAAGCGATT
 AGCCGGGTATCTTCGGAACGTTCTAAATTAGGGGCTATTCAAAATCGTCTCGAGCACACC
 ATTAACAACCTTCGGCACAATCA

***Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

QLRPPWRPREFDSGFAISEKMRGQIRGLEMASKNAQDGLISLIQTAEGAL
 NETHAILQRMRELA VQGANDTNTTADRDEIQKEIDQLVSELDRIGNTTE
 FNTQKLLSGGITNTIFQIGANISQTITIAINDMRANALGVDSLTVDTNAN
 ANNAISAIDQAISRVSSEKSLGAIQNRLEHTINNFGTI

Ek 6. *Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

CGNTNCAGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCGGGCGATGATGCTGCT
 GGGCTAGCGATCTCTGAAAAAATGCGCGGTCAAATTCGCGGGTTAGATATGGCTGCGAAA
 AACTCTCAAGATGCGATTTCTTTAATCCAAACTGCAGAGGGCGCATTGAATGAAACTCAT
 GCGATTCTTCAACGCATGCGTGAAGTCAAGGTGGTAAACGATAACAAACACAAC
 GCAGACCGCAACAACATTCAAGACGAGTTAAATCAATTATTGTCTGAAATCGACCGCATT
 TCTAACACAACACAATTTAACACTAAAACTTGTTAGACGGTTCATTTATTGGCACATTC
 CAAGTAGGTGCAAATGATAATCAAATTATTTCAATTGTCTATTAACCAATGAGCACTGGT
 TCAGGCGCTCTTAATGTGGCTGGTATTTCTGTTGATTCAAACGCTTTATCGAGCCAAGCT
 ATTGCATCGATTGATAACGCAATTAGCGCGGTGTCTAAAGAACGTTCTAAACTTGGTGCA
 TATCAAAACCGTCTAGAGCACACAATCAACAACCTCGGCACAATCA

***Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

XXSSGRHGGRGNSIAGDDAAGLAISEKMRGQIRGLDMAAKNSQDAISL
 IQTAEGALNETHAILQRMRELA VQGGNDTNTTADRNNIQDELNQLLSEI
 DRISNTTQFNTKNLLDGSFIGTFQVGANDNQIISLSINSMSTGSGALNVA
 GISVDSNALSSQAIASIDNAISAVSKERSKLGAYQNRLEHTINNLGTI

Ek 7. *Anoxybacillus gönensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

TTGCTGGGGNACGATGCGGCGGGNTTGGCTATCTCTGAAAAAATGCGCGGCCAAATTTCGC
 GGTCTTGAAATGGCTACTAAAAACGCACAAGACTCTATCTCATTAATTCAAACAGCAGAAG
 GTGCATTAACGGAAACTCACGCAATCCTTCAACGCATGCGCGAACTTGCTGTGCAATCAGC
 AAATGACACAAACACACAAGAAGATCGTGATGCTCTACAAGCAGAAGTGAATCAATTAATC
 TCTGAACTTAACCGTATTGCAAACAACACAGAATTTAACACACAAAAACTGTTAGACGGTA
 CGTTTAGTGGTAAACGTTCCATATCGGTGCGAATTCTGGTCAAGCGATCACATTAACAAT
 TAATACCATGACTGCAGGCGGTTTAGGTGTGAGCGGATTAAGCATTTCTTCTCAAGCTGCT
 GCTGATAGCGCTATTACAACAATTAATGATGCAATGAAACAGTTTTCTAGCGAACCGTGCG
 AAACCTGTGCGTCAACCGTTTAGANCAACACCATNAACANCNTTGGGCACAAA

***Anoxybacillus gönensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

LLGXRCGGXGYLKNARPNSRSNGYKRTRLYLINSNSRRCINGNSRNPS
 THARTCCAISKHKHTRRSCSTSRSESINLTPYCKQHRIHTKTVRRYVWN
 VPYRCEFWSHDHINNYHDCRRFR CERIKHFFSSCCRYYNCCNETVFRTV
 RNLCVNRLXHTXNXXGHK

Ek 8. *Anoxybacillus ayderensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

CAGCTCCGGCCGCCAGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTGGGGATGATGCGGCGGGGTTG
 GCCATTTCCGAAAAAATGCGCTCGCAAATTCGCGGATTAGAAGTTGCAGAACGCAACGCA
 TTAGATGCCATTTTCGCTTATTCAAACAGCGGAGGGGGCGCTCGGCTCTATTCATAGTATT
 TTGCAACGCATGCGTGAGTTAGCGGTACAAGCGGCGAATGGGACGAATACGGATGATGAT
 CGCGAACATATTCAAATGAAATTGATCAGTTAATTGAAGAAATTGATCGAATCGCGGAG
 AACACAACGTTTAAATGGCACTAAGTTGCTAGATGGTAATTTTGCCAATGTTAAATTCCAA
 ATTGGTGCAAATGAGGGAGAAGAAGTAGAGATAACTATAGAAGATATGACAGCAGGAACA
 TTAGGTGTTGATGGTATAGATGTTTCTACAGCGAATCCAAGTGCCATTACAACGATTGAC
 GAAGCGATTAAGACGGTTTCTGTAGAACGTGGGAAACTTGGTGCTTACCAAACCGTTTT
 GAACACACCATTAACAACCTTGGTACAATCA

***Anoxybacillus ayderensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

QLRPPGGRGNSIAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLEVAERNALDAISLIQT
 AEGALGSIHSILQRMRELAVQAANGTNTDDDREHIQNEIDQLIEEIDRIA
 ENTTFNGTKLLDGNFANVKFQIGANEVEITIEDMTAGTLGVDGIDV
 STANPSAITTIDEAIKTVSVERGKLGAYQNRFEHTINNLGTI

Ek 9. *Anoxybacillus voinovskiensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

TTGCTGGGGNACGTGCGGCGGGGTTGGCGATCTCTGAAAAAATGCGCGGCCAAATTCGCG
 GACTGGAAATGGCGCAAAAAAATGCTCAAGACGGCATTCTTTAATCCAAACTGCTGAAGG
 AGCTCTAACAGAACTCATGCCATCCTTCAACGTATGCGTGAGCTTGCTGTGCAAGCAGCG
 AATGATACAAACGTATCTGCTGACCGTACTGCCATTCAAGATGAAATTGATGCGCTTGTTT
 CTGAAATCAATCGTATAGCAGGTAATACAGAATTTAACACACAAAATCTATTAGACGGAAC
 TTTTCTGGTAAAAAATTCACATCGGAGCCAATAGTGGACAATCTATTACAGTAACAATT
 GGAACATGAATGCAAATGCATTAGGAACAACATCTTTAAAAATTGCTAGTGTAAAGTGG
 ATACCGTTACAAATGCAAATGCAGCTATCACAGCTATTGATAAAGCAATGAACAAGTATCA
 ACAGAACGTCTAACTGNCATCAACCCAAAACCGTTTAGAACACACCATCAACACNNTTCGG
 NACA

***Anoxybacillus voinovskiensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

LLGXRAAGLAISEKMRGQIRGLEMAQKNAQDGLISLIQTAEGALTETHAI
 LQRMRELA VQA ANDTNV SADR TAIQDEIDALVSEINRIAGNTEFNTQN
 LLDGTFSGKKFHIGANSGQSITVTIGTMNANALGTTSLKIASVKVDTVT
 NANAAIT AIDKAMNKYQQNVLXSTQNRLEHTINXXRX

Ek 10. *Anoxybacillus kestanbolensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Baz Sırası

CGNTNGCAGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCGGGCGATGACGCAGC
 TGGTTTAGCGATTTCTGAAAAAATGCGTGGACAAATTCGTGGATTAGAGCAAGCATCTCG
 CAACGCGCAAGATGGCATTTCGTTAATTCAAACAGCTGAAGGTGCATTGAATGAGACACA
 TGCATTCTCCAACGTATGCGTGAATTAGCAGTTCAGGCTGCGAACGATACGTATACGAC
 TGCAGATCGTCAGAAGATTTCGTGATGAAGTTGTTCAACTTTACAAGGAAGTAAACCGTAT
 TGCAAGTCAAACACTGAGTTTAATACGAAGTCATTGATTAGATCTGGTATTACAGTTAAATT
 CCATGTTGGTGCAAACAGTAGCCAGACGATCACATTATCTATCAACAAAATGGTTGCTTC
 AACTTTACTTGGAGGAAATACTTCTATCATCAAAGTCTCTTCGCAAACAGGATCTGAAGA
 TTTTATCAAAGCAGTTAACAGTGCCATTAACACCGTGTCTAAAGAGCGTGCAAATCTTGG
 GGCGTACCAGAACCGTTTAGAACACACCATAAACAACCTCGGCACAATCA

***Anoxybacillus kestanbolensis* Bakterisinin *flaA* Geninin Protein Sırası**

XXSSGRHGGRGNSIAGDDAAGLAISEKMRGQIRGLEQASRNAQDGLI
 QTAEGALNETHAILQRMRELAVQAANDTYTTADRQKIRDEVVQLYKE
 VNRIASQTEFNKSLIRSGITVKFHVGANSSQTITLSINKMVASTLLGGN
 TSIKVSSTGSEDFIKAVNSAINTVSKERANLGAYQNRLEHTINNLGTI

Ek 11. *Anoxybacillus contaminans* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

NNGGCNCTNTTNCNATGTCGGAAANTTTAGCGCGGCTTANAAAANACGCGCGACTCTTTTG
 CAGGAAAAGTGAATGACTTAATTGCCCGCTATCGAAAAGTGGATGAAGAGTTTTTTGAAGA
 ACTAGAAGAAATTTTAATTGCGTCAGACGTTGGTGTGGCAACGGTCATGGATTTTATTGAT
 GAGTTGAAAATGGAAGTGAAGCGCCGCAACATTCAAGACCCGAAAGAAATGTATAGCGTCA
 TTTCCGAAAAACTCATCGATATATATCAAGCGAGCGGCGATGAAACGACAGAATTAACAT
 TCAGCCAAACGGTTTAACGGTCATTTTATTTGTCGGTGTCAACGGTGTGCGAAAAACGACG
 ACGATCGGAAAGCTCGCGTATAAATTAACGAAAGGAAAAAAGTGTATGCTTGCGGCAG
 GCGATACGTTCCGTGCTGGGGCGATTGAACAGTTAGAAGTATGGGGAGAGCGAGTAGGCGT
 CGAAGTGATTAAACAGTCAGCAGGCTCCGATCCGGTGTGCGGTGATGTACGATGCGATTCAA
 GCGGCGAAATCGCGCAACGTTGACATTTTGTGTGTGATACAGCTGGTTCGCTTGCAAATA
 AAGTGAACCTTAATGAAAGAGCTTGAAAAAGTAAAACGCGTCATTGAACGAGAAGTACCAGG
 TGCACCGCATGAAGTGTGCTCGTGTAGATGCAACGACGGGACAAAATGCGATGAGCCAA
 GCGAAGACGTTTAAAGAAGCGACGAATGTGACCGGCATCGTGTAAACAAAGCTTGACGGAA
 CAGCAAAAGGGGCATCGTGTAGCGATCCGCCACGAGCTAAACATCCCGGTGAAAT

***Anoxybacillus contaminans* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

XXXXXCRKXRGLXXTRDSFAGKVNDLIARYRKVDEEFFEELIILIASD
 VGVATVMDFIDELKMEVKRRNIQDPKEMYSVISEKLIDIYQASGDETTE
 LNIQPNGLTIVILFVGVNGVGKTTTIGKLAYKLNKNEGKKVMLAAGDTR
 AGAIEQLEVWGERVGVVEVIKQSAGSDPAAVMYDAIQAAKSRNVDILLC
 DTAGRLQNKVNLNLMKELEKVKRVIEREVPGAPHEVLLVLDATTGQNAM
 SQA KTFKEATNVTGIVLTKLDGTAKGGIVLAIRHELNIPVK

Ek 12. *Anoxybacillus pushchinoensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

GGCCCGNNCAGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGGAATTCGATTATGAGCTTTTTTAAA
 AAGTTGAAAGAAAAAATCGCNAACAAGCAGATACAGTAACGGAAAAGTTAAGCGAGGTT
 TAGAAAAAACCGGTGATTCGTTTCGCGGGAAAAGTGAACGATTTAATCGCCCGCTATCGCAA
 AGTGGACGAAGAGTTTTTTGAAGAAGCTAGAAGAAATTTAATCGCATCTGACGTCGGGGTT
 GCTACTGTGATGGAATTCATTGACGAGCTGAAAATGGAAGTNAAGCGTCGCCACATTCAAG
 ACCCGAAAGACATGTATAGCGTCATTTCCGAAAAACTCATCGATATATACCAAGCGGGCGG
 CGATGAAAAAATAGAACTAAATATCCANCCNAGCGGCTTAACGGTCATTTTATTTGTCGGT
 GTNAACGGCGTCGGAAAAACGACGACGATCGGAAAGCTTGCACAAAATTAANGAACGAAG
 GGAAAACAGTCATGTTGGCAGCTGGCGACACGTTCCGGGCAGGTGCAATTGAACAGCTTGA
 AGTATGGGGCGAGCGAGTCGGCGTGGAAGTCATTANACAGTCTGCTGGCTCNGATCCAGCG
 GCGGTGATGNACGATGCGATNCAAGCGGCTAAATCGCGCAACGTCGACGTTTTATTATGCG
 ACACANCCGGCCGTTTACAAAANANAGTTNACTTAATGAANGAGCTTGANAAAGTGAGACG
 CGTCATTGAACGTGAAGTGCCGGGTGCACCGCATGAAGTATTGCTCGTATTGNATGCAACG
 ACATTGNCCATAATGCNATGANCCAAGNCGNANNCGTTTNAAGGNAGCGACCAAACGTGA
 CGGGCATTGTACTGACGAAACTGGACGGCACGGCTAAAGGTGGTATCGTATTGGCGATTTCG
 CCACGAGTTAAACATTCGGGTGAAGTTTGTGCGTTTTAGGGGAAAAAGTGGACGATCTAGAG
 CCATTTAACGCAGAACAAATTCGTCTACGGCTCTTTTAAAAAATCACTAGTGAATTCGCGG
 CCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCACGCGTGANCN

***Anoxybacillus pushchinoensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

AXXAPAAMAAAGNSIMSFKKLKEKIXKQADTVTEKFKRGGLEKTRDSF
 AGKVNDLIARYRKVDEEFFEELIIASDVGVATVMEFIDELKMEXKR
 RHIQDPKDMYSVISEKLIDIYQAGGDEKIELNIXXSGLTVILFVGXNGV
 GKTTTIGKLAHKLXNEGKTVMMLAAGDTFRAGAIEQLEWGERVGVVEVI
 XQSAGXDPAAVMXDAXQAAKSRNVDVLLCDTXGRLQXXVXLMXELX
 KVRRVIEREVPGAPHEVLLVLXATTLXIMXXXKXXXFXRXPNTGIVL
 TKLDGTAKGGIVLAIRHELNIPIVKFVGLGEKVDDLEPFNAEQFVYGLFK
 ITSEFAAACRSTIWESSHAX

Ek 13. *Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

NNGGCNCTNTTNCNATGTCGGAAANTTTAGCGCGGCTTANAAAANACGCGCGACTCTTTTG
 CAGGAAAAGTGAATGACTTAATTGCCCGCTATCGAAAAGTGGATGAAGAGTTTTTTGAAGA
 ACTAGAAGAAATTTTAATTGCGTCAGACGTTGGTGTGGCAACGGTCATGGATTTTATTGAT
 GAGTTGAAAATGGAAGTGAAGCGCCGCAACATTCAAGACCCGAAAAGAAATGTATAGCGTCA
 TTTCCGAAAAACTCATCGATATATATCAAGCGAGCGGCGATGAAACGACAGAATTAACAT
 TCAGCCAAACGGTTTAACGGTCATTTTATTTGTCGGTGTCAACGGTGTGCGAAAAACGACG
 ACGATCGGAAAGCTCGCGTATAAATTAACAAAACGAAGGAAAAAAGTGTATGCTTGCGGCAG
 GCGATACGTTCCGTGCTGGGGCGATTGAACAGTTAGAAGTATGGGGAGAGCGAGTAGGCGT
 CGAAGTGATTAAACAGTCAGCAGGCTCCGATCCGGCTGCGGTGATGTACGATGCGATTCAA
 GCGGCGAAATCGCGCAACGTTGACATTTTGTGTGTGATACAGCTGGTCGCTTGCAAATA
 AAGTGAACCTAATGAAAGAGCTTGAAAAAGTAAAACGCGTCATTGAACGAGAAGTACCAGG
 TGCACCGCATGAAGTGTGCTCGTGTAGATGCAACGACGGGACAAAATGCGATGAGCCAA
 GCGAAGACGTTTAAAGAAGCGACGAATGTGACCGGCATCGTGTAAACAAAGCTTGACGGAA
 CAGCAAAAGGGGCATCGTGTAGCGATCCGCCACGAGCTAAACATCCCGGTGAAAT

***Anoxybacillus kamchatkensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

XXXXXCRKXRGLXXTRDSFAGKVNDLIARYRKVD EEFEELEEILIASD
 VGVATVMDFIDELKMEVKRRNIQDPKEMYSVISEKLIDIYQASGDETTE
 LNIQPNGLTVILFVGVNGVGKTTTIGKLA YKLKNEGKKVMLAAGDTFR
 AGAIEQLEVWGERVGV EVIKQSAGSDPAAVMYDAIQAAKSRNVDILLC
 DTAGRLQNKVNL MKELEKVKRVIEREVPGAPHEVLLVLDATTGQNAM
 SQA KTFKEATNVTGIVLTKLDGTAKGGIVLAIRHELNIPVK

Ek 14. *Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

GNNNCCNGCTCNGCGCCGGNGGCGCGGGAATTCGATTGTGAGCTTCTTTAAAAAGTTGAA
AGAGAAAATTACNCNGCNAACGGATGCCGTAACNGAAAAGTTTAAACCAGGGNCTTTCNAA
AACCCNCGATTCTNTTTCGCGGGGCGGGTAAATGATTTAATTGCCCGCTACCGGAAAGTCCAT
GAAGAGTTTTTTGAAGAATTGGAAGAAATTTTAATTCGCTGCCGACGTCGGTGTGACGACN
GTAATGGATTTAATTGACGAATTAAGATGGAAGTAAAGNGTCGCAACATTCAAGAGACGA
AAGAAATGCNNGCGGNTATTTTCGAGAAGTTGTTCGATATTTATAAAGCGGCGATGACAA
ACCAGCGACATTAAATATGCAAGAAAACGGCTTGACGGTCATTTTATTCGTCGGCGTCNAT
GGGTTCGGGAAAACGACGACGATCGGAAAATTAGCGCATAAGTTGAAATCGGAAGGAAAAA
CGGTGCTCTTAGCGGCTGGNGATACGTTCCGTGCTGGGGCGATTGAGCCAGCTCGAAGTAT
GGGGCGAGCGCGTTNGGTTGGAAGTGATTAAGCAGTCGGCTGGTTCTGACCCAGCAGCCCG
TTATGTATGACCGGATTCCANGCAGCGAAAGCGCGCAATGTCGATGTGTTGCTATGCGATAC
GGCTGGNCGTTTGCNAAATAAAGTAAACTTAATGAAAGAGCTNNAAAAAGTGAAACGCGTC
NTCCAACGCNAAATCCCAGGAGCGCCCCNTGAAGTGCTGCTTGTGGCTTGATGCNACCA
NCTGNACCAAACGCCAATGNAGCCCCAGGCCAAAATTTTTAAAGGAACCCGNCGAACGTA
ACCGGCATCGTGCTCACGAAGCTTGATGGAACGGCGAAGGGTGGCATCGTTCTTGCGATTC
GCAACGAGTTGAACATTCCAGTCAAATTCGTCGGCCTCGGCGAAAAAATGGACGACTTGCA
AGCCTTCGATCCGGAGCAATACGTCTACGGCCTCTTTTCCAAAATCACTAGTGAATTCGCG
GCCGCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGCGTGAGCN

***Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

XXXLXAXGAGIRLASLKS KRKLXXXRMPXKSLNQXLXKTDXDFAGRV
NDLIARYRKVHEEFFELEEILIRCRRCDDXNGFNRIKDGSKXSQHSR
DERNXGYFREGCRYLRRRQTS DIKYARKRLDGHFIRRRXWGRENDD
DRKISAVEIGRKN GALS GWXYVPCWGDASSKYGASAXGWKLSSRLVL
TQQPVMYDAIXAAKARNVDVLLCDTAXRLXNKVNL MKEXXKV KRVX
QRXIPGSAPXKCLWLDXTXXTKRQXSPRPKFFKGTXRTPASCSRSLM
ERRRVASFLRFATSTFQSNSSASAKKWTTCKPSIRSNTSTASFPSLVNS
RPPAGRPHYGRAPNRVSX

Ek 15. *Anoxybacillus gonensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

AAAATTGCAAAACAAGCGGATACAGTAACGGAAAAGTTTAAGCGCGGCTTAGAAAAAACGC
 GCGACTCTTTTGCGGGAAAAGTGAATGACTTAATCGCCCGCTATCGAAAAGTGGACGAAGA
 GTTTTTTGAAGAAGTAGAAGAAATTTTAATTGCGTCAGACGTTGGAGTAGCCACGGTTATG
 GATTTTATTGATGAGTTGAAAATGGAAGTGAAGCGCCGCAACATTCAAGACCCGAAAGAAA
 TGTATAGCGTCATTTCTGAAAACTCATTGATATATATCAAGCGAGCGGCGATGAAACGAC
 AGAACTAAACATTCAGCCAAACGGCTTAACGGTTATTTTATTTGTCGGTGTCAACGGCGTC
 GGAAAAACGACGACGATCGGAAAACCTCGCGTATAAATTAAAAAACGAAGGAAAAAAAGTGA
 TGCTTGCCGCAGGCGATACGTTCCGCGCGGGGGCGATTGAACAGTTAGAAGTATGGGGAGA
 GCGAGTAGGTGTGCAAGTGATTAAACAGTCAGCAGGCTCCGATCCGGCTGCGGTGATGTAT
 GATGCGATTCAAGCGGCGAAAATCGCGCAACGTCGATATTTTGCTGTGCGATAACAGCTGGTC
 GCTTGCAAAATAAAGTGAATTTAATGAAAGAGCTTGAAAAAGTGAACGCGTCATTGAACG
 AGAAGTACCTGGTGCACCGCATGAAGTGTGCTCGTGTAGATGCAACGACGGGACAAAAT
 GCGATGAGCCAAGCGAAAACGTTTAAAGAAGCAACGAATGTGACCGGTATCGTGTTAACGA
 AGCTTGACGGAACAGCAAAGGGGGCATCGTGTTAGCAATTCGCCACGAGCTAAACATCCC
 GGTGAAATTTGTCGGCTTAGGAGAGAAAATGGACGATTTAGAGCCGTTTAAACGCAGAACAA
 TTCGTCTACGGCTTCTTTCCCAA

***Anoxybacillus gonensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

KIAKQADTVTEKFKRGGLEKTRDSFAGKVNDLIARYRKVDEEFFEELIEI
 LIASDVG VATVMDFIDELKMEVKRRNIQDPKEMYSVISEKLDIYQASG
 DETTELNIQPNGLTVILFVGVNGVGKTTTIGKLAYKLNKNEGKKVMLAA
 GDTFRAGAIEQLEWGERVGVVEVIKQSAGSDPAAVMYDAIQAAKSRN
 VDILLCDTAGRLQNKVNLMKELEKVKRVIEREVP GAPHEVLLVLDATT
 GQNAMSQA KTFKEATNVTGIVLTKLDGTAKGGIVLAIRHELNIPVKFV
 GLGEKMDDLEPFNAEQFVYGFPPK

Ek 16. *Anoxybacillus ayderensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

CNNTNCAGCTCCGGCCGCCNGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGTGAGCTTTTTTAAAAAATT
 GAAAGAAAAAATTGCAAAACAAGCGGATACAGTGACGGAAAAGTTTAAGCGCGGCTTAGAA
 AAAACGCGCGACTCTTTTGCAGGAAAAGTGAATGACTTAATTGCCCGCTATCGAAAAGTGG
 ACGAAGAGTTTTTTGAAGAAGTAGAAGAAATTTTAATTGCGTCAGACGTTGGTGTGGCAAC
 GGTTCATGGATTTTTATTGATGAGTTGAAAAGGAAGTGAAGCGCCGCAACATTCAAGACCCGA
 AAGAAATGTATAGCGTCATTTCCGAAAACTCATCGATATATATCAAGCGAGCGGCGATGA
 AACGACAGAATTAACATTCAACCAAACGGTTTAACGGTCATTTTTATTTGTCGGTGTCAAC
 GGTGTGCGAAAAACGACGACGATCGGAAAGCTCGCGTATAAATTAAAAAACGAAGGAAAA
 AAGTGATGCTTGCGGCAGGCGATACGTTCCGTGCTGGGGCGATTGAACAGTTAGAAGTATG
 GGGAGAGCGAGTAGGCGTCGAAAGTGAATAAACAGTCAGCAGGCTCCGATCCGGCTGCGGTG
 ATGTACGATGCGATTCAAGCGGCGAAATCGCGCAACGTCGATATTTTTGCTGTGCGATACAG
 CTGGTGCCTTGCAAAATAAAGTAAACTTAATGAAAGAGCTTGAAAAAGTGAACGCGTCAT
 TGAACGAGAAGTACCAGGTGCACCGCATGAAGTGTTGCTCGTGTAGATGCAACGACGGGA
 CAAAATGCGATGAGCCAAGCGAAGACGTTTAAAGAAGCGACGAATGTGACCGGCATCGTGT
 TAACAAAGCTTGACGGAACAGCAAAAGGTGGCATCGTGTAGCGATCCGCCACGAGCTAAA
 CATCCCGGTGAAATTTGTCGGGTTAGGTGAGAAAATGGACGATTTAGAGCCGTTTCAAGCA
 GAACAATTCGTCTACGGCCTATTTCCCAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGT
 CGACCATATGGGAGAGCTCCCACCGCGTGAT

***Anoxybacillus ayderensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

XXSSGRXAAAGIRLAF LKNKKKLQNKRIQRKSLSA AKKRATLLQEKMT
 LPAIEKWTKSFLKNKKFLRQTLVWQRSWILLMSKGSEAPQHSPERNV
 RHFRKTHRYISSERRNDRIKHSTKRFNGHFICRCQRCRKNDDDRKARVI
 KKRRKKS D ACGRRYVPCWGD TVRSMGRASRRRSDTVSRLRS GCGDVR
 CDSSGEIAQRRYFAVRYSWSLAKSKLNERAKSETRHTRSTRCTASVAR
 VRCNDGTKCDEPSEDVRSDECDRHRVNKARN SKRWHRVSDPPRAKHP
 GEICRVRENGRFRAVSSRTIRLRPISQNHIRGRLQVDHMGELPPRD

Ek 17. *Anoxybacillus kestanbolensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

ANTAGCCACNNTTCAGTCTCGGCAATTTAAGAAGGCCTGGCGAAAACGAGAAATACGTTTC
 AGGAGCGGGTCAATGAGCTTGTCTCCCGCTACCGGAAAGTGGACGAGGATTTTTTTGAAGA
 GCTTGAAGAGGTTCTGATCGGCGCTGATGTCGGCGTTGCGACTGTTATGGAGCTGATTGAC
 GAGCTGAAGAGCGAGGTCAAGCGAAGAAATATTAGGACCCGAAAGAGGTGCAGTCCGTCA
 TTTCTGAAAAGCTCGTTGAAATCTATGAAGCGGGGAGCAGGAAGCATCAGAGCTCCGCGT
 CGAAGACGGCCGCCTAAACATCATTTTTATTCGTCGGCGTCAACGGCGTCGGCAAAACGACG
 ACGATCGGCAAGCTTGCCCATCAATTCATTAAAGAAGGCAAAAATGTCGTTCTTGCTGCCG
 GAGATACATTAGGGCCGGCGGATCGACCAGCTTGAAGTGTGGGGAGAGCGCGTCGGCGC
 GCATGTCGTCAAACAGGCGGAAGGCTCGGATCCTGCGGCTGTTATCTATGACGCCGTTCAA
 GCCGCGAAAGCGCGCGGCGCCGATGTCTGCTTTGCGACACGGCAGGACGCCTGCAAATA
 AAGTGAACCTAATGAAAGAGCTAGAAAAGGTAAAGCGCGTGATTAGCGCGAAGTGCCTGA
 TGCGCCCTCATGAAGTGCTGCTCGTACTGGATGCGACGACAGGGCAGAACGCAATGACACAG
 GCGCGCAATTTTTCAAAGCGACTGATGTCTCAGGCATCGTGCTGACGAAGCTCGACGGAA
 CGGCAAAAGGCGGCATCGTCCTCGCCATCCGCCATGAGCTGCAGATTCCGGTCAAGT

***Anoxybacillus kestanbolensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

XSHXSVS AIEGLAKTRNTFQERVNELVSRYRKVDEDFEEL
 EEVLIGADVGVATVMELIDELKSEVKRRNIQDPKEVQSVIS
 EKLVEIYEGGEQEASELRVEDGRLNIILFVGVNGVGKTTTI
 GKLAHQFIKEGKNVLAAGDTFRAG AIDQLE VWGERVGA
 HVVKQAEGSDPAAVIYDAVQA AKARGADVLLCDTAGRLQ
 NKVNLMKELEKVKRVIQREVPDAPHEVLLVLDATTGQNA
 MTQAREFSKATDVSGIVLTKLDGTA KGGIVLAIRHELQIPV
 K

Ek 18. *Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

AAAATCGCAAAACAAGCGGATACAGTAACGGAAAAGTTTAAACGTGGTTTTAGAAAAACGC
 GCGACTCTTTCGCTGGAAAAGTGAACGATTTAATCGCGCGCTATCGGAAAGTAGATGAAGA
 GTTTTTTGAAGAGCTAGAAGAAATTTTAAATCGCCTCAGACGTTGGTGTTGCAACAGTCATG
 GATTTTATCGATGAGTTAAAAATGGAAGTAAAACGTCGCAACATTCAAGACCCGAAAGAAA
 TGTATAGCGTCATTTCCGAAAAATTGATTGACATTTACGAAGCAAGCGGTGAGGAGAAAAC
 AGAATTAAACATTCAGCCAAACGGCTTAACGGTCATTTTATTTGTCGGTGTCAACGGCGTT
 GGAAAAACGACGACGATCGGGAAACTCGCGTACAAATTA AAAAGCGAAGGAAAAAAGTGA
 TGCTTGCCGCTGGCGATACGTTCCGTGCGGGCGCGATTGAACAACCTGAAGTATGGGGCGA
 GCGCGTTGGTGTGGAAGTCATTAAACAGTCTGCTGGCTCTGATCCAACGGCGGTGATGTAC
 GATGCGATTCAAGCAGCAAAATCGCGCAACGTTGACATTTTGTGTGTGATACAGCTGGCC
 GCTTACAAAATAAAGTGAATTTAATGAAAGAGTTAGAAAAAGTTAAGCGTGTTATTGAACG
 TGAAGTGCCGGGGGCACCGCATGAAGTGTTGCTTGTGCTAGATGCAACGACAGGGCAAAAT
 GCGATGAGCCAAGCAAAAACATTTAAAGAAGCAACAACGTCACCGGCATTGTGCTTACGA
 AACTGGATGGAACAGCAAAAGGTGGCATCGTATTAGCGATCCGCCACGAGTTAAACATTCC
 GGTGAAATTTGTCGGTTTAGGAGAGAAAATGGACGATTTAGAGCCGTTTAAACGCCGAACAA
 TTCGT

***Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

KIAKQADTVTEKFKRGGLEKTRDSFAGKVNDLIARYRKVDE
 EFFEELEEILIASDVG VATVMDFIDELKMEVKRRNIQDPKE
 MYSVISEKLIDIYEASGEEKTELNIQPNGLT VILFVGVNGV
 GKTTTIGKLAYK LKSEGKKVMLAAGDTFRAGAIEQLEW
 GERVGVEVIKQSAGSDPTAVMYDAIQAAKSRNVDILLCDT
 AGR LQNKVNLMKELEKVKRVIEREVP GAPHEVLLVLDATT
 GQNAMSQAKTFKEATNVTGIVLTKLDGTAKGGIVLAIRHE
 LNIPVKFVGLGEKMDDLEPFNAEQF

Ek 19. *Anoxybacillus vainovskiensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Baz Sırası

AAAATTTCAAAGCAGAAGGACTCAGTAACGGCAAAATTTAAAGAAGGGCTTGAAAAACGA
 GAAGCTCTTTTACAGAAAGCTTAAATGAACTTGTTTTCGCGCTATCGAAAGGTTGATGAAGA
 ATTTTTTCGAGGAATTAGAGGAAATTTTGATTACTGCCGACGTCGGCGTTCAAACGGTCAT
 GGACTTGATCGATGAATTGAAAATGGAAGTAAAAGGCGAAACATTCAAGAACCGAAGGAA
 GTGCGCGCTGCCATTTCCGAAAAGCTTGTTGAAATTTATCAAGGAGAAGACGGCGCTCCTA
 CCGATTTAAACATTGAAGACGGCCGGTTAAACATCGTATTGTTTGTGGCGTCAATGGTGT
 TGGAAAAACGACGACGATCGGAAAGCTTGACATCGATTAAAAGAAGAAGGAAAATCTGTC
 CTTCTTGCTGCCGGCGACACGTTCCGAGCAGGCGCCATCGAACAGCTGGAAGTTTGGGGGG
 ATCGGGTTGGCGTAGATGTGATTAACAATCGGCAGGCTCTGATCCTGCTGCCGTCGTGTA
 TGACGCCATTCAGGCCGCTCGCTCTCGAAAAGTAGACGTCTTATTATGTGATACTGCTGGA
 CGGCTTCAAATAAGATGAATTTAATGAAAGAGCTTGAGAAAGTAAAGCGGGTTATCGAAC
 GGGAAATTCAGGTGCTCCGCATGAAGTGCTGCTTGTCTTGATGCGACAACAGGACAAAA
 TGCAATGAGCCAGGCAAGACAGTTTTTCGGAGGCGACAAATGTCACTGGAATTGCCTTGACA
 AAATTGGATGGCACTGCGAAGGGAGGAATTGTTCTAGCCATTCGAAATGAGCTGAACATTC
 CTGTAAACTGGTGGGGCTTGCGAAAAAATGGACGATCTTGAGAAATTTGATGCAGAGAA
 ATATGTATACGGCCTCTTTACCGAA

***Anoxybacillus vainovskiensis* Bakterisinin *ftsY* Geninin Protein Sırası**

KISKQKDSVTAKFKEGLEKTRSSFTESLNELVSRYRKVDEEFFELEEIL
 ITADVGVQNGHGLDRIENGSEKAKHSRTEGSARCHFRKACNLSRRRRR
 SYRFKHRRPVKHRIVCWRQWCWKNDDDRKACTSIKRRRKICPSCRRH
 VPSRRHRTAGSLGGSGWRRCDTIGRLSCRRVRHSGRSLSKSRRLIMY
 CWTASKDEFNERAESKAGYRTGNSRCSASAACPNDNRKCNPEPKTVF
 GGDKCHWNCLDKIGWHCEGRNCSSHSKAEHSCKTGGAWRKNRSEIC
 REICIRPLYR

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Gümüşhane'de, Gazi Paşa İlk Öğretim Okulunda, Orta ve Lise öğrenimini Gümüşhane Ali Fuat Kadirbeyođlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 1999-2000 öğretim yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğremine başladı. 2003 yılında bu bölümden biyolog unvanı ile mezun oldu. 2004 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.