

139245

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GÖNEN, KESTANBOL VE DİYADİN KAPLICALARINDAN TERMOFİLİK  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
KARAKTERİZASYONU VE TANIMLANMASI

Biyolog Sabriye ÇANAKÇI (DÜLGER)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

“Doktor”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.01.2003

Tezin Savunma Tarihi : 25.02.2003

Tezin Danışmanı : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

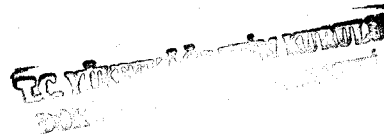
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2003



## ÖNSÖZ

"Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Teşhisi ve Isıya Dayanıklı Bazı Enzimlerin Araştırılması" adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca tezin geliştirilmesinde ve planlanmasında yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a ve sayın hocam Doç. Dr. Saadettin GÜNER'e minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatı ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ediyorum.

Sabriye ÇANAKÇI (DÜLGER)

Trabzon, Ocak 2003

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
TABLO LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Termofilik Mikroorganizmaların Yaygınlığı.....	2
1.3. Çalışma Alanları Hakkında Genel Bilgiler.....	4
1.4. Termofilik Mikroorganizmaların Habitatları.....	6
1.5. Termofilliğin Moleküler Temelleri.....	7
1.6. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Bazı Yöntemler.....	9
1.6.1. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Bazı Morfolojik, Boyama, Fizyolojik ve Biyokimyasal Yöntemler.....	10
1.6.2. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Bazı Genetiksel Yöntemler.....	11
1.6.2.1. DNA Baz Kompozisyonu.....	11
1.6.2.2. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması.....	12
1.6.2.3. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması.....	12
1.6.2.4. Genomik DNA Parmak İzlerinin Bakteri Sistematiğinde Kullanılması.....	13
1.6.2.4.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi.....	13
1.6.2.4.2. PCR'a Dayalı Yöntemlerle Genomik DNA Parmak İzlerinin Çıkarılması.....	13
1.6.2.5. DNA-DNA Hibridizasyonu.....	14
1.6.3. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Bazı Kemotaksonomik Yöntemler.....	15
1.6.3.1. Lipid ve Yağ Asiti Kompozisyonu.....	16
1.6.3.2. Çözünebilir Protein Profili.....	16

1.7. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	17
1.8. Termofilik Bakterilerin Sahip Olduğu Bazı Isıya Dirençli Enzimler.....	19
1.8.1. DNA Polimerazlar.....	19
1.8.2. Ksiloz (Glukoz) İzomerazlar.....	21
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. Kaphıcılardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu.....	24
2.2.2. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
2.2.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
2.2.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.2.4.1. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu.....	26
2.2.4.2. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması.....	26
2.2.4.3. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması.....	27
2.2.4.4. Genomik DNA'nın Parmak İzlerinin Çıkarılması.....	27
2.2.4.4.1. RAPD PCR Analizi.....	27
2.2.4.4.2. ITS PCR Analizi.....	28
2.2.4.4.3. Rep-PCR Analizi.....	28
2.2.4.5. DNA-DNA Hibridizasyonu.....	29
2.2.5. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	29
2.2.5.1. İzolatların Çözünabilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması.....	29
2.2.5.1.1. Çözünabilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu.....	29
2.2.5.1.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	29
2.2.5.2. İzolatların Yağ asidi İçeriklerinin Ortaya Çıkarılması.....	30
2.2.6. Isıya Dayanıklı Enzimlerin Araştırılması.....	31
2.2.6.1. TK4 İzolatının Sahip olduğu Termofilik DNA Polimeraz Enzim Geninin Kısmi Klonlanması.....	31
2.2.6.2. TK4 DNA Polimeraz Geninin Southern Blotting Yöntemiyle Elde Edilmesi.....	33
2.2.6.3. Ksiloz (Glukoz) İzomeraz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
3. BULGULAR.....	36

3.1. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	36
3.2. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri.....	39
3.2.1. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri.....	39
3.2.2. İzolatların Bazı Genomik DNA Parmak İzleri.....	40
3.2.2.1. RAPD PCR Analizi.....	41
3.2.2.2. ITS PCR Analizi.....	42
3.2.2.3. Rep-PCR Analizi.....	42
3.2.3. DNA-DNA Hibridizasyonu.....	43
3.3. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özellikleri.....	45
3.3.1. İzolatların Çözünebilir Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	45
3.3.2. İzolatların Yağ Asidi İçerikleri.....	46
3.4. İzolatların Sahip Olduğu Bazı Isıya Dayanıklı Enzimlerin Araştırılması.....	49
3.4.1. TK4 İzolatının Sahip Olduğu Termofilik DNA Polimeraz Geninin Klonlanması....	49
3.4.2. İnvers PCR ile TK4 DNA Polimeraz Geninin Diğer Kısımlarının Elde Edilmesi....	50
3.4.3. TK4 DNA Polimeraz Geninin Southern Blotting Yöntemiyle Elde Edilmesi.....	52
3.4.4. G2 İzolatının Sahip Olduğu (Ksiloz) Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Araştırılması.....	53
4. İRDELEME.....	54
5. SONUÇLAR.....	66
6. ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR.....	68
8. EKLER.....	77
Ek 1. A1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	77
Ek 2. A2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	78
Ek 3. A3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	79
Ek 4. A4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	80
Ek 5. A7 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	81
Ek 6. A8 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	82
Ek 7. K1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	83
Ek 8. K2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	84
Ek 9. K3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	85
Ek 10. K4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	86
Ek 11. K5 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	87

Ek 12. TK4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	88
Ek 13. G1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	89
Ek 14. G2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	91



## ÖZET

Yeni termofilik bakteri türleri bulmak ve biyoteknolojik potansiyellerini araştırmak amacıyla, Diyadin (Ağrı), Gönen (Balıkesir) ve Kestanbol (Çanakkale) kaplıcalarından termofilik bakteri izolasyonları gerçekleştirildi.

Bu amaçla her üç kaplıcadan alınan su örneklerinden elde edilen koloniler, morfolojilerine göre ayrılarak, Diyadin Kaplıcasından dokuz, Gönen Kaplıcasından iki ve Kestanbol Kaplıcasından altı olmak üzere toplam onyedii izolat diğer testlere tabii tutulmak üzere seçildi. Seçilen izolatlar, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik, bazı genetiksel ve DNA-DNA homolojisi açısından incelendiler. Yapılan incelemeler sonucunda bu izolatlar, *Bacillus* cinsine veya bu cinsten son zamanlarda ayrılmalar sonucu oluşmuş olan yakın cinslere dahil edildiler. Gönen Kaplıcasının bir izolatının *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür ve Diyadin Kaplıcası izolatlarından altısının bu türün suşları olduğu sonucuna varılarak, bu yeni tür *Anoxybacillus gonensis* olarak adlandırıldı. Kestanbol Kaplıcası izolatlarından üçünün *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür ve bu türe ait suşlar olduğu sonucuna varılarak, bu yeni türe ise *Anoxybacillus kestanbolinensis* adı verildi. Ayrıca Diyadin Kaplıcasından diğer üç izolatın *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus pushchinoensis* ve *Bacillus thermosphericus*'a, Kestanbol Kaplıcasından diğer bir izolatın *Bacillus thermosphericus* ve birisinin *Saccharococcus caldoxylosilyticus*'a ve Gönen Kaplıcasından diğer bir izolatının ise *Bacillus thermoleovorans*'a ait suşlar olduğu sonucuna varıldı. Kestanbol Kaplıcasından elde edilen *S. caldoxylosilyticus*'un DNA polimeraz geninin kısmii gen sırası ortaya çıkarıldı. Ayrıca *A. gonensis*'in yüksek ksiloz izomeraz enzim aktivitesine sahip olduğu bulundu.

Bu çalışmada bulunan yeni termofilik tür ve suşların belirli özelliklerinden dolayı biyoteknolojik potansiyel taşıyabilecekleri sonucuna varılmış olup, Türkiye'deki diğer kaplıcalarda da benzer yeni tür ve suşların bulunabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyadin Kaplıcası, Gönen Kaplıcası, Kestanbol Kaplıcası, Termofilik Bakteri, *Anoxybacillus sp.*, *Saccharococcus sp.*, *Bacillus sp.*

## SUMMARY

### **Isolation, Characterization with Molecular Methods and Description of Thermophilic Bacteria from Gonen, Kestanbol and Diyadin Hot Springs**

For the purpose of finding new thermophilic bacteria species and studying their biotechnological potential, thermophilic bacteria isolations from Diyadin (Ağrı), Gonen (Balıkesir), Kestanbol (Canakkale) hot springs were made.

Based on colony morphology, nine different isolates from Diyadin hot spring, two from Gonen hot spring and six from Kestanbol hot spring were selected and subjected to further tests. The isolates were examined based on morphological, physiological, biochemical, some genetical, chemotaxonomical features and DNA-DNA homology. The isolates, as results of the study, were placed into the genus *Bacillus* or the genus separated from the genus *Bacillus* recently. One of the isolates belonging to *Anoxybacillus* genus from Gonen hot spring was a new species designated as *Anoxybacillus gonensis* and six of the isolates from Diyadin hot spring were the strains of it. Three isolates belonging to *Anoxybacillus* genus from Kestanbol hot spring were new species designated as *Anoxybacillus kestanbolinensis* and its strains. Moreover, the other three isolates from Diyadin hot spring were *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermosphericus* and *Anoxybacillus pushchinoensis*. Two isolates from Kestanbol hot spring belonged to *Bacillus thermosphericus*, another belonged to *Saccharococcus caldoxylosilyticus*. And another isolate from Gonen hot spring belonged to *Bacillus thermoleovarans*. We found that *A. gonensis* had high xylose isomerase activity, and also determined the partial DNA polymerase gene sequence of *S. caldoxylosilyticus* obtained from Kestanbol hot spring.

We suggest that new thermophilic species and strains described in this study may have some biotechnological potential and other hot springs of Turkey may have similar new species and strains.

**Key Words:** Diyadin Hot Spring, Gonen Hot Spring, Kestanbol Hot Spring, Thermophilic Bacterium, *Anoxybacillus* sp, *Saccharococcus* sp, *Bacillus* sp.



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

- Şekil 1. Araştırmada kullanılan termofilik bakteri izolatlarının ve standart olarak kullanılan bakterilerin OPAB-07 (5'-GTA AAC CGC C-3') primeri ile oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....41
- Şekil 2. 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den daha fazla benzer olan suşların ITS PCR analizi.....42
- Şekil 3. 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den daha fazla benzer olan suşların Rep-PCR analizi..... 43
- Şekil 4. Kaplıcalardan izole edilen izolatlardan ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041 ile *Anoxybacillus pushchinoensis*'den saflaştırılan çözünebilir toplam hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi..... 46
- Şekil 5. Dejenere Pol R1 ve Pol R2 primerleri ile TK4 izolatından ve *E. coli* Taq suşundan PCR yardımı ile elde edilen parçaların agaroz jeldeki görüntüsü..... 49
- Şekil 6. TK4 DNA polimeraz geninin TK4 Pol F1-Pol R2 primerleri ile elde edilen parçanın baz dizisi..... 50
- Şekil 7. TK4 Pol F1-Pol R2 primerleri ile ve invers PCR yöntemiyle elde edilen TK4 DNA polimeraz geninin bir bölümünün baz dizisi..... 51
- Şekil 8. TK4 bakterisinin DNA polimeraz geninin Southern Blotting ile belirlenmesi, 1. TK4 genom DNA'sının *EcoR* V pozitif bantı, 2. TK4 genom DNA'sının *EcoR* I pozitif bantı, 3. TK4 genom DNA'sının *Pst* I pozitif bantı..... 52

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

Tablo 1. Kestanbol kaplıcası (Çanakkale) suyunun özellikleri.....	5
Tablo 2. Gönen kaplıcası (Balıkesir) suyunun özellikleri.....	5
Tablo 3. Termofilik organizmaların kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar.....	19
Tablo 4. Diyadin (Ağrı), Kestanbol (Çanakkale) ve Gönen (Balıkesir) kaplıcalarından elde edilen izolatların biyokimyasal özellikleri.....	37
Tablo 5. Elde edilen termofilik izolatların 16S rRNA gen dizileriyle Gen Bankasında var olan 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 6. İzole edilen termofilik izolatlar ve <i>Anoxybacillus flavithermus</i> DSM 2641 arasında % DNA-DNA homolojisi.....	44
Tablo 7. İzole edilen bazı termofilik izolatlar arasındaki % DNA-DNA homolojisi.....	44
Tablo 8. <i>A. pushchinoensis</i> ve <i>S. caldoolyolyticus</i> ile bazı izolatlar arasındaki % DNA-DNA homolojisi.....	45
Tablo 9. Diyadin (Ağrı) kaplıcasından elde edilen izolatların yağ asidi içerikleri.....	47
Tablo10. Kestanbol (Çanakkale) ve Gönen (Balıkesir) kaplıcalarından elde edilen izolatların yağ asidi içerikleri.....	48
Tablo 11. G2 izolatının ksiloz (glukoz) izomeraz aktivitesi.....	53

## SEMBOLLER DİZİNİ

BSA	: Bovin Serum Albumin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ITS-PCR	: Internally Transcribed Spacer PCR
LFRFA	: Düşük Sıklıklı Restriksiyon Fragmenti Analizi
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rep-PCR	: Repetitive Extragenic Palindromic PCR
RFLP	: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğerlerinin büyümediği veya çok az büyüme gösterdikleri şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduklarından, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyel oluştururlar.

Dünya nüfus artışına, sanayi ve endüstri gelişimine bağlı olarak, çevre giderek kirlenmekte ve dünyadaki doğal şartlar ekstrem şartlara doğru kaymaktadır. Dolayısıyla, insanlık, son yıllarda ekstrem durumlardaki hayat şartlarının araştırılması yolunda yoğun çalışmalara girmektedir.

Termofilik bakterilerin ilk izole edilmesinden bu yana yaklaşık olarak 100 seneden fazla bir zaman geçmiştir (Miquel, 1888). O yıllardan beri çok sayıda spor oluşturabilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait termofilik bakteri türleri ortaya çıkarılmış ve özellikleri belirlenmiştir. Üzerinde en çok çalışma yapılan termofilik bakteri türü *Bacillus steorothermophilus* olup, bu türün çok sayıda farklı suşu ortaya çıkarılmış ve bu suşun birçok özelliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu bakterilerin hepsinin genellikle optimum olarak yaşayabildikleri sıcaklık aralıkları 60 °C. Bununla birlikte çalışılan çok az sayıda termofilik bakteri türünün 75 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonlu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Bu organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerde etkin olarak kullanılan aşırı şartlarda bile görev yapabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimler son zamanlarda endüstride kullanılan ve kirlenmeye neden olan bazı kimyasalların yerine kullanılabilirler. Bu endüstrilerin en göze çarpanları kağıt ve kağıt hamuru endüstrileridir. Ayrıca termofilik enzimlerin yoğun bir şekilde kullanılmaya başlandığı diğer bir endüstri ise besin endüstrisidir (Aguilar, 1996). Endüstrideki çoğu enzimatik ve mikrobiyolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda yapılması önemli faydalar sağlamaktadır. Böylece yüksek sıcaklıkta işlemin kararlı olmayan

bileşikler tarafından engellenmesi önlenmiş olur. Yüksek sıcaklığın başlıca avantajları, daha yüksek reaksiyon hızı, çoğu kimyasalın daha yüksek oranda çözünebilmesi, akıcılığın ve difüzyon hızlarının yüksek olmasıdır (Kristjansson, 1989).

Ekstremofilik organizmalar biyoteknolojik açıdan ilginç özellikleri olan enzim kaynaklarıdır. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve bunlara ait genlerbaşarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstringlikosil transferazlar, selülazlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar, depolimerazlar) ve gıda, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir (Ademsen, vd., 1995).

Ekstrem çevrelerle ilgili olarak yapılan çalışmalar biyoteknoloji açısından çok önemlidir. Bilindiği gibi termofilik türler olan *Thermus aquaticus* ve *Thermococcus litoralis* polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) kullanılan DNA polimerazın kaynağıdır. Bu organizmalardan elde edilen enzimler DNA'nın iki zinciri arasındaki hidrojen bağlarını kırabilen yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olan bir enzimdir. Bu sıcaklıkta bozulmadan kalabilen termofilik DNA polimerazlar hidrojen bağlarının kırılması ile tek zincirli forma dönüşen DNA'yı kalıp olarak kullanarak yüksek sıcaklıklarda polimerizasyon reaksiyonları yapabilmektedir. Ayrıca maksimum yaşayabilme sıcaklığı 75 °C civarında olan *Bacillus stearothermophilus* ticari amaçlı biyolojik deterjan olarak kullanılan enzimlerin elde edilmesi için kullanılmaktadır (Aguilar, 1996).

Yapılan bu çalışmanın amacı yerden çıkış sıcaklıkları 70 °C'nin üzerinde olan Çanakkale Kestanbol, Balıkesir Gönen ve Ağrı Diyadin kaplıcalarının termofilik bakteri floralarının ortaya çıkarılması, daha önce üzerlerinde hiçbir araştırma yapılmamış olan bu kaplıcalardan yeni bakteri türlerinin izole edilmesi ve izole edilen bu bakterilerin sahip olduğu ısıya dayanıklı bazı enzimlerinin araştırılıp özelliklerinin tespit edilmesidir.

## 1.2. Termofilik Mikroorganizmaların Yaygınlığı

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, bakteriler (öbakteriler), arkebakteriler ve ökaryotlardır (Woese vd., 1990).

Bakteriler; havada, toprakta, suda yaşayabilen çomak, filament, küre veya disk şeklinde olan mikroorganizmalardır. Bakterilere bakıldığında bunların 12 büyük gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu gruplar incelendiğinde bunlardan bir kısmının şu anda dünya üzerinde çok az sayıda bulunduğu ve bir kısmının ise çok sayıda tür ile temsil edilen gruplar olduğu görülmektedir. Dünya üzerinde çok az sayıda bulunan bakteri grupları şunlardır: *Aquifex / Hydrogenobacteria*, *Thermotoga* ve yeşil kükürtsüz (non-sülfür) bakterilerdir. Dünya üzerinde halen daha fazla sayıda tür ile temsil edilen bakteri grupları ise *Deinococci*, *Spirochaetes*, yeşil kükürt (sülfür) bakterileri, *Bacterioids/Flavobacteria*, *Planctomycetes*, *Cylamydia*, Gram pozitif bakteriler, *Cyanobacteria* ve mor (purple) bakterilerdir (Kristjansson, 1992).

Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların optimum olarak büyüebildikleri sıcaklıklar  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  civarındadır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında ( $20-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) büyüebilirler ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Termofiller ise  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilirler (Brock, 1985).

Dünya üzerinde yaşayan bütün bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmüştür (Madigan vd., 2000). Bu görüşün dayandığı nokta şu anda dünya üzerinde yaşayan termofilik bakterilerin mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmesidir. Bu görüşler de göz önüne alınarak termofiller temelde ikiye ayrılırlar.

**Atasal termofiller (örneğin, *Thermotoga*, *Aquifex*):** Bunların sadece termofilik ataları bulunur. Var oldukları günden bu güne kadar devamlı olarak termofilik olarak yaşamaktadırlar ve hiçbir şekilde mezofilik ortamlara adapte olamazlar.

**Sonradan termofilik olanlar (örneğin, *Bacillus* ve *Clostridium*):** Bu grup bakteriler mezofiller ile devamlı ilişki halindedir ve bu grupta bulunan mezofilik türler değişerek tekrar termofilik özellik kazanabilirler. Bu türlerde termofilik ortamlara tekrar adaptasyon söz konusu olduğundan bunlar üzerinde, termofilliğin moleküler temelleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Termofilik bakteri suşlarının optimum büyüebilme sıcaklıklarının  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üstüne kadar olan sıcaklıklara kadar değiştiği bilinmektedir. Bu şekilde çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalar aşırı termofiller veya çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadır ve bu organizmaların optimum büyüme sıcaklıkları  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindedir. Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıçalarda, tropik topraklarda,

gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde ve bazı belli başlı yerlerde bulunurlar.

45 °C'nin üstüne çıkıldığında mikrobiyal türlerin sayısı önemli bir şekilde düşer fakat bütün organizmaların yaşayabildikleri üst sıcaklık limitleri halen tam anlamıyla bilinmemektedir. Son zamanlarda birkaç tane mikroorganizmanın, sıcaklığı çok yüksek olan kaplıca sularında ve deniz diplerindeki sıcaklığı 100 °C'nin üzerinde olan alanlarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson, 1992). Denizlerin alt kısımlarında sıcak su alanlarının olduğu fakat bu alanların mikrobiyolojisi hakkında fazla bilginin olmadığı bilinmektedir. 115 °C'ye kadar yaşayabilen kültür edilmiş bakteriler bulunmaktadır. Ancak hidrotermal çevrelerde 135 °C'ye kadar yaşayabilen organizmaların olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. Bu sıcaklık sınırı hayatın olabileceği üst sıcaklık limitini göstermektedir. Çünkü bu sıcaklıkta amino asitler büyük oranda *L* formundan *D* formuna döner. 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan tür sayısı az olmasına rağmen çok sayıda filogenetik olarak farklı kategorideki prokaryotların bu sıcaklıklarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson, 1992).

### 1.3. Çalışma Alanları Hakkında Genel Bilgiler

Araştırmanın yapıldığı kaplıcalar Çanakkale Kestanbol, Balıkesir Gönen ve Ağrı Diyadin kaplıcalarıdır.

Çanakkale Kestanbol Kaplıcası Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye olan uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol kaplıcası Marmara bölgesinde bulunan çok sayıdaki kaplıcadan biridir. Yerden çıkış sıcaklığı 73 °C'dir. Kaplıca suyunun romatizma, siyatik, kireçlenme, cilt hastalıkları, böbrek rahatsızlıkları, kadın hastalıkları ve kısırlık tedavilerine iyi geldiği bilinmektedir. Kestanbol kaplıcası suyunun özellikleri Tablo 1'de verilmektedir (Erişen vd., 1996).

Tablo 1. Kestanbol kaplıcası (Çanakkale) suyunun özellikleri

Morfolojik Özellikler		Katyonlar (mg/L)		Anyonlar (mg/L)	
pH	: 6.0	Amonyum	12,00	Klorür	9700
Sıcaklık	: 73 °C	Lityum	1,29	Bikarbonat	317,00
Sertlik	: 0	Sodyum	5100	İyodür	0,4
Serbest		Potasyum	630	Bromür	4,20
Karbondioksit	: 507,0 mg/L	Kalsiyum	800	Florür	3,7
Metasilikat		Magnezyum	54,00	Sülfat	170
asidi	: 31.0 mg/L	Demir	6,25	Nitrat	0
Metaborik asid		Alüminyum	1,00	Nitrit	0
Radon	: 84.0 mg/L	Çinko	0,35	Karbonat	305,00
Silisyum oksit	: 268 mg/L	Bor	11	Hidroarsenat	0,01

Gönen kaplıcası Balıkesir iline 114 km uzaklıkta olan Gönen ilçesinde bulunmaktadır. Yerden çıkış sıcaklığı 73 °C olan bu kaplıcanın üst ve alt solunum yolu rahatsızlıkları, sindirim sistemi rahatsızlıkları, romatizma, ruhi sıkıntılara bağlı ağrı ve huzursuzluklar, sürekli mesleki gerilim, şişmanlık, şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kadın hastalıkları gibi rahatsızlıklara iyi geldiği bilinmektedir. TC. İstanbul Üniversitesi Tıbbi Ekoloji ve Hidro-Klimatoloji Araştırma ve Uygulama merkezi tarafından verilen maden suyu analiz raporuna göre Gönen Kaplıca suyunun özellikleri şöyledir (Anonim, 1994):

Tablo 2. Gönen kaplıcası (Balıkesir) suyunun özellikleri

Morfolojik Özellikler		Katyonlar (mg/L)		Anyonlar (mg/L)	
pH	: 7.26	Amonyum	0,59	Klorür	278,64
Sıcaklık	: 73 °C	Sodyum	528,77	İyodür	0,06
Sertlik	: 14 °Fr	Potasyum	29,33	Bromür	yok
Serbest		Kalsiyum	48,00	Florür	4,80
Karbondioksit	: 10,4 mg/L	Magnezyum	4,86	Sülfat	572,00
Silikat	: 75 mg/L	Demir	0,06	Nitrat	0,04
Bor	: 24 mg/L	Alüminyum	0,06	Nitrit	yok
		Mangan	yok	Hidrofosfat	0,52
		Çinko	yok	Karbonat	yok
		Bakır	yok	Bikarbonat	387,96
				Hidroarsenat	yok
				Sülfit	yok

Ağrı iline bağlı Diyadin ilçesinde bulunan Diyadin Kaplıcası Diyadin ilçesinin 5 kilometre güneyindedir. Litresinde toplam mineralizasyon 2-3 gram



civarındadır. Toprak kalevili, bikarbonatlı ve sülfatlı maden sularıdır. Karbondioksit ve hidrojen sülfür içerirler. Sıcaklıkları 60 - 70 °C arasında değişmektedir. Cilt, romatizma ve üst solunum yolları rahatsızlıklarında iyileştirici etki gösterdiği belirtilmektedir (Erişen vd., 1996).

#### 1.4. Termofilik Mikroorganizmaların Habitatları

Termofilik bakterilere bütün jeotermal alanlarda rastlanılmaktadır. Bu alanlara örnek olarak nötral pH'lı kaplıcalar, kükürtçe zengin asidik kaplıcalar ve derin deniz dipleri verilebilir (Brock, 1971).

Dünya üzerinde tabii jeotermal habitatlar yapısal olarak aktif zonlarla ilişkilidir. Bu alanlar yerin iç bölgelerinde magmatik maddeleri ihtiva eden sedimentlere sahiptir. Bunlar dünya yüzeyi ile ilişkilidir ve dünya için ısı kaynağı olarak iş görürler. Deniz suları veya yer altı suları yeryüzüne ısınarak çıkarlar ancak litotrofik basınç yüzünden kaynamazlar. Yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtiği alanlardaki bazı mineralleri çözerek mineral maddelerce zengin duruma gelirler. Bu suların çoğu hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce çok zengin oldukları bilinmektedir. Bu sulardaki klor ve bikarbonat iyonları genellikle baskın olan anyonlardır. Termal suların tam muhteviyatları, suyun yeryüzüne çıkması sırasında içinden geçtiği kayalara ve suyun sıcaklığına göre değişmektedir.

Jeotermal habitatların diğer bir tipi derin deniz diplerindeki jeotermal alanlardır. Bunların orijinleri de nötral olarak kaynayan kaplıca sularınkine benzerdir. Ancak bu alanlarda yer altı suyunun kaynağı, tatlı sudan ziyade deniz suyudur. Bu yüzden deniz dibi habitatları çeşitli minerallerce çok zengindir (Brock, 1986).

Termofilik bakteriler ilk olarak 1879 yılında Miquel tarafından keşfedildiler ve ilk olarak bulunan termofilik bakteri 72 °C'de yaşayabilen bir bakteri idi. Miquel termofilik bakterileri topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole etmişti (Miquel, 1888). Bu bilim adamından sonraki dönemlerde çok sayıdaki termofilik bakteri topraktan ve diğer kaynaklardan izole edildi. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda iyi bir şekilde bölünüp çoğalabilirken, oda sıcaklığında büyüyememektedirler. Termofilik bakteriler Sahra Çölü gibi topraklardan izole edilirken serin orman topraklarından izole edilememiştir. Herhangi bir şekilde gübrelenmeyen tarla topraklarındaki termofilik bakteri miktarı % 0,25 veya daha düşük iken bu oran

gübrelenmiş bahçe topraklarında % 1-10'a kadar çıkmaktadır. Hiç kültüre edilmemiş yani işlenmemiş topraklarda ise neredeyse hiç termofilik bakteri bulunmamaktadır.

### 1.5. Termofilliğin Moleküler Temelleri

Bütün organizmaların bünyelerindeki enzimler ve proteinler, yapılarını içerisinde yaşadıkları ortamın sıcaklığına göre adapte etmek zorundadır. Bu olay canlıların protein döngülerindeki hayat süreleri ve yüksek sıcaklık yüzünden meydana gelebilecek olan bozulmaları göz önüne alarak biyolojik aktivitesinin de çok yüksek seviyede olmasını belirler. Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır.

Bu organizmalar nasıl olupta yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmektedir? Canlılığın devam ettirilebildiği üst sıcaklık limiti nedir? Bu soruların cevapları halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak içinde yaşanılan ortam sıcaklığı arttıkça canlıda olması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanabilir:

**1) Membran akıcılığının ve bütünlüğünün korunması:** Ortam sıcaklığı yükseldikçe membranda bulunan lipoproteinlerin akıcılığı da artar. Akıcılığın dengelenmesi gereklidir. Termofillere bakıldığında membran lipidlerinin erime noktasının mezofillere göre daha yüksek olduğu gözlenir. Böylece membran lipidlerinin akıcılığı optimum büyüme sıcaklığına eşitlenir. Ayrıca bazı organizmalar membran lipidlerinin karışımını da ortam sıcaklığına göre değiştirir (Kristjansson, 1992).

**2) DNA yapısı:** Normalde DNA'nın iki zinciri 65 °C'de birbirinden ayrılır. G-C içeriğinin artması, erime noktasını bir şekilde yükseltmesine rağmen, organizmanın büyüme sıcaklığı ile DNA'nın G+C içeriği arasında tam bir ilişki bulunmamaktadır. DNA'nın denatürasyona karşı sitoplazmanın iyonik gücü ve düşük su aktivitesi ile korunduğu düşünülmektedir. DNA'nın ısıya karşı kararlılığı ve bazlar arasındaki bağların korunması DNA'nın bazı ligand molekülleri ile elektrostatik etkileşimine olduğu kadar çevrede bulunan su moleküllerine karşı da hassastır. DNA'nın suda çözünmesinin boyutu, DNA'nın fosfat grupları ile kationların etkileşimini ve baz çiftleşmesinin gücünü etkiler. Polietilen glikol gibi bazı yüksüz moleküller su aktivitesi gibi özellikleri değiştirebilir ve sonuçta bu durum DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasının serbest enerjisini ve ısını değiştirir (Spink ve Chaires, 1999). Çoğu organizmanın DNA'sı negatif süper

sarmalıdır ve bu yapı onun daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Ancak arkebakteriler ve bazı potansiyel termofilik bakterilere bakıldığında onların DNA'larının pozitif süper sarmallı olduğu görülür. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler de DNA'ya kararlılık kazandırır (Kristjansson, 1992).

**3) RNA Yapısı:** Normalde sıcaklığın etkisiyle RNA'nın yumak şeklindeki yapısı da DNA'da olduğu gibi denatüre olabilir. Bununla birlikte, RNA'ların yapısı ve nükleotid sırasında meydana gelen bazı değişikliklerle yapıları kararlılık kazanır. Çoğu termofilik organizmanın RNA'larındaki G+C çiftleşmesi fazladır ve bunlarda G-U çiftleşmesi, yanlış eşleşmeler, çıkıntılar ve diğer bazı düzensizlikler görülmez. Bu gibi yapılar mezofillerin RNA'larına esneklik kazandırır. Termofillerin RNA'ları genellikle ilave dizilere sahip değildir ve kısadır. Bu şekildeki daha kısa diziler çıkıntılarının olma ihtimalini azaltır. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişimler RNA'ları kararlı hale getirebilirler. Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan çalışmada transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976). Yapılan bu çalışmada, *Thermus thermophilus*'un tRNA'sındaki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuştur.

**4) Protein Yapısı:** Mezofilik organizmalara ait proteinlerin üç boyutlu doğal yapıları yüksek sıcaklıkta önemli derecede bozulur. Son zamanlara kadar proteinlerin yüksek sıcaklığa karşı kararlı hale gelmeleri üzerinde birçok biyofiziksel çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, proteinlerin ısıya karşı dirençli hale getirilmesinde 15 farklı fizikokimyasal faktörün etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu faktörlerden bazıları, hidrojen bağları, proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlenmeler, sarmal ikiz kutup kararlılığı ve tuz köprülerinin en iyi şekilde kullanımınıdır. Bu faktörler üzerinde birçok araştırmacı tarafından araştırmalar yapılmıştır (Grupta, 1995; Russel ve Taylor, 1995; Querol vd., 1996; Veille vd., 1996; Colacino ve Crichton, 1997; Vogt ve Argos, 1997; Vogt vd., 1997; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998). Das ve Gerstein (2000) yaptıkları bir çalışmada, 4 adet termofilik arkebakteri, 1 adet termofilik ökaryot, 1 adet termofilik öbakteri ve 6 adet mezofilik öbakteri üzerinde proteinlerin termal kararlılığını araştırdılar. Yapılan bu çalışma sonucunda termofilik organizmaların hem genomik seviyede hem de  $\alpha$ -sarmal yapılarında mezofilik organizmalardan çok daha fazla yüklü alt birimlere sahip olduklarını tespit ettiler. Ayrıca Haney vd., (1999) yaptıkları bir çalışmada termofilik bir arkebakteri olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile

mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan proteinlerin sıralarını karşılaştırdılar. Yaptıkları karşılaştırma sonucunda, termofilik proteinlerin daha fazla sayıda alt birim içerdiği, alt birimlerdeki hidrofobikliğin daha fazla olduğu, daha fazla yüklü amino asitlere (özellikle Glu, Arg, ve Lys) ve daha az sayıda polar amino asitlere (Ser, Thr, Asn ve Gln) sahip olduğunu tespit ettiler. Bu araştırmacılar proteinlerin ısıya karşı dirençli hale gelebilmesi için hidrofobik etkileşimlerdeki, hidrojen, disülfür ve iyonik bağlardaki küçük değişmelerin meydana gelmesinin yeterli olduğunu önerdiler (Haney vd., 1999).

Yapılan bir çalışmada (Matsumura vd., 1984), kanamisin nükleotidiltransferaz genindeki tek bir nükleotidin değişmesinin, üretilen proteinde tek bir amino asidin değişmesine ve böylece bakterinin ısıya karşı olan dirençliliğinin 10 °C kadar artmasına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır.

**5) Enzimatik fonksiyonlar:** Enzim fonksiyonları organizmanın büyüme sıcaklığı tarafından düzenlenir. Mezofilik organizmalara ait enzimler 20-40 °C arasında en iyi şekilde çalışır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Buna karşın termofillerin enzimleri de organizmanın büyüebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denatürasyon bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunurlar (Amelunxen ve Lins, 1968; Koffler, 1957).

**6) Küçük Moleküller:** Termofillerin sahip olması gereken diğer bir özellik ise küçük moleküllerin kararlılığıdır. GTP translasyon, RNA sentezi ve diğer birçok işlem için gerekli olan bir moleküldür ve bu molekülün 100 °C'deki yarılanma ömrü birkaç saniyedir. Ayrıca ATP, UTP, NAD ve FAD gibi diğer birçok küçük molekül de ısıya karşı dirençli değildir. Termofilik bakterilerde bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan moleküller kullanılacakları zaman sentezlenir.

Şu anda mevcut termal kararlılıkla ilgili delillere bakıldığında, termofil ve mezofil kaynaklardan elde edilen enzimler arasında önemli derecede benzerlik olduğu ortaya çıkmaktadır.

## 1.6. Bakteri Sistematığında Kullanılan Bazı Yöntemler

Bakterilerin sınıflandırılması ve karakterizasyonlarının yapılması çevre, endüstri, tıbbi ve tarımsal mikrobiyoloji ile mikrobiyal ekoloji bakımından oldukça önemlidir.

Mikrobiyal sınıflandırma ve karakterizasyonda çok sayıda fenotipik ve genotipik yöntem kullanılmaktadır (Louws vd., 1996). Bu yöntemlerden herbiri kullanılarak cins, tür, alt tür, biovar ve suş seviyesinde sistematik yapılabilir.

### **1.6.1. Bakteri Sistematğinde Kullanılan Bazı Morfolojik, Boyama, Fizyolojik ve Biyokimyasal Yöntemler**

Klasik fenotipik testler çoğu mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri sistematğinde kullanılmaktadır. Bu testler alt türden türe, cinse ve familyaya kadar taksonların tanımlanmasında temel oluşturmaktadır. Genomik bilgiler filogenetik ağacın oluşturulmasında ve sistemlerin sınıflandırılmasında büyük bir rol oynamasına rağmen, genotipik ve fenotipik özelliklerin uyumlu bir şekilde belirlenmesi daha faydalı sınıflandırma sistemlerinin oluşturulması için gereklidir (Vandamme vd., 1996). Bakterilerin ortaya çıkarılan klasik fenotipik özellikleri; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri kapsamaktadır. Bireysel olarak düşünüldüğünde bu özelliklerin çoğu genetik akrabalıkların ortaya çıkarılmasında yeterli değildir, ancak bunların hepsi birlikte bir taksonun tanımlanmasını sağlayan özelliklerdir.

Bakterilerin tür tayininde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özellik, hücre şeklidir. Hücre şeklinin ortaya çıkarılması için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenerek hücre şekli ortaya çıkarılır (Benson, 1985). Bakteri sistematğinde kullanılan diğer bir özellik bakterinin hücre duvarı yapısıdır. Bu amaçla Dr. Christian Gram tarafından geliştirilen bir yöntem olan Gram boyama yöntem ile bakterinin Gram (+) veya Gram (-) hücre duvarı yapısı ortaya çıkarılır. Ayrıca bakteri sistematğinde önemli olan özelliklerden bir diğeri de bakterinin spor üretip üretmediğidir. Sporların üretilip üretilmediğinin ortaya çıkarılması için spor boyama yöntemi kullanılır.

Bakteri sistematğinde kullanılan fizyolojik özelliklerin en önemlileri bakterinin büyüme sırasında ihtiyaç duyduğu bazı fiziksel parametrelerdir. Sistematikte önemli kriterler olan fiziksel ihtiyaçlar bakterinin büyüebildiği sıcaklık aralığı, büyüebildiği optimum sıcaklık, büyüebildiği pH aralığı, optimum pH, büyümeleri sırasında oksijene ihtiyaç duyup duymadıkları gibi özelliklerdir. Bakteri sistematğinde kullanılan biyokimyasal aktiviteler ise bakterilerin sahip oldukları hücre içi ve hücre dışı enzimler yardımı ile gösterdikleri bazı özelliklerdir. Bu enzimler yardımı ile bazı büyük molekülleri parçalama özellikleri (nişasta, kazein, jelatin), bazı karbohidratları karbon kaynağı olarak

kullanımları (çeşitli şekerler ile bazı diğer karbohidratlar), bu parçalama ve kullanım sonucunda meydana gelen bazı son ürünler ile parçalama basamaklarında kullanılan bazı ara ürünlerin ortaya çıkarılması bakteri sistematigi açısından önemli olan kriterlerdendir.

### **1.6.2. Bakteri Sistematiginde Kullanılan Bazı Genetiksel Yöntemler**

Bakterilerin fenotipik benzerliklerine bakılarak yapılan sınıflandırmalar, halen daha başarıyla kullanılmasına rağmen, bu özellikler birbirine aşırı derecede benzeyen organizmaların ayrılmasında ve bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında yeterli olmayabilirler. Ortaya çıkan bu tip problemlerin çözümlenmesinde, nükleik asitlerle yapılan çalışmaların kullanılmaya başlanması ile sınıflandırma çalışmalarında, sınıflandırmanın daha kesin ve doğru olarak yapılabilmesi mümkün olabilmektedir.

Genotipik bilgilerin elde edildiği yöntemler genellikle DNA ve RNA moleküllerini konu almaktadır. Bu yöntemler son zamanlarda yapılan sistematik çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Vandamme vd., 1996). Kemotaksonomide kullanılan hücre içi diğer bileşenlerden farklı olarak bu genetik elemanların hücrenin büyüme ortamından etkilenmesi söz konusu değildir ve bu yüzden çevresel değişimlerden etkilenmeyen bu kriterler kullanılarak daha kesin sonuçlar alınabilmektedir. Bakteri sistematiginde kullanılan bazı genetiksel yöntemler şu şekilde özetlenebilir.

#### **1.6.2.1. DNA Baz Kompozisyonu**

Bilindiği gibi DNA'nın yapısında adenin, timin, guanin ve sitozin nükleotidleri bulunmaktadır. DNA'nın çift zincirli doğasından dolayı A/T ve G/C oranları genel olarak sabittir. Ancak DNA'daki (G+C) / (A+T) oranları değişmektedir. Prokaryotların sistematiginde kullanılan ilk genetiksel yöntem G+C içeriğinin belirlenmesidir (Lee vd., 1956) ve bu yöntem sayesinde fenotipik olarak benzer genotipik olarak birbirlerinden farklı suşların ayrılması mümkün olmaktadır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

Prokaryotik organizmalar arasında G+C içeriği % 20-80 arasında değişmektedir (Tamaoka, 1994). İki organizma arasındaki farklılık ne kadar fazla ise bu iki organizmanın birbirine yakınlığı da o kadar azdır. Genel olarak bakıldığında, aynı cins içindeki

bakterilerin G+C içeriklerinin birbirlerinden % 10'dan fazla farklı olmaması gerekirken, aynı türe ait suşlar arasındaki farkın ise % 5'i aşmaması gerekmektedir.

% G+C içeriği önceleri DNA'nın asitle hidroliz edilip, nükleotidlerin kağıt kromatografisi ile ayrılıp ve tek tek bazların hesaplanarak ayrılması yöntemine göre yapılırdı. Ancak son zamanlarda bu yöntemler pek kullanılmamaktadır. Bugün kullanılmakta olan yöntemler termal denatürasyon yöntemi, buoyant yoğunluk yöntemi ve HPLC kromatografisi yardımıyla yapılan yöntemlerdir (Johnson, 1986).

### **1.6.2.2. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması**

Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. Gray ve arkadaşları (1984), 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkarmış ve bazı araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rDNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla özel primerler kullanarak artırmışlardır (Relman vd., 1992). PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizimi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır. Stackebracdt ve Goebel (1994) yaptıkları hibridizasyon çalışmalarında aynı cinse ait olan türlerin arasında 16S rRNA dizisi açısından % 97'den daha az benzerlik gösteren suşların farklı türler olduğunu ortaya koymuşlardır.

### **1.6.2.3. Ekstrakromozomal Elementlerin Sınıflandırmada Kullanılması**

Ekstrakromozomal elementler bakterilere ilave özellikler kazandıran genetik birimlerdir. Bu elementler, bir bakteriden diğerine herhangi bir yolla (transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon) aktarıldığından, bunlara bağlı olarak bir sınıflandırmanın yapılması çok güvenilir olmaz. Ancak bu elementler üzerinde sınıflandırmada sıkça kullanılan bazı biyokimyasal ve fenotipik özellikleri kodlayan genler olduğundan, tür tayini yapılırken bakterinin böyle genetik elementlere sahip olup olmadığının ortaya çıkarılması çok önemlidir (Johnson, 1986).

#### **1.6.2.4. Genomik DNA Parmak İzlerinin Bakteri Sistematiğinde Kullanılması**

Genomik DNA'dan yola çıkılarak oluşturulan parmak izleri genel olarak tür içindeki çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Böylece bu testler sayesinde fenotipik verileri destekleyici sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktadır (Vandamme vd., 1996). Genomik parmak izlerinin ortaya çıkarılmasında genel olarak iki yöntem kullanılır.

##### **1.6.2.4.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi**

Bu yöntemde tüm genom restriksiyon enzimleri ile kesilerek restriksiyon fragmentleri oluşturulur. Bu teknik düşük sıklıklı restriksiyon fragmenti analizi (LFRFA) olarak adlandırılır. Kesme reaksiyonları sonucunda oluşturulan restriksiyon parçaları çok büyük olduğundan, bu DNA parçaları normal agaroz jel ile ayrılamaz ve bundan dolayı "Pulse Fields Jel Elektroforezi" (PFGE) ile ayrılmaları gerekmektedir (Tenover vd., 1995). Oluşan restriksiyon parçalarının sayısal analiz yöntemiyle karşılaştırılması sonucunda tür içindeki benzerlik grupları ortaya çıkarılmış olur. Bu teknik "Southern Blot" hibridizasyonu ile birlikte kullanılarak genomun büyüklüğü ve organizasyonu hakkında bilgi edinilebilir (Palleroni, 1993). Bu yöntemler kullanılarak genom içerisinde rRNA operonlarının sayısı ve dağılımı kolay bir şekilde ortaya çıkarılmakta ve bu bilgiler taksonomide kullanılmaktadır (Ginard vd., 1997).

##### **1.6.2.4.2. PCR'a Dayalı Yöntemlerle Genomik DNA Parmak İzlerinin Çıkarılması**

Son on yıla bakıldığında PCR reaksiyonları sonucunda oluşturulan parmak izlerinin çoğu mikroorganizmanın genetik çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasında ve tiplendirilmesinde kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan primerlere ve reaksiyon şartlarına göre organizmaların cins, tür ve suş seviyesindeki ayrımları yapılabilmektedir (Daffonchio vd., 1998).

Bazı istisnaları olmakla beraber prokaryotların çoğunun rRNA gen lokusları 16S-23S-5S olmak üzere düzenlenir ve her bir rRNA geni, genler arasındaki boş bölgeler ve bağlantı bölgeleriyle birbirinden ayrılır. Son zamanlarda geliştirilen PCR ve her bir rRNA genindeki korunmuş bölgelerin varlığının ortaya çıkarılmasıyla bu genler arasındaki



bölgelerin artırılması mümkün olmaktadır. Özellikle, 16S-23S rRNA genleri arasındaki “spacer” bölgelerin dizi çeşitliliği, tiplendirmede, RFLP’de ve bakteri türlerinin ve aynı türe ait suşların ayrılmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Yoon vd., 1997). 16S-23S rRNA genleri arasındaki “interjenik” transkribe edilen boşluk bölgelerinin uzunlukları bazı durumlarda tür içinde çeşitlilik gösterirken bazı durumlarda ise farklılık göstermeyip tür içinde sabit kalmaktadır (Daffonchio vd., 1998).

Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin çoğunun genomlarında sıraları büyük oranda korunmuş çok kopyalı tekrarlı diziler bulunmaktadır ve Rep-PCR genomik DNA parmak izlerinin primerleri bu dizilere göre tasarlanmıştır (Lupski ve Weinstock, 1992). Temel olarak bakıldığında üç türtekrarlı dizi belirlenmiştir. Bunlar; 35-40 bp uzunluğundaki tekrarlı “ekstrajenik palindromik” (REP) dizileri, 124-127 bp’lik enterobakteriyal tekrarlı “interjenik” korunmuş (ERIC) dizileri, ve 154 bp’lik BOX elementleridir (Versalovic vd., 1994). Bu diziler, genomda farklı bölgelerde ve her iki oryantasyonda da bulunurlar ve bunların PCR reaksiyonları ile belirlenebilmesi için REP ve ERIC elementleri için birbirlerine ters yönde iki, BOX elementleri için tek bir primer tasarlanmıştır (Versalovic vd., 1994). Bu primerler kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen profillerin karşılaştırılması ile aynı türe ait olan suşlar arasındaki farklılık ortaya çıkarılmaktadır.

1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından bulunan RAPD tekniği (Williams vd., 1990), genomda rastgele bölgelerin PCR tekniği ile çoğaltımına dayanır. Bu yöntemde standart PCR reaksiyonunun aksine, rastgele seçilen tek bir primer kullanılır. Böylece karşılaştırılan bireyler arasındaki polimorfizm tespit edilmiş olur. Bu, tür içindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanımı kolay, maliyeti düşük ve doğruluğu yüksek bir yöntemdir. Bu teknik sayesinde aynı türe ait olan bireyler arasındaki genomik varyasyonlar ortaya çıkarılmaktadır. RAPD PCR yöntemi bakteri sistematğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Daffonchio vd., 1998).

#### **1.6.2.5. DNA-DNA hibridizasyonu**

Nükleik asit dizileri arasındaki benzerliğin ortaya çıkarılması prokaryotların sistematğinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Böylece genomlar arasındaki benzerlikler gerçekçi bir şekilde ortaya çıkarılmaktadır. Nükleik asit sıralarının ortaya

çıkarılması esasına dayanan karşılaştırma çalışmalarında daha çok *in vitro* nükleik asit hibridizasyonunu esas alan çalışmalar yapılmaktadır (Stackebrandt ve Goodfellow, 1991).

Yeni bakteri türlerinin ortaya çıkarılmasında en çok kabul edilen parametre genomlar arasındaki DNA benzerliğidir.  $\Delta T_m$  (DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı) değerindeki benzerliğin oranı olarak ifade edilen bu değer mikroorganizmalar arasındaki uzaklığı göstermektedir. Bu değerler primer yapı seviyesinde genomik dizi benzerliğinin dolaylı bir yansımasıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Bu yüzden de DNA'nın ayrılıp yeniden birleşmesini konu edinen yaklaşımlar birbirleriyle çok yakın olan prokaryotların akrabalığının gösterilmesinde çok kullanışlı yöntemlerdir (Wayne vd., 1987). Yapılan birçok çalışmada, DNA benzerliği ile kemotaksonomik, genomik, serolojik ve fenotipik benzerlikler arasında ilişki olduğu bulunmuştur ve bundan dolayı, DNA'nın iki zincirinin yeniden birleşmesi türlerin ayrılmasında standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Yapılan birçok çalışma sonucunda tam olarak tanımlanmış birçok türün suşları arasında optimum hibridizasyon şartları uygulandığında % 70'den fazla bir benzerliğin olduğu görülmektedir (Schleifer ve Stackebrandt, 1983). Yapılan bütün bu çalışmalar bakteriyal sistematik komitesinin tür tanımında DNA-DNA bağlanma derecesine verdiği öneme ışık tutmaktadır. Bu komitenin kararı, bir bakteri türünün suşları arasındaki  $\Delta T_m$  derecesinin 5 °C altındaki bir değerdeki DNA-DNA benzerliğinin % 70 veya daha fazla olması gereğini ortaya koymaktadır (Wayne vd., 1987).

### 1.6.3. Bakteri Sistematğinde Kullanılan Bazı Kemotaksonomik Yöntemler

Bakteri sistematğinde kullanılan kemotaksonomik yöntemler şu şekilde sıralanabilir: Bakterinin lipid ve yağ asidi içeriğinin, toplam protein profilinin, sitokrom özelliklerinin, bazı immünolojik özelliklerinin ve enzim karakterizasyonları ile fermentasyon ürünlerinin profilinin ortaya çıkarılması gibi özelliklerdir. Ayrıca genelde Gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında hücre duvarının içerdiği peptidoglukanın tipi ve teikoik asitlerin analizi önemli bir rol oynamaktadır (Schleifer ve Kandler, 1972 ve Suzuki vd., 1993). Diğer yandan, prokaryotik hücrelerde bulunan polikatyonik bileşiklerden oluşan poliaminler de sistematik açıdan önem arz etmektedir (Busse ve Auling, 1988).

### 1.6.3.1. Lipid ve Yağ Asidi Kompozisyonu

Lipidler, bütün öbakterilerin sitoplazmik membranlarında bulunmaktadır. Öbakteriler çok fazla sayıda değişik lipid içeriklerine sahiptirler ve lipid içeriklerinin sınıflandırmada kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Johnson, 1986).

Otuz yıldan fazla bir süredir bakteri hücrelerinin içerdikleri yağ asitlerindeki çeşitlilik sınıflandırma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Abel ve arkadaşlarının (1963) hücrel yağ asitlerini gaz kromatografisi ile belirlemesinden bu yana bu yöntem çok çeşitli taksonomik çalışmada kullanılmıştır. Yağ asidi metil esterlerinin analizi taksomi ve teşhis çalışmalarının yapıldığı laboratuvarlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Vauterin vd., 2000).

Bakteri hücrelerinin yağ asidi içerikleri, belirli bakterilerin sınıflandırılmasında fayda sağlamaktadır ve bazı durumlarda belirli taksonları karakterize edebilirler. Bununla birlikte, organizmaların sahip oldukları yağ asidi kompozisyonları birçok etken tarafından etkilenmektedir. Bunlar; organizmanın büyüme ortamının muhteviyatı, inkübasyon sıcaklığı, kültürün yaşı ve örneğin analizinde kullanılan yöntemlerdir (Johnson, 1986).

### 1.6.3.2. Çözünabilir Protein Profili

Tür tayininde genel kanaat, birbirleriyle ilişkili olan organizmaların benzer veya aynı tür hücrel proteinlere sahip olduklarıdır. Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) hücrel proteinlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle örnekten otuza yakın bant elde edilebilir ve karşılaştırması yapılabilir. Cato ve arkadaşları (1982) tarafından gerçekleştirilen ve 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünabilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını baz alan araştırma sonucunda % 80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların aynı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür. Aralarında % 70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken farklı türlerin ise birbirlerinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür.

### 1.7. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından büyük faydalar sağlamaktadır (Brock, 1986). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar şunlardır: Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi ve termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmasıdır. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardan çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (Brock, 1986).

Termofilik organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikozil transferazlar, selülazlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar) ve gıda, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler aynı zamanda çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı da dirençlidir (Aguilar, 1996).

Isıya dayanıklı DNA polimerazlar genetik mühendisliği açısından önemli etkiye sahiptirler. Bu enzimlerin genetik mühendisliğinde kullanıldığı en önemli alan polimeraz zincir reaksiyonları denilen reaksiyonlar ve dideoksi DNA dizin analizi yöntemleridir (Mullis vd., 1986). PCR reaksiyonları yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden bu reaksiyonlarda kullanılan enzimlerin de bu sıcaklıklara dayanıklı olması gereklidir. Bu özelliklere sahip olan DNA polimeraz enzimi ilk olarak *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmiştir. Termofilik bir tür olan *Thermus aquaticus*'dan başka, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* bakterileri de polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan DNA polimerazın kaynağıdır. Bu organizmalardan elde edilen enzimler DNA'nın iki zinciri arasındaki hidrojen bağlarını dahi kırabilen yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdır. Bu sıcaklıkta bozunmadan kalabilen termofilik DNA polimerazlar hidrojen bağlarının kırılması ile tek zincirli forma dönüşen DNA'yı kalıp olarak kullanarak yüksek

sıcaklıklarda polimerizasyon reaksiyonları yapabilmektedir. *Taq* DNA polimeraz enzimi dünya ticaretinde yüz milyon dolarlarla ifade edilen bir paya sahiptir. Bunun nedeni bu enzimin katalizlediği PCR reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar bugün biyoteknoloji ile ilgili birçok işlemin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. PCR reaksiyonları sayesinde, spesifik DNA sıralarının hızlı ve verimli bir şekilde artırılması sağlanır. Bu reaksiyonlar kullanılarak adli tıp, besin analizi ve klinik tıp alanlarında önemli araştırma ve incelemeler yapılabilmektedir (Aguilar, 1996).

Termofilik organizmalardan izole edilen ve endüstride yaygın olarak kullanılan enzim gruplarından biri de proteolitik enzimlerdir. Bu enzimlerin en önemlilerinden biri olan termolisin *Bacillus stearothermophilus*'un bir suşu olan *Bacillus thermoproteolyticus* (Endo, 1962) tarafından üretilir ve *Bacillus subtilis*'ten izole edilen termolisin ile karşılaştırıldığında 70 °C'de 30 saat kaldıktan sonra bile % 86 oranında aktivitesini korumaktadır.

Sıvı ve katı deterjanlar içerisinde bulunan enzimler iyi bir şekilde ayarlanarak ilave edilir. Deterjanların içerdiği bu enzimler toplam enzim üretiminin yaklaşık olarak % 25'ini kapsamaktadır ve bunlar modern biyoteknolojinin çok başarılı bir şekilde gerçekleştirilen ticari uygulamalarındandır. Deterjan endüstrisinde kullanılan termofilik alkalın proteazlar *Bacillus stearothermophilus* bakterisinden elde edilmektedir (Ito vd., 1998). Ayrıca optimum olarak 65 °C'de büyüeyebilen bir *Bacillus* suşundan nitril hidrataz enzimi elde edilmiş ve karakterize edilmiştir (Pereira ve ark, 1998). Mezofilik nitril hidrataz enzimlerinin aksine bu enzim 60 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda çözeltide substrat bulunmadığı sürece kararlı kalabilmektedir.

Termofilik enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan birisi de karbohidratların türevlendirilmesidir. Bununla birlikte halen daha bu modifikasyon işlemi daha spesifik ve daha iyi bir şekilde meydana getirecek olan enzimler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Son zamanlarda karbohidratlara bağımlı olan endüstri kollarında ilave özelliklere sahip olan enzimlere, özellikle de termofilik enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Karbohidratları modifiye edebilen enzimler kağıt endüstrisinde olduğu kadar besin endüstrisinde de hidroliz olaylarının meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (Priest, 1984). Ayrıca bu enzimler karbohidratlara bağımlı olan bazı bileşiklerin türevlendirilmesinde ve sentezlerinde de aktif olarak yer almaktadır. Bu enzimlere amilazlar, pullulanazlar,  $\alpha$ -glukozidazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoz izomerazlar, ksilanazlar ve lipazlar verilebilir. Bu enzimler besin, deterjan, kağıt ve kağıt

hamuru endüstrilerinde önemli roller oynamaktadır (Aguilar, 1996). Bu endüstrilerde daha çok termofil enzimlerin tercih edilmesinin nedeni, termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklarda çalışmasından dolayı reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızının ve gaz formunda olmayan çoğu bileşiklerin çözünürlüğünde artışın olmasıdır. Ayrıca ısının yükselmesi, suyun yüzey gerilimini ve viskozitesini azaltır. Böylece enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar üzerine bazı pozitif etkiler meydana gelmiş olur. Buna ilave olarak, işlem sırasında meydana gelebilecek olan mikrobiyal kontaminasyon, eğer reaksiyon yüksek sıcaklıkta yapılırsa daha az miktarda meydana gelecektir, çünkü biyolojik döngüde çürümeye neden olan bakterilerin çoğu mezofiliktir ( Brock, 1986).

Çok yüksek sıcaklıklara dayanıklı selülaz, laktaz, laminarinaz ve ksilanaz termofilik anaerobik bakterilerden izole edilmiş ve bu enzimler karakterize edilmiştir. Bu enzimler tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde ve endüstrinin diğer bazı kollarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Aguilar, 1996).

Tablo 3. Termofilik organizmaların kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

Termofilik Organizmalar 50-110 °C	Enzimler ve biyoteknolojide kullanılan hücre içi bileşikler	Uygulamaları ve ürettikleri son ürünler
	Amilazlar	Tatlandırıcılarda kullanılan glukoz, fruktoz
	Ksilanazlar Proteazlar	Kağıt ağartılması, Keratinden amino asitlerin üretimi, besin işlenmesi, fırıncılık, mayalanma ve deterjan endüstrisinde.
	DNA Polimerazlar	Genetik mühendisliği

## 1.8. Termofilik Bakterilerin Sahip Olduğu Bazı Isıya Dirençli Enzimler

### 1.8.1. DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar, bütün canlılarda hücresel bilginin replikasyonunda anahtar rol oynayan enzimlerdir. Replikasyon ve hata tamiri işlemlerinde görev yapan DNA polimeraz I enzimi yaklaşık olarak 10 yıl kadar önce Kornber ve Baker (1992) tarafından karakterize edilmiştir. Primer yapıları karşılaştırıldığında bütün DNA polimeraz enzimlerinin dört

gruptan birisine girdiği görülür. Bu gruplar şunlardır; *E. coli* Pol I ailesi,  $\alpha$ -pol ailesi, *E. coli* Pol III ailesi ve IV ailesi. *E. coli* Pol IV ailesi ökaryotlarda görülen Pol  $\beta$  ve terminal transferaza karşılık gelen bir enzimdir (Braithwhite and Ito, 1993). Şimdiye kadar incelenen bütün DNA polimerazların  $\alpha$ -pol ailesine ait olduğu bilinmektedir. Isıya dayanıklı olan DNA polimerazlar, polimeraz zincir reaksiyonlarının geliştirilmesinden beri genetik mühendisliği alanında önemli bir rol oynamaktadır (Mullis vd., 1986).

PCR reaksiyonlarında, bazı önemli problemler halen daha bilim adamlarının karşısına çıkmaktadır. Bunlara örnek olarak, yüksek sıcaklıklardaki revers transkripsiyon olaylarında karşılaşılan problemler verilebilir ve bu gibi problemler halen çözüm beklemektedir. Yeni keşfedilecek DNA polimerazlar sayesinde bu problemlerin üstesinden gelinmesi düşünülmektedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda birkaç termofilik öbakterinin ve arkebakterinin DNA polimeraz genleri ve enzimleri karakterize edilmiştir. DNA polimeraz geni ve enzimi ilk ortaya çıkarılan bakteri Brock ve Freeze (1969) tarafından Yellowstone'dan izole edilen *Thermus aquaticus* bakterisidir. *Thermus aquaticus*'dan izole edilen DNA polimeraz enzimi DNA Pol I ailesindedir ve *Taq* DNA polimeraz olarak adlandırılmıştır. Bu enzim PCR reaksiyonlarında DNA parçalarının artırılmasında çok faydalıdır (Lawyer vd., 1988). Bu enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 75 °C'dir ve *Escherichia coli* DNA pol I ile karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu avantajlardan birisi, yüksek sıcaklıklarda yüksek primer bağlanma spesifikliğin olması ve istenilen DNA parçalarının artırılmasının istenmeyen parçalara göre çok daha yüksek olmasıdır. Aynı zamanda *E. coli* DNA polimerazı 93-95 °C'lerde inaktif hale gelir. Halbuki bu sıcaklık derecesi PCR reaksiyonlarında DNA'nın denatüre olması için gerekli olan sıcaklıktır. *Taq* DNA polimeraz enzimi bu sıcaklıkta aktif halde kalabilmektedir.

*Thermus aquaticus*'dan izole edilen *Taq* DNA polimerazdan başka, DNA polimeraz geni ve enzimi karakterize edilen diğer termofilik öbakteriler *Bacillus stearothermophilus* (Phang vd., 1995), *Bacillus pallidus*, *Bacillus caldotenax* (Uemori vd., 1993), *Thermus filiformis* (Jung vd., 1997) *Thermus thermophilus* (Asakura vd., 1993)'tur. Ayrıca son zamanlarda bilim adamları, daha yüksek sıcaklıklara ve daha ekstrem yaşam şartlarına adapte olabilen arkebakterilerin DNA polimeraz ve diğer enzimleri üzerindeki çalışmalarını artırmışlardır. Son zamanlarda DNA polimeraz genleri ve enzimleri karakterize edilen arkebakteriler şunlardır: *Pyrococcus abyssi* (Gueguen vd., 2001), *Pyrobaculum islandicum* (Kahler ve Antranikian, 2000), *Thermococcus sp.* TY (Niehaus

vd., 1997), *Pyrococcus furiosus* (Uemori vd., 1997 ) ve *Thermococcus litoralis* (Kong ve ark, 1993).

Genel olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde, tam DNA sırası elde edilen ve ortaya çıkarılan DNA polimeraz genleri *E. coli*'de iyi bir şekilde ekspres edilebilen bir ekspresyon vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli*'nin BL21 suşuna aktarılmakta, ekspresyonu ve enzimin karakterizasyonu yapılmaktadır (Grimm ve Arbutnot, 1995).

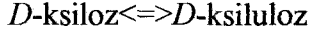
### 1.8.2. Ksiloz (Glukoz) İzomerazlar

Glukoz izomeraz enzimi nişastayı hidrolize edebilen bir enzim değildir. Bu enzim nişastadan türeyen glukozu fruktoza dönüştürür. Bu dönüşüm ticari açıdan bakıldığında önemlidir. Çünkü bu yolla üründeki tat miktarı artar. Glukoz % 70 oranında sukroz kadar tatlıdır ancak fruktoz ise sukrozdan % 50 daha fazla tatlıdır. Bundan dolayı fruktozlu tatlandırıcılar yiyecek ve içeceklerde sukrozun yerine kullanılmaktadır. Amerika'da 1970'lerde sıfır olan fruktozlu tatlandırıcının üretimi 1980'de tüm tatlandırıcılar içinde % 10 seviyesine ulaşmıştır. Amerika'da fruktozlu tatlandırıcı fiyatlarının daha uygun olmasının nedeni mısırın bol ve ucuz oluşu ve bunların işlenmesi için verimli ve yeterli tekniklerin kullanılması ile bu ürünlerin pazarlama imkanlarının olmasıdır. Fruktozlu tatlandırıcılar Avrupa ve Japonya'da da kullanılmaktadır, ancak Avrupa topluluğu ülkelerindeki çiftçiler bu tatlandırıcıların şeker kamışından elde edilen tatlandırıcıların yerini almasını engellemeye çalışmaktadırlar.

Mısır fruktozunun tatlandırıcılarda kullanılmasının artması bakterilerdeki glukozu izomerizasyona uğratabilen enzimlerin varlığının keşfi ile paralellik arz etmektedir. Dört tip olan glukoz izomeraz enziminden sadece *D*-ksiloz izomeraz ticari olarak üretilip kullanılmaktadır. Bunun nedeni bu enzimin ısıya dayanıklı olması (45-65 °C'ye kadar aktif olabilmesi) ve herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymamasıdır. Bu enzim yaygın olarak bulunan bir enzimdir ve ksilozda büyüeyebilen organizmaların birçoğu tarafından üretilir. *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces albus* ve *Bacillus coagulans* tarafından üretilen enzimler kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bunların ağırlıkları birbirine yakındır (sırasıyla 191.000, 165.000, 167.000 dalton) ve birbirine benzer olarak hepsi de dört alt birimden oluşmuştur. *Lactobacillus brevis*'ten izole edilen enzimin optimum sıcaklığı düşük olup 45 °C'dir. Ancak çoğu ksiloz izomeraz enziminin 65 °C'nin üstünde ve 100 °C'ye kadar optimum sıcaklığa sahip olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin optimum pH'ları genel



olarak nötral pH düzeyindedir. Ksiloz izomeraz enzimi aşağıdaki reaksiyonu geri dönüşümlü olarak katalizler.



Ksilulozun olduğu bir ortamda büyüme gerçekleştirilirken ksiluloz fosforlanır ve ribuloz-5-fosfata dönüştükten sonra pentoz fosfat metabolik yoluna girer. Bilinen bütün ksiloz izomerazlar aynı zamanda *D*-glukozu *D*- fruktoza da çevirir (Priest, 1984).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler

Nutrient broth, nutrient agar, bacteriological agar, triryptic soy broth, brain heart infusion broth, tryptic soy agar, trypton water, peptone, glucose, sodium chloride, phenol red, ethilenediaminetetraacetik acid (EDTA), sodium molybdate, sulfanilic acid, diethyl  $\alpha$ -naphthylamine, p-dimethylaminobenzaldehyde, crystal violet, ammonium oxalate, safranin, malachite green, tannic acid, yeast extract, 2-propanol Merck'ten, gelatine Difco'dan, starch, glycerol, L-tyrosine, urea, tris base, sodium dodecyl sulphate (SDS), potassium acetate, phenol:chloroform:isoamyl alcohol, phenol, acrylamide, bis-acrylamide, agarose, xylene cyanole FF, brom phenol blue, coomassie brilliant blue-G 250, coomassie brilliant blue-R 250, ethidium bromide, bovine serum albumin (BSA), guanidium thiocyanate, sarcosyl, ammonium acetate, isoamyl alcohol, Sigma'dan, diammonium hydrogen phosphate, trisodium citrate, methanol ve acetone Carlo Erba'dan satın alındı. Kullanılan tuz bileşikleri % 99 yada daha saftırlar.

Genomik DNA izolasyon kiti Promega, DIG işaretleme ve belirleme sistemi Roche Diagnostics GmbH, Almanya'dan elde edildi.

pUC18 ve pGEMT plazmitleri Promega'dan satın alındı.

#### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

*Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, *Anoxybacillus pushchinoensis* DSM 12423, *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041 tip bakterileri Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)'den temin edildi.

## **2.2. Metotlar**

### **2.2.1. Kaplıcalardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu**

Çalışmada kullanılan su örnekleri, herbir kaplıcadan steril, ağzı kapaklı şişeler içerisine alındıktan sonra olabildiğince kısa sürede ve soğuk şartlar altında laboratuvara getirilmiştir. Daha sonra içerdikleri termofilik bakteriler, uygun besiyerler kullanılarak zenginleştirme kültürleri yapılmak suretiyle çoğaltılıp, uygun besiyerleri içeren agar petrilere tek koloni elde etmek amacıyla ekilmiş ve sonuçta petri üzerinde oluşan koloniler incelenerek birbirinden farklı olabilecek koloniler seçilip bunların saf kültürleri yapıldı (Benson, 1985; Dülger, 1997).

### **2.2.2. İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Ardından izolatların hücre duvarı özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla Gram boyamalar yapıldı ve bu yöntemle göre izolatların Gram (+) veya Gram (-) hücre duvarına sahip olduğuna karar verildi. İzolatların spor yapılarını oluşturup oluşturmadığının ortaya çıkarılması amacıyla spor boyamalar yapıldıktan sonra lam lamel arası preparat yöntemi kullanılarak bakterilerin hareketli olup olmadıkları test edilmiştir (Benson, 1985).

### **2.2.3. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Elde edilen izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları, nutrient broth besiyerinde büyütülüp spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de yapılan ölçümler sonucunda ortaya çıkarıldı. İzolatların maksimum, minimum ve optimum olarak büyüebildiği pH değeri, değişik pH'lara ayarlanmış nutrient broth besiyerleri kullanılarak tespit edildi. Büyümenin olup olmadığı ve düzeyi ise yine spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla değişik oranlarda (% 2; 2,5; 3; 4; 5; 7; 10) NaCl içeren nutrient broth besiyerleri kullanıldı ve 55-60 °C'ye ayarlanmış etüvde 3-7 gün süre ile bekletilerek

izolatların NaCl ihtiyaçları belirlendi. İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçları, “Brain Heart Infusion Agar” besiyerini ihtiva eden deney tüplerine yapılan inokülasyonlar sonucunda, büyümenin olduğu bölgeye göre belirlendi. Ayrıca izolatların tamamen aerobik mi yoksa anaerobik mi olduklarının anlaşılması amacıyla anaerobik agar besiyeri kullanıldı. Bakteriler nişastalı nutrient agar petrilere ekildi ve 3-7 günlük inkübasyon süresinden sonra lügol ilavesiyle izolatların amilaz enzimini üretip üretmedikleri test edildi. Ayrıca jelatinazın üretilip üretilmediği ise nutrient jelatin içeren besiyerlere yapılan inokülasyon ve inkübasyon sonucunda besiyerdeki jelatinin kullanılması ile ortaya çıkarıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992; Benson, 1985; Sneath, 1986; Dülger, 1997).

Bakteri sistematiğindeki önemli karakterlerden bir diğeri de belirli karbohidratları karbon kaynağı olarak kullanma özelliğidir. İzolatların bu özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla değişik şekerleri (sukroz, glukoz, arabinoz, ksiloz gibi) içeren karbohidrat besiyerleri hazırlandı ve bakteri inokülasyonları ve inkübasyonu sonucunda besiyerindeki renk değişimine göre şekerin fermente edilip edilmediğine karar verildi. Ayrıca izolatların H<sub>2</sub>S üretip üretmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla “Triple Sugar Iron Agar” besiyerine inokülasyonlar yapıldı ve tüpün dip kısmında siyah rengin oluşup oluşmadığına bakılarak H<sub>2</sub>S’ün üretilip üretilmediğine karar verildi. Organizmaların glukoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetil karbinol gibi nötral son ürünleri veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetlerinin ortaya çıkarılması amacıyla izolatlar “Voges-Proskauer broth” besiyerine inoküle edildi ve 3 günlük inkübasyondan sonra tüplere “Voges-Proskauer” ayırıcı ilave edilerek testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi. Ayrıca izolatların sitrat ve propiyonatı karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadıklarının ortaya çıkarılması amacıyla sitrat ve propiyonat kullanım besiyerlerindeki büyüme durumları incelendi. İzolatların katalaz ve oksidaz gibi enzimleri üretip üretmedikleri ise katalaz ve oksidaz testleri uygulanarak tayin edildi. Ayrıca nitratı nitrite indirgeme özellikleri ise nitrat broth ve nitrit ayırıcı kullanılarak incelendi (Cappuccino ve Sherman, 1992; Benson, 1985; Sneath, 1986; Dülger, 1997).

## 2.2.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

### 2.2.4.1. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, uygun sıcaklıkta "Tryptic Soy Broth"da bir gece inkübe edilerek büyütülen termofilik izolatlardan Pitcher ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği yönteme göre yapıldı. Elde edilen sıvı kültürler, üremelerinin exponansiyel fazında  $1.000 \times g'$ de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve üstteki sıvı kısım dökülerek pellet kısmı saklandı. Elde edilen bu pellet kısmı, 50 mg/ml oranında lizozim içeren 100  $\mu$ l TE tamponunda (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) çözülmüş ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Hücreler, 0,5 ml 5 mol/L guanidyum tiosiyanat, 100 mmol/L EDTA ve % 0,5 v/v sarkozil (GES ayırıcı) ile parçalandı ve hücre süspansiyonu iyice vorteksenerek karıştırıldı. Tüpler, hücrelerin tamamının patlaması için 5-10 dakika buz üzerine alındı. Üzerlerine 7,5 mol/L soğuk amonyum asetatın 0,5 ml ilave edilip karıştırıldıktan sonra 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Tüplere 0,5 ml kloroform:2-pentanol (24:1) ilave edilerek fazlar tamamen karıştırıldı ve eldeki süspansiyon bir Pastör pipeti yardımı ile 1,5 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarıldı.  $16.000 \times g'$ de 20 dakika santrifüj edilerek üst faz başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0,54 ml soğuk 2-propanol ilave edildi. Tüpler, 1 dakika ters-düz çevrilerek çözeltiler karıştırıldıktan sonra  $6.500 \times g'$ de 20 saniye santrifüj edilerek pellet 500 ml % 70'lik etanol ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 50-100  $\mu$ l steril ddH<sub>2</sub>O'da çözümlenerek  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### 2.2.4.2. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

16S rRNA genleri, her bir termofilik izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5  $\mu$ l 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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

ddH<sub>2</sub>O 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 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56 °C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72 °C'de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si % 1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntülendi.

#### **2.2.4.3. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması**

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan artırılan 16S rRNA genleri TA klonlama vektörleri olan pGEM-T veya pNOT vektörlerine klonlandı ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi yine yukarıda belirtilen primerler kullanılmak suretiyle gerçekleştirildi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

#### **2.2.4.4. Genomik DNA'nın Parmak İzlerinin Çıkarılması**

##### **2.2.4.4.1. RAPD PCR Analizi**

OPAB 7-5'-GTA AAC CGC C-3' primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD PCR analizindeki PCR şartları, Daffonchio ve arkadaşlarına (1998) göre oluşturularak reaksiyonlar 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüplerinde gerçekleştirildi. 25 µl'lik son hacimde 2,5 µl 10 x PCR tamponu, herbir dNTP'den 100 µM, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM primer, 1 U *Taq* DNA polimeraz, 1 µl kalıp genomik DNA ilavesinin ardından son hacim steril ddH<sub>2</sub>O ile 25 µl'ye tamamlandı. Ayrıca reaksiyon karışımının üzeri, buharlaşmanın önlenmesi için 25 µl mineral yağı ile kaplandı ve PCR reaksiyonları "Biometra Personal Cycler" ile gerçekleştirildi. Reaksiyon döngüleri ise: 94 °C'deki ilk denatürasyon basamağının ardından 40 döngü 94 °C'de 1 dakika, 35 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika olmak üzere gerçekleştirildi. PCR reaksiyonları sonucunda oluşan DNA parçaları % 1,5'lik

agaroz jelde yürütülüp etidyum bromür (0.5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntüledi.

#### 2.2.4.4.2. ITS PCR Analizi

16S-23S rDNA arasındaki bölgenin çoğaltılması için FGPS 1490-72 (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') ve FGPL 132-38 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') primerleri kullanıldı. 100 µl'lik son reaksiyon hacmi içerisinde; 5 µg kalıp genomik DNA, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz, herbir primerden 1 mM, herbir dNTP'den 0,2 mM, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 0,1 mg jelatin ml<sup>-1</sup> ilave edildi. PCR reaksiyonu döngüleri ise: 95 °C'de 2 dakikalık ilk denatürasyondan sonra 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonları sonucunda oluşan DNA fragmentleri % 1,4'lük agaroz jelde yürütülüp etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra BioDocAnalyze sistemiyle görüntüledi.

#### 2.2.4.4.3. Rep-PCR Analizi

Rep-PCR reaksiyonları Versalovic ve arkadaşlarının (1994) geliştirdiği primerler ve metoda göre yapılmış olup bu amaçla kullanılan primerler ve sıraları şu şekildedir;

**Rep1R-5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'**

**Rep2R-5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'.**

PCR reaksiyonları 25 µl'lik hacimler halinde gerçekleştirildi ve her bir reaksiyon şu şekilde oluşturuldu: 5 µl 5 x Gitschier tamponu, 0,2 µl 20 mg/ml'lik BSA, 2,5 µl % 100 DMSO, 1,25 µl d NTP karışımı (1:1:1:1), 1 µl Rep1R primeri, 1 µl Rep2R primeri, 2 U *Taq* DNA Polimeraz ve son hacim 25 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. PCR reaksiyonu döngüleri ise şu şekilde oluşturuldu: 94 °C'deki 3 saniyelik ön denatürasyonun ardından 92 °C'de 30 saniye bekletilerek yapılan tam denatürasyondan sonra, 40 °C'de 1 dakika ve 65 °C'de 8 dakika bekletilerek 30 döngü tamamlandıktan sonra 65 °C'de 8 dakikalık son uzama safhasından sonra reaksiyon sonlandırıldı.

### **2.2.4.5. DNA-DNA Hibridizasyonu**

Genomik DNA'ların izolasyonu hidroksiapatitin kullanıldığı kromatografi ile gerçekleştirildi. DNA-DNA hibridizasyonları ise De Ley ve arkadaşlarının (1970) geliştirdiği ve daha sonra Escara ve Hutton (1980) ile Huß ve arkadaşları (1983)'nın yaptığı değişikliklere göre son halini alan yöntemle gerçekleştirildi. Genomik DNA'ların birbirleri ile olan renatürasyon hızları ise "TRANSFER. BAS" programı ile belirlendi.

### **2.2.5. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.2.5.1. İzolatların Çözünabilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması**

##### **2.2.5.1.1. Çözünabilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu**

İzolatların içerdikleri proteinlerin profilini çıkarmak için, öncelikle elde edilen her bir izolattan ve tür tayinleri yapılmış olan diğer şahit bakterilerden 10 ml gece kültürleri yapıldı. Hücrelerin, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilmesiyle oluşturulan çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve % 10 sakkarozdan oluşan TS tamponunda çözüldü ve sıvı azot (-194 °C) tankında bir dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı (Beldüz vd., 1993) . Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edilerek hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildi, daha sonra 16.000 x g'de santrifuj edildi ve protein özütünü içeren sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak -20 °C'de saklandı. Protein konsantrasyonu ise Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile tayin edildi.

##### **2.2.5.1.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi**

Herbir izolattan ve tür tayinleri yapılmış bakterilerden izole edilen, miktarları tayin edilmiş protein özütlerinden uygun miktarlarda (40 µg) alınarak bu özütlere eşit miktarda 2 x muamele tamponu (0,15 M tris-HCl pH 6,8, % 4 SDS, % 20 gliserol, % 6 β-merkapt etanol) ilave edildikten sonra 65 °C'de 90 saniye bekletildi ve Laemli (1970)



tarafından tanımlanan % 12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki herbir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie Brilliant Blue (% 0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, % 10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (% 50 metanol, % 10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (% 7 asetik asit, % 5 metanol) solüsyonuna aktarıldı. Daha sonra telefon yaprak arasına alınıp 80 °C'de 2 saat vakumlu jel kurutucuda kurutularak daimi olarak saklanabilecek hale getirildi.

### 2.2.5.2. İzolatların Yağ Asidi İçeriklerinin Ortaya Çıkarılması

Kaplıcalardan elde edilen ve değişik teknikler yardımı ile birbirlerinden ayrılan termofilik izolatların yağ asidi metil esterlerinin ortaya çıkarılması için aşağıdaki yöntem kullanıldı:

İzolatlar "Triptik Soy agar" petrilere çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve 60 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra steril bir öze yardımıyla agar üzerinden kazınarak alındılar. Her bir numunenin bulunduğu test tüpüne Çözelti I (% 15 sodyum hidroksit, % 50 metil alkol, % 50 ddH<sub>2</sub>O) ilave edildi ve 5-10 saniye çalkalandı, test tüpleri 5 dakika süreyle 100 °C'lik su banyosunda bekletildi, tekrar 5-10 saniye çalkalandı ve 25 dakika 100 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Böylece canlı hücreler parçalanarak, yağ asidlerinin serbest kalması sağlandı. Ardından, test tüplerine 2 ml Çözelti II (6 N 325 ml hidroklorik asit, 275 ml metil alkol) eklendi ve 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 80 °C'de 10 dakika süreyle su banyosunda bekletildi ve hemen buz veya soğuk su banyosuna alınarak 2 dakika süreyle soğutuldu. Soğutulmuş tüplere 1,25 ml Çözelti III (% 50 hekzan, % 50 metil-*tert*-butil eter) eklendi ve 10 dakika süreyle çalkalandı. Bu aşamada tüp içinde iki ayrı faz oluştu. Tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları oluşur. Yağ asidi metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanır. Bu nedenle pastör pipeti kullanarak tüplerin üst kısmındaki asidik faz atıldı ve organik faz muhafaza edildi. En son aşamada her tüpe 3 ml Çözelti IV (10.8 gr. sodyum hidroksit, 900 ml dd H<sub>2</sub>O) ilave edildi ve 5 dakika süreyle çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Tüp içerisinde iki faz oluştu. Üst fazda toplanan ve yağ asid metil esterlerini

içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine transfer edildi. Ağızları sıkıca kapatılan tüpler MIS (Microbial Identification System) cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildi ve içlerindeki yağ asidi metil esterleri belirlendi (Sherlock Microbial Identification System version 4.0, MIDI, Inc., Newark, DE).

## 2.2.6. Isıya Dayanıklı Enzimlerin Araştırılması

### 2.2.6.1. TK4 İzolatının Sahip Olduğu Termofilik DNA Polimeraz Enzim Geninin Kısmi Klonlanması

Termofilik DNA polimeraz enziminin klonlanması çalışmamızda TK4 izolatının seçilmesinin nedeni bu izolatın diğer izolatlardan farklı olarak 75 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda büyüebilmesidir. TK4 bakterisinin genom DNA'sından DNA polimeraz geninin artırılması için kullanılmasının mümkün olabileceği düşünülen 3 adet dejenere primer tasarlandı:

**Pol F1** 5'-ccb aay yts car aac ath cc-3'

**Pol R1** 5'-dak dtc bgg man rta bmk vck ncg-3'

**Pol R2** 5'-kas nak ytc rtc rtg nac ytg-3'

Dejenere primerler içinde bulunan normal nükleotidleri gösteren harflerin dışındaki harflerin anlamı şu şekildedir:

<b>r:</b> a veya g	<b>y:</b> c veya t	<b>m:</b> a veya c
<b>k:</b> g veya t	<b>s:</b> c veya g	<b>w:</b> a veya t
<b>h:</b> a veya c veya t	<b>b:</b> c veya g veya t	<b>v:</b> a veya c veya g
<b>d:</b> a veya g veya t	<b>n:</b> a veya c veya g veya t	

Yukarıda belirtilen primer kullanılarak TK4 bakterisinin genomik DNA'sındaki DNA polimeraz geninin belli bir bölgesi çoğaltılmaya çalışıldı. Reaksiyon şartları şu şekilde oluşturuldu: 10 x PCR tamponundan 5 µl, 25 mM'lık MgCl<sub>2</sub>'den 3 µl, 2 mM'lık NTP'lerin herbirinden 5'er µl, ileri ve geri primerlerinden 1 µl, 1 µl TK4 genomik DNA'sı ve 2,5 U *Taq* DNA polimeraz ilave edildikten sonra son hacim steril ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra PCR döngüleri şu şekilde oluşturuldu.

İlk olarak 94 °C'de 2 dakika denatürasyondan sonra 30 döngü 94 °C'de 10 saniye 35 °C'de 30 saniye ve 68 °C'de 90 saniye olarak ayarlandıktan sonra 68 °C'de 7 dakika bekletilerek PCR reaksiyonu tamamlandı.

DNA polimeraz geni için bir ileri ve iki geri dejenere primeri tasarlandı ve bundan dolayı her iki revers primeri için de ayrı ayrı PCR reaksiyonları yapıldı ve oluşan DNA parçaları % 1,2'lik agaroz jelde yürütülerek fotoğraflandı. Bu her iki geri primeri ile de oluşturulan DNA parçacıkları pGEM-T vektörüne klonlanarak baz dizileri belirlendi. Yapılan dizin analizi sonucunda elde edilen baz sıraları Gen bankasındaki DNA sıraları ile karşılaştırıldı ve hangi primerler ile DNA polimeraz gen parçasının artırıldığı ortaya çıkarıldı.

İnvers PCR yönteminin temeli, belli bir bölgesi bilinen genin bu bilinen bölgelerine göre tasarlanmış primerler kullanılarak buradan normal PCR'ın aksine dışarıya doğru gidilerek genin diğer kısımlarının elde edilmesine dayanır (Moon ve Krause, 1991; Stropel ve Dervan, 1990). Bu amaçla genden daha önce elde ettiğimiz yaklaşık 700 bp'lik bölgenin iki uç bölgesindeki belli bölgelere göre olmak üzere ileri ve geri primerleri tasarlandı. Tasarlanan primerlerin sıraları şu şekildedir:

**TK4<sub>inv</sub> F1:** 5'-ACG GCG ATG AAT ACG CCG AT-3'

**TK4<sub>inv</sub> R1:** 5'-TCG TGG CGA AAC GCA TCG AT-3'

Ayrıca daha önce baz dizisi ortaya çıkarılan gen bölgesinin restriksiyon enzimi kesme bölgeleri "Clone version 4.01" programı kullanılarak araştırıldı ve bu inceleme sonucunda elimizdeki bu gen bölgesinde kesme bölgesi bulunmayan ve genel olarak tanıma bölgesi altı ve daha fazla nükleotidden oluşan enzimler seçildi ve bu enzimler kullanılarak TK4 bakterisinden elde edilen genomik DNA kesildi. Bu çalışma sırasında kullanılan enzimler: *Pst*I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Bam*H I, *Hind* III, *Nar* I, *Sma* I, *Xcm* I, *Xba* I, *Kpn* I'dır.

Bu enzimler kullanılarak kesilen genomik DNA parçalarının birbirine yapıştırılıp halka halini alması için T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla ligasyon reaksiyonları yapıldı. Ligasyon reaksiyon şartları şu şekilde oluşturuldu: Herbir enzimle kesilmiş 1 µg TK4 bakterisinin genomik DNA'sı, 50 µl T4 DNA Ligaz tamponu, 3 µl T4 DNA Ligaz enzimi

ilavesinin ardından herbir reaksiyonun son hacmi 500 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak restriksiyon enzimleri ile oluşan herbir DNA parçacığının kendi üzerine yapışıp halkalaşması sağlandı.

Elde edilen halka şeklindeki DNA parçacıkları kalıp olarak kullanılarak yukarıda sırası belirtilen TK4inv F1 ve TK4inv R1 primerleri yardımıyla PCR yapıldı. Reaksiyon şartları; 1 µl herbir enzimle kesilip kendi üzerine yapıştırılan kalıp DNA, 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ünite *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 ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlanarak gerçekleştirildi. Çoğaltma işlemi ise 200 µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler" da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri şu şekilde ayarlandı: İlk denatürasyon basamağı 95 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon için), 52 °C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72 °C'de 4 dakika (polimerizasyon için) bekletilerek gerçekleştirildi. PCR reaksiyonları sonucunda oluşan DNA parçaları, % 1,2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra fotoğraflandı.

#### **2.2.6.2. TK4 DNA Polimeraz Geninin Southern Blotting Yöntemiyle Elde Edilmesi**

Genomik DNA izolasyon kiti (Promega) yardımıyla izole edilen TK4 bakterisinin genomik DNA'sı bir gece boyunca *EcoR* I, *EcoR* V ve *Pst* I restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesildi. Tam kesilmenin olup olmadığı kesik genomik DNA'lar % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Daha sonra hibridizasyon işlemi için kullanılacak olan nitroselüloz membrana geçirilecek ve hibridizasyon süresince buz dolabında saklanacak olan DNA'lar ile yaklaşık 700 bp'lik TK4 DNA polimeraz parçasını içeren pGEM-T klonu % 0.8'lik agaroz jele yüklendi ve mavi boya jelden çıkıncaya kadar yürütülme işlemine devam edildi. Daha sonra jelin nitroselüloz membrana geçirilecek kısmı bıçakla kesildi ve DNA'ların membrana geçme işlemleri yapıldı. Agaroz jelin buz dolabında saklanacak kısmı ise kesilip alındı ve streç film naylonuna sarılıp buz dolabına bırakıldı. DNA'ların nitroselüloz membrana geçirilmesinin ardından Southern Blotting hibridizasyonuna geçildi ve bu işlem sırasında DIG işaretleme ve belirleme sisteminden faydalanıldı (Roche Diagnostics GmbH, GERMANY). Southern Blotting

hibridizasyonunda prob olarak DIG işaretleme sistemiyle işaretlenmiş 700 bp'lik TK4 DNA polimeraz parçacığı kullanıldı.

Hibridizasyon sonucunda pozitif sinyaller ve pozisyonları belirlendikten sonraki aşamada, bu bantların dolapta saklanan jelden alınmasına geçildi. Bir cetvel yardımıyla bantların tam pozisyonları jel üzerinde tespit edildi ve jelin bu kısımları kesilerek alındı ve jeldeki DNA'lar agaroz jelden DNA çıkartma kiti (MBI Fermentas) kullanılarak çıkarıldı.

Daha sonraki aşamada jelden çıkarılan DNA parçalarının pUC18 vektörüne klonlanmasına geçildi. Bu amaçla ilk olarak pUC18 vektörü ayrı ayrı *EcoR* I, *Sma* I ve *Pst* I enzimleriyle kesildi. Jelden çıkarılan parçalardan *EcoR* I ile elde edilen parçacıklar pUC18 *EcoR* I'e, *Pst* I enzimiyle elde edilen parçalar ise pUC18 *Pst* I'e ve *EcoR* V ile elde edilen parçalar ise pUC18 *Sma* I'e T4 DNA ligaz enzimi yardımı ile klonlanmaya çalışıldı ve ligasyon işlemi sonucunda oluşan rekombinant plazmidler transformasyonla *E. coli* JM 101 suşuna aktarıldı. Petri üzerinde X-Gal'dan faydalanılarak yapılan mavi-beyaz ayırımından rekombinant plazmitler ayırt edilmeye çalışıldı ve beyaz kolonilerden plazmid DNA'sı izolasyonları kaynatma metoduna göre yapıldı (Maniatis vd., 1982). Elde edilen plazmit DNA'ları uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğru uzunluktaki DNA polimeraz fragmentlerinin klonlanıp klonlanmadığı araştırıldı. Restriksiyon enzimleriyle yapılan kesimler sonucunda doğru uzunlukta DNA parçalarını içeren klonlar seçildi ve bu klonların istenilen geni içerip içermediği yapılan "Slot Blot" hibridizasyonu ile kontrol edildi.

#### 2.2.6.2. Ksiloz (Glukoz) İzomeraz Aktivitesinin Ölçülmesi

Karbohidratların karbon kaynağı olarak kullanımı testleri sonucunda; A1, A2, A4, A5, A6, A8, A9, K1, K2, K4, TK4, G1 ve G2 nolu izolatların ksilozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği görülmüştür. İzolatların bu özelliğinden faydalanılarak, ksiloz (glukoz) izomeraz aktivitesine sahip olabileceği düşünülerek izolatlardan G2'nin ksiloz izomeraz aktivitesi araştırıldı.

G2 izolatu, % 0,5-1,0 oranında ksiloz içeren nutrient broht'a 24 saat büyütüldükten sonra santrifüjlenerek çöktürüldü ve hücreler 1 gramı 5 ml'de olmak üzere mililitresinde 0,2 mg lizozim, 5 µg DNaz ve % 0,1 oranında Triton X-100 ihtiva eden 25 mM fosfat tamponunda (pH 7) çözüldükten sonra 2-3 saat belli aralıklarla sallanan sallayıcı üzerinde bekletilerek patlatılıp ardından +4 °C'de 20.000 rpm'de 20 dak santifüjlendi ve süpernatant

alınarak enzim aktivitesinin ölçülmesi için kullanıldı. Ksiloz izomeraz aktivitesi ise Lee ve arkadaşlarının (1990) geliştirdiği yöntemle göre belirlendi.

Ksiloz izomeraz aktivitesinin ölçülmesi için ilk olarak bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bir mililitre reaksiyon karışımı içerisine 70 mM ksiloz, 10 mM MnSO<sub>4</sub> ve 100 mM MOPS tamponu (pH 7,0) ve enzim ekstraktı ilave edildi. 30 dakika 60 °C'de bekletildikten sonra reaksiyon 1 ml 0,5 M perklorik asit ilave edilerek durduruldu ve su ile 10 kez sulandırıldıktan sonra sistein-karbazol-sulfurik asit ilave edilip renk değişiminin olması için 10 dakika 60 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Ayrıca belli miktarlarda ksiluloz içeren standart tüpler hazırlanarak yapılan ölçümler sonucunda standart bir grafik oluşturulmuştur. Yapılan reaksiyonlar sonucunda, reaksiyon tüpleri içersinde oluşan ksiluloz miktarı standart grafikten faydalanılarak ortaya çıkarıldı.



### 3. BULGULAR

Bu çalışmada, Kestanbol (Çanakkale), Gönen (Balıkesir) ve Diyadin (Ağrı) kaplıcalarından elde edilen su örneklerinden termofilik bakteriler izole edilerek bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı. Kaplıcalardan alınan su ve çamurlu su örneklerinden bakteri izolasyonu zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilmek suretiyle gerçekleştirildi. Çalışmada, izolatların tür tayinlerinin yapılması için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler uygulandı.

#### 3.1. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Her üç kaplıcadan izole edilen termofilik bakteri izolatlarının saf kültürleri yapıldıktan sonra, Diyadin kaplıcasından 9, Kestanbol kaplıcasından 6 ve Gönen kaplıcasından 2 adet olmak üzere birbirlerinden farklı olabilecek olan toplam 17 adet izolat seçildi. İzolatların çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 4 ve 5’de görülmektedir. Yapılan incelemeler sonucunda elde edilen bütün termofilik izolatların basil morfolojisine sahip, spor oluşturabilen ve katalaz enzimi üretebilen izolatlar olduğu gözlemlendi. Ayrıca diğer özelliklerine bakıldığında genel olarak A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, G2, K1, K2 ve K4 nolu izolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından aralarında genel olarak çok az bir farklılık olduğu görülmektedir. Bu grup bakterilere bakıldığında A8 nolu izolatin nitratı nitrite indirgeyememe özelliği ve mannitolu karbon kaynağı olarak kullanamama özelliği ile diğerlerinden ayrıldığı ve A2, A6 ve G2 nolu izolatların ise diğerlerinden farklı olarak jelatini hidroliz edebilme yeteneğinde olduğu görülmektedir. A1, G1 ve TK4 nolu izolatların birbirlerinden ve diğer izolatlardan farklı olduğu; A3, K3 ve K5 nolu izolatların ise kendi aralarında birbirlerine benzer olduğu ortaya çıkarıldı.







## 3.2. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri

### 3.2.1. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz dizileri

Bakteri sistematığı çalışmalarında 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin ortaya çıkarılması önemli genetiksel özelliklerin başında gelir. Bu amaçla ilk olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda kesinlikle birbirleriyle aynı tür olabilecek olan izolatlar dışındaki tüm termofilik bakteri izolatlarından (A1, A2, A3, A4, A7, A8, K1, K2, K3, K4, K5, TK4, G1, G2 nolu izolatlardan) elde edilen genomik DNA'dan PCR yardımı ile 16S rRNA geni (yaklaşık olarak 1400 bp) çoğaltıldı. Çoğaltılan 16S rRNA genleri pNOT (*Xcm* I enzimi ile kesilmiş) veya pGEM-T vektörlerinden birine klonlandı ve doğru klonların agaroz jelde incelenerek teyit edilmesinden sonra baz dizini belirleyen bir şirket (Davis Sequencing, ABD) aracılığıyla baz dizinleri otomatik dizi analizörleri ile belirlendi. Elde edilen termofilik izolatların 16S rRNA gen dizileri Ekler bölümünde görülmektedir.

Elde edilen termofilik izolatların 16S rRNA gen dizileri, Gen Bankasında var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak bu gen dizilerine en fazla benzer olan diğer bakteriyal 16S rRNA genleri arasındaki benzerlik oranları belirlendi (Tablo 5). Tablo 5'den görüldüğü gibi A5, A6 ve A9 nolu izolatların 16S rRNA gen dizileri belirlenmemiştir. Bunun sebebi, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakıldığında bu izolatların benzer olduğu diğer izolatların seçilmesi ve onların 16S rRNA gen dizilerinin analiz edilmesidir. Morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakıldığında A5, A6 ve A9'un genelde A2, A4 ve G2'ye benzer olduğu görüldü ve bu izolatlar arasından A2, A4, G2'nin 16S rRNA gen dizisi belirlenirken diğerlerinin 16S rRNA gen dizileri belirlenmedi.

Tablo 5. Elde edilen termofilik izolatların 16S rRNA gen dizileriyle Gen Bankasında var olan 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması

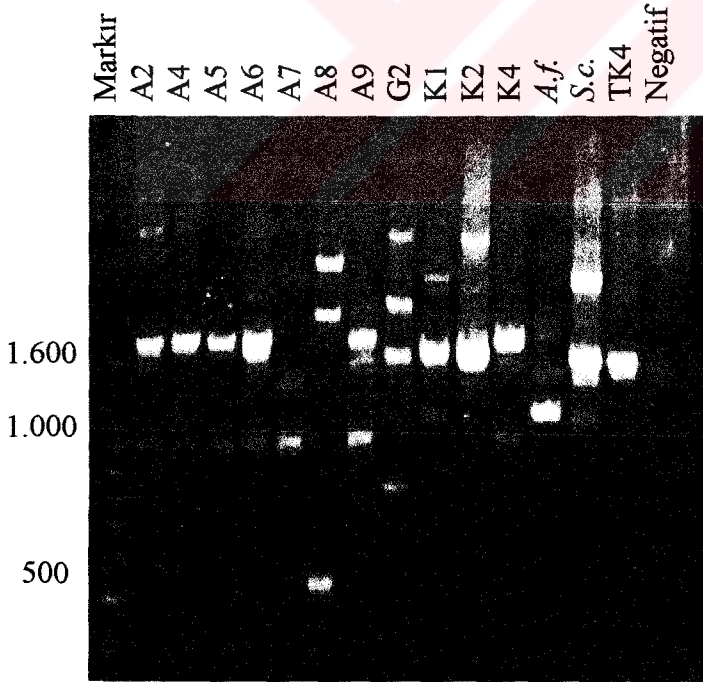
İzolat No	16S rRNA dizisine göre en fazla benzediği organizma	Benzeme oranı
A1	<i>Bacillus licheniformis</i>	% 97
A2	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 97
A3	<i>Bacillus thermosphaericus</i>	% 99
A4	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 98
A7	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 97
A8	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 96
K1	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 98
K2	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 99
K3	<i>Bacillus thermosphaericus</i>	% 99
K4	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 97
K5	<i>Bacillus thermosphaericus</i>	% 99
TK4	<i>Saccharococcus caldoxylolyticus</i>	% 98
G1	<i>Bacillus thermoleovarans</i>	% 99
G2	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	% 98

### 3.2.2. İzolatların Bazı Genomik DNA Parmak İzleri

16S rRNA gen dizilerine göre ve daha önce elde edilen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda birbirlerine benzer olduğu düşünülen izolatlar ve bu izolatlara benzer olduğu ortaya çıkarılan DSM kültür merkezinden satın alınan standart bakteri suşları olan *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 ve *Saccharococcus caldoxylolyticus* DSM 12041 arasındaki benzerliğin daha ileri düzeyde çalışılabilmesi için aşağıdaki genomik DNA parmak izleri çıkarıldı.

### 3.2.2.1. RAPD PCR Analizi

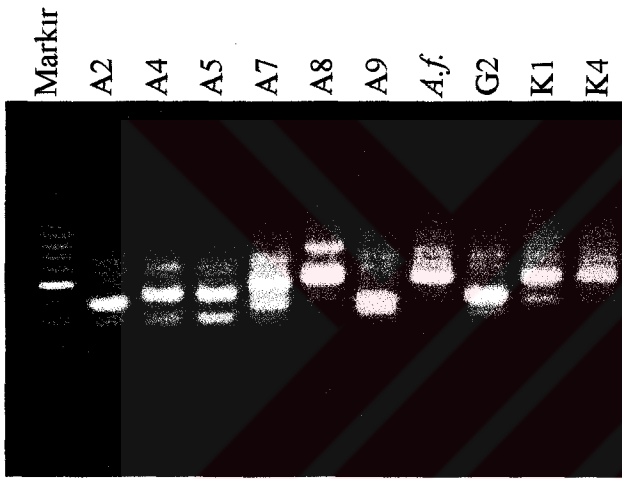
Yapılan 16S rRNA gen analizi ve diğer özellikleri bakımından *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzer olduğu ortaya çıkarılan termofilik izolatlar A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, G2, K1, K2, K4 ile *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 ve 16S rRNA gen dizisi bakımından *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041'e % 98 oranında benzeyen TK4 izolatını birbirleriyle karşılaştırmak üzere OPAB 7 primeri kullanılarak RAPD analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda Şekil 1'de görüldüğü gibi 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den daha fazla benzer olan izolatlardan hiçbiri bu bakteriye benzer bir RAPD profili göstermemektedir. Buna rağmen *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041'e 16S rRNA gen dizisi açısından % 98'den daha fazla benzer olan TK4 nolu izolat bu bakteriye % 50 oranında benzemektedir.



Şekil 1. Araştırmada kullanılan termofilik bakteri izolatlarının ve standart olarak kullanılan bakterilerin OPAB-07 (5'-GTA AAC CGC C-3') primeri ile oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. *A.f.*: *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, *S.c.*: *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041.

### 3.2.2.2. ITS PCR Analizi

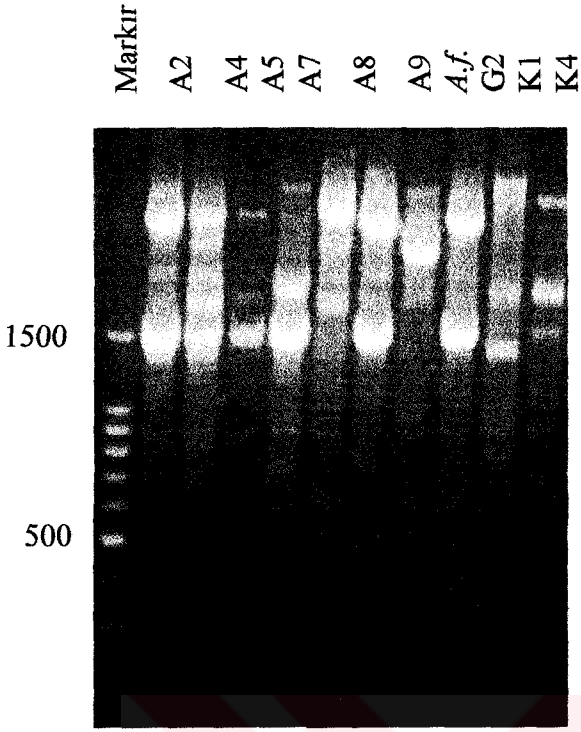
Yapılan 16S rRNA gen analizi ve diğer özellikleri bakımından *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzeyen termofilik izolatlar olan A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, G2, K1, K2, K4 ile *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 bakterisini karşılaştırmak üzere 16S-23S rRNA genleri arasındaki "intergenik" bölge PCR reaksiyonları ile artırıldı ve oluşan PCR profili incelendi. Yapılan inceleme sonucunda Şekil 2'den de görüldüğü gibi elde edilen termofilik izolatlardan hiçbirisinin *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e benzer bir profil göstermediği ortaya çıkarıldı.



Şekil 2. 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den daha fazla benzer olan suşların ITS PCR analizi. *A.f.*: *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641

### 3.2.2.3. Rep-PCR Analizi

16S rRNA gen analizi ve diğer özellikleri bakımından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 bakterisine % 97'den daha fazla benzeyen ancak ITS PCR profili açısından bu bakteriden farklı profiller gösteren termofilik izolatlar olan A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, G2, K1, K2, K4 izolatları ile *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, Rep-PCR profili açısından Rep-PCR primerleri kullanılarak karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırma sonucunda Şekil 3'te de görüldüğü gibi hiçbir izolatın Rep-PCR profili bakımından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e benzemediği ortaya çıkarıldı.



Şekil 3. 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den daha fazla benzer olan suşların Rep-PCR analizi. *A.f.* *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641.

### 3.2.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Elde edilen termofilik izolatların yapılan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve bazı genetiksel testler sonucunda, birbirlerine ve sistematikteki yerleri belli olan bazı termofilik bakteri türlerine bazı özellikleri bakımından benzer olduğu bazı özellikleri bakımından ise farklılıklar arzettiği gözlemlendi. Elde edilen izolatların incelenen özellikler bakımından birbirlerine yakın olanları seçildi ve birbirlerinden farklı olabileceği düşünülenlerin tam sistematiklerinin yapılması amacıyla bu izolatlara, sistematik otoriteleri tarafından en geçerli yöntem olan DNA-DNA hibridizasyonu uygulandı. Yapılan 16S rRNA gen analizi ve diğer özellikleri bakımından *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzer olan ancak ortaya çıkarılan genomik DNA parmak izi sonuçlarına göre bu bakteriden farklı olduğu görülen termofilik izolatlar olan A2, A4, A7, A8, G2 ve K4 ilk olarak *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 ile karşılaştırıldı ve elde edilen sonuçlar Tablo 6'de görülmektedir.

Tablo 6. İzole edilen termofilik izolatlar ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 Arasında % DNA-DNA homolojisi

	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> DSM 2641
A4	45.4
A7	52.3
A8	46.3
A9	46.7
K4	60.4
G2	53.4

Yapılan bu ilk DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda Tablo 6'de de görüldüğü gibi 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97'den fazla benzer olan izolatların hiçbirisinin DNA-DNA homolojisinin % 70'in üzerinde olmadığı ve bundan dolayı bu bakteriden farklı türler olduğuna karar verildi. Bundan sonraki aşamada *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 olmadığı teyit edilen bu izolatların aynı türe ait bakteri suşları olup olmadıklarının araştırılması amacıyla bu izolatlar birbirleriyle DNA-DNA hibridizasyonuna maruz bırakıldı ve Tablo 7'de görülen sonuçlar elde edildi.

Tablo 7. İzole edilen bazı termofilik izolatlar arasındaki % DNA-DNA homolojisi

	A4	A7	A8	G2
A7	88.2	x	x	x
A8	36.3	41.2	x	x
G2	82.3	77.9	45.7	x
K4	48.2	46.8	40.9	38.5

Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde A4, A7 ve G2 nolu izolatların aynı türe ait suşlar olduğu, A8 ve K4 nolu izolatların ise iki farklı bakteri türü olduğu görülmektedir. Ayrıca elde edilen hibridizasyon sonuçlarına göre *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641 olmadığı teyit edilen ve birbirlerinden de farklı olduğu görülen termofilik izolatlar, *Anoxybacillus* cinsinin diğer bir üyesi olan *Anoxybacillus pushchinoensis* ile DNA-DNA hibridizasyonuna maruz bırakıldı. Yapılan DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda Tablo 8 görüldüğü gibi A8 nolu izolatın *Anoxybacillus pushchinoensis*'e % 76,7 oranında benzediği ve bu türe ait bir suş olduğu, G2 ve K4 nolu izolatların ise bu türden farklı bakteriler olduğu ve *Anoxybacillus pushchinoensis* ile aralarındaki DNA-DNA

hibridizasyonu benzerliğinin G2 ile % 45, K4 ile ise % 42.9 oranında olduğu görülmektedir.

Tablo 8. *A. pushchinoensis* ve *S. caldxylolyticus* ile bazı izolatlar arasındaki % DNA-DNA homolojisi

	<i>A. pushchinoensis</i>	<i>S. caldxylolyticus</i>
G2	45.0	x
A8	76.7	x
K4	42.9	x
TK4	x	79.8

Ayrıca 16S rRNA gen dizisi bakımından *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041'e % 98 oranında benzeyen TK4 nolu izolat, bu bakteri ile DNA-DNA hibridizasyonuna maruz bırakıldı. Yapılan hibridizasyon çalışması sonucunda bu iki bakterinin % 79.8 oranında birbirlerine benzer olduğu ve bundan dolayı da elde edilen TK4 izolatının *Saccharococcus caldxylolyticus* türüne ait yeni bir suş olduğuna karar verildi

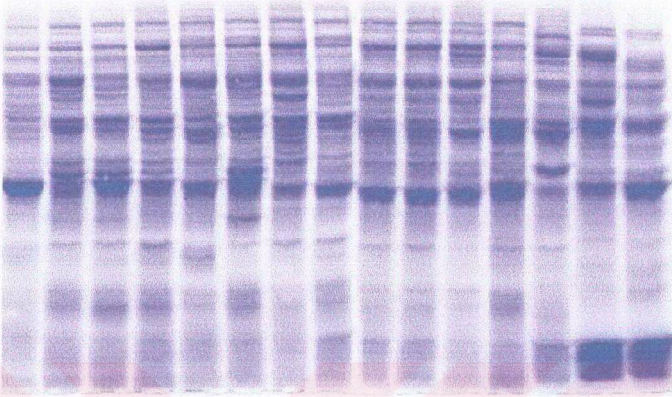
### 3.3. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özellikleri

#### 3.3.1. İzolatların Çözünabilir Protein Profillerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatlardan 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e % 97 ve daha fazla benzer olan 11'i ile *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041'e % 98 oranında benzer olan TK4 nolu izolatın çözünabilir proteinleri izole edildi ve % 12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek ayrıldılar. Şekil 4'de görülen protein profilleri incelendiğinde *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e 16S rRNA gen analizi sonuçlarına göre % 97'den daha fazla benzer olan izolatların *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'e az bir oranda benzer olduğu, ayrıca izolatların kendi aralarında da bazılarının birbirine benzer protein profili gösterdiği bazılarının ise farklı protein profillerine sahip oldukları gözlemlendi. TK4 nolu izolat ile *Saccharococcus caldxylolyticus* DSM 12041'in benzer protein profillerine sahip oldukları gözlemlendi.



A2 A4 A5 A6 A7 A9 G2 A.f. K1 K2 K4 A8 A.p.TK4 S.c.



Şekil 4. Kaplıcalardan izole edilen izolatlardan ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, *Saccharococcus caldoxylolyticus* DSM 12041 ile *Anoxybacillus pushchinoensis*'den saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. A.f.: *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, A.p.: *Anoxybacillus pushchinoensis*, S.c.: *Saccharococcus caldoxylolyticus* DSM 12041.

### 3.3.2. İzolatların Yağ Asidi İçerikleri

Bakteri sistematğinde kullanılan diğer bir kemotaksonomik yöntem; incelenen organizmanın içerdiği yağ asitlerinin miktar ve türünün ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaçla yapılan yağ asidi metil esterlerinin analizi sonucunda Tablo 9 ve 10'de görüldüğü gibi genel olarak A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, K1, K2, K4 ve G2 nolu izolatların birbirlerine benzer bir şekilde temel yağ asidi olarak yaklaşık % 65 civarında  $C_{15:0}$  izo, A1 izolatının temel yağ asidi olarak % 43 oranında  $C_{14:0}$ , A3, K3, K5 izolatlarının ise yaklaşık olarak % 40 civarında  $C_{16:0}$  izo, G1 izolatının temel yağ asidi olarak % 46 oranında  $C_{15:0}$  izo ve TK4 izolatının ise temel yağ asidi olarak % 50 oranında  $C_{17:0}$  izo içerdiği belirlendi.

Tablo 9. Diyadin (Ağrı) kaplıcasından elde edilen izolatların yağ asidi içerikleri

Yağ asitlerinin cinsi	İzolat numaraları ve içerdikleri yağ asidi oranları								
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
<b>Doymuş yağ asitleri</b>									
C <sub>14:0</sub>	43,04	1,10	-	0,93	0,99	1,16	0,69	0,59	1,19
C <sub>15:0</sub>	3,99	0,90	1,44	1,65	1,45	0,75	1,06	3,08	0,96
C <sub>16:0</sub>	-	3,86	6,22	1,89	1,98	3,10	2,94	1,93	2,98
C <sub>17:0</sub>	-	-	1,08	-	-	-	-	0,45	-
C <sub>18:0</sub>	-	-	0,54	-	-	-	-	-	0,64
<b>Doymamış yağ asitleri</b>									
C <sub>15:1 w5c</sub>	-	-	-	0,41	0,25	-	-	0,70	-
C <sub>16:1 w11c</sub>	-	-	0,85	-	-	-	-	-	-
C <sub>16:1 : w7c alkol</sub>	-	-	3,69	-	-	-	-	-	-
C <sub>17:1 : w5c</sub>	-	2,04	-	3,87	4,28	1,87	2,03	3,92	1,42
C <sub>17:1 : w10c</sub>	-	-	0,92	-	-	-	-	-	-
<b>Dallanmış yağ asitleri</b>									
C <sub>13:0 izo</sub>	-	-	-	0,16	-	0,29	0,21	-	0,26
C <sub>14:0 izo</sub>	-	0,72	0,91	1,09	1,03	0,41	0,38	0,48	0,53
C <sub>14:0 izo 3OH</sub>	-	-	-	0,32	0,44	-	0,32	-	-
C <sub>15:0 izo</sub>	12,65	62,13	27,07	64,55	66,36	68,06	64,76	53,83	63,07
C <sub>15:0 anteizo</sub>	-	2,50	-	2,76	2,86	2,66	2,17	1,44	2,14
C <sub>16:0 izo</sub>	2,99	5,46	37,27	5,54	4,80	2,94	3,60	3,87	2,34
C <sub>17:0 anteizo</sub>	-	-	-	0,93	-	-	-	-	-
C <sub>17:1 anteizo</sub>	-	-	-	-	1,03	0,39	0,47	0,74	0,44
C <sub>17:0 izo</sub>	27,47	15,67	20,01	10,57	9,16	13,56	16,41	14,95	10,02
C <sub>17:0 anteizo</sub>	9,86	4,10	-	2,76	2,47	3,36	3,56	2,30	2,47
C <sub>19:0 10 - metil</sub>	-	-	-	-	-	-	-	9,64	10,66

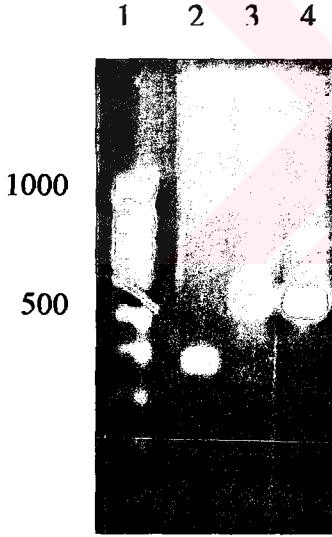
Tablo 10. Kestanbol (Çanakkale) ve Gönen (Balıkesir) kaplıcalarından elde edilen izolatların yağ asiti içerikleri

Yağ asiti cinsi	İzolot numaraları ve içerdikleri yağ asidi oranları							
	K1	K2	K3	K4	K5	TK4	G1	G2
<b>Doymuş yağ asitleri</b>								
C <sub>12:0</sub>	-	-	-	-	-	-	0,50	-
C <sub>14:0</sub>	0,79	0,77	-	1,29	-	-	0,80	1,18
C <sub>15:0</sub>	1,50	1,30	1,88	1,11	1,52	-	1,60	1,12
C <sub>16:0</sub>	2,90	2,66	4,21	3,47	4,28	3,83	1,66	2,38
C <sub>17:0</sub>	-	-	0,87	-	0,94	-	-	-
C <sub>18:0</sub>	-	-	-	-	0,67	-	-	-
C <sub>19:0</sub>	-	-	-	-	-	1,02	-	-
<b>Doymamış yağ asitleri</b>								
C <sub>16:1 w11c</sub>	-	-	1,02	-	0,62	-	-	-
C <sub>16:1 : w7c alkol</sub>	-	-	5,20	-	4,74	-	-	-
C <sub>17:1 : w5c</sub>	-	-	-	0,59	-	-	3,77	2,63
C <sub>17:1 : w10c</sub>	-	-	1,34	-	0,93	-	-	-
<b>Dallanmış yağ asitleri</b>								
C <sub>14:0 izo</sub>	1,94	1,07	1,26	0,88	2,03	-	1,85	1,25
C <sub>14:0 izo 3OH</sub>	0,14	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>15:0 izo</sub>	63,86	60,29	21,94	68,62	23,40	33,66	45,83	65,19
C <sub>15:0 anteizo</sub>	1,17	1,49	-	3,56	-	0,81	4,43	2,64
C <sub>16:0 izo</sub>	8,34	6,17	43,89	6,37	45,51	4,45	16,46	5,99
C <sub>17:1 anteizo</sub>	-	-	-	-	-	-	0,79	0,82
C <sub>17:0 izo</sub>	15,10	11,24	16,38	9,54	14,47	49,45	13,10	11,96
C <sub>17:0 anteizo</sub>	1,81	2,18	1,05	3,69	-	6,77	6,84	3,29
C <sub>18:0 izo</sub>	-	-	0,96	-	0,89	-	-	-
C <sub>19:0 10 - metil</sub>	-	11,14	-	-	-	-	-	-

### 3.4. İzolatların Sahip Olduğu Bazı Isıya Dayanıklı Enzimlerin Araştırılması

#### 3.4.1. TK4 İzolatının Sahip Olduğu Termofilik DNA Polimeraz Geninin Klonlanması

Yapılan çalışmalar bölümünde gösterilen primer sıralarından da anlaşıldığı gibi polimeraz geni için tek bir ileri (Pol F1) ve iki adet geri (Pol R1 ve 2) dejenere primeri sentezlenmişti. Bundan dolayı yapılan PCR reaksiyonları da her iki geri primeri için de ayrı ayrı yapıldı ve reaksiyonlar sonucunda oluşan DNA parçalarının % 1,2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra Şekil 5'te görüldüğü gibi ağırlıkları birbirinden farklı olan iki farklı bant elde edildi. Bantların ağırlıkları incelendiğinde Pol R1 primeri ile yapılan reaksiyonda oluşan DNA bandının ağırlığının 500 bp civarında, Pol R2 ile yapılan reaksiyonda oluşan bandın ise 700 bp civarında olduğu görüldü.



Şekil 5. Dejenere Pol R1 ve Pol R2 primerleri ile TK4 izolatından ve *E. coli Taq* suşundan PCR yardımı ile elde edilen DNA parçalarının jeldeki görüntüsü. 1. 100 bp markır, 2. TK4 Pol F1-Pol R1 parçacığı, 3. TK4 Pol F1-Pol R2 parçacığı, 4. *E. coli Taq* Pol F1-Pol R2 parçacığı

Her iki geri primeri ile oluşturulan DNA parçaları pGEM-T vektörüne klonlanarak baz dizileri belirlendi. Yapılan dizin analizi sonucunda elde edilen baz sıraları Gen Bankasındaki DNA sıraları ile karşılaştırıldı ve sonuçta Pol R1 primerinin genomda DNA

polimeraz geninin dışındaki başka bölgelere bağlanması neticesinde 500 bp'lik bir DNA parçacığı ürettiği, Pol R2'nin ise genomdaki DNA polimeraz geni içinde bir yere bağlanıp bu gen içindeki yaklaşık 700 bp'lik bir bölgeyi ürettiği anlaşıldı. PolF1 ve PolR2 primerleriyle üretilen yaklaşık 700 bp'lik DNA polimeraz gen bölgesinin baz sırası Şekil 6'da görülmektedir.

TTA GGA GTT CGT CAT GGA CTT GCA GCA GCA TCC GCG CTT GCA GCT TTT  
 CTT GCT TTA GCC GAT CCG CCA AAT CAA TCA TCG CCT TTT TAA TAA TAT  
 CGG CGG CGC TTC CTT GAA TCG GCG TAT TCA TCG CCG TCC GTT CGG CAA  
 AGC TGC GCA GGT TGA AGT TGC GGC TCG TAA TGT CCG GCA AAT AGC  
 GGC GGC GGT GCA ACA GCG TCG TGA CAT ATC CTT TTT GCT TCG CTT CTT  
 GGA CGA TGT TTT CCA TAT ACT GCT TAA CGC CCG GAA AAA TTT CAA AAT  
 ACC GGC GGA TAA ATT CCG CTG CCT CTT TTC GTG GGA TGT TTA AAT TTT  
 GTG ACA GCC CGT AGT CGC TGA TGC CGT AAA CAA TGC CAA AGT TCA  
 CCG CTT TCG CCT GCC TGC GCA TGT TTG GCG TCA CTT CAT CGG CTG TGA  
 CGT GGA AAA TAT CCA TCG CCG TTT TCG TAT GAA TAT CTA AAT CGT GGC  
 GAA ACG CAT CGA TTA AAT TTT CAT CAT TGG CAA TAT GGG CAA GCA CGC  
 GCA GCT CAA TTT GCG AAT AAT CGG CGG AAA AAA TGA CCC AAT CCG  
 GCT TGG GAC GGA ACG AAC GCC TGG CGA ATT TTC CGC CCT TCC

Şekil 6. TK4 DNA polimeraz geninin TK4 Pol F1-Pol R2 primerleri ile elde edilen parçasının gen dizisi

Elde edilen bu gen sırasının Gen Bankasındaki DNA sıraları ile karşılaştırılmaları sonucunda bu sıranın % 83 oranında *Bacillus caldotenax* DNA polimeraz genine benzer olduğu görüldü. Böylece bundan sonraki çalışmalarımızda gerekli olan primerlerin ve problemlerin elde edilmesinde faydalanılacak bir bölge ortaya çıkarılmış oldu.

### 3.4.2. İnverson PCR İle TK4 DNA Polimeraz Geninin Diğer Kısımlarının Elde Edilmesi

*Pst* I, *EcoR* I, *EcoR* V, *BamH* I, *Hind* III, *Nar* I, *Sma* I, *Xcm* I, *Xba* I, *Kpn* I restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilen genomik DNA parçalarının birbirine yapıştırılıp halka halini alması için T4 DNA ligaz enzimi yardımıyla ligasyon reaksiyonları yapıldı ve

elde edilen halka halindeki DNA parçacıkları kalıp olarak kullanılarak yukarıda sırası belirtilen TK4inv F1 ve TK4inv R1 primerleri yardımıyla PCR reaksiyonları yapıldı. Yapılan PCR reaksiyonları sonucunda sadece *Pst*I enzimi ile oluşturulan DNA parçacıklarından yaklaşık 400 bp'lik bir PCR ürününün olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu PCR ürünü pGEMT vektörüne klonlanıp baz dizisi ortaya çıkarıldı. İnvers PCR yöntemiyle daha önce bilinen sıranın her iki tarafından geriye doğru gidildiğinden elimizdeki sıranın her iki tarafından olmak üzere yaklaşık olarak 180 bp'lik yeni gen sırası elde edilmiş oldu. Elde edilen sıra Şekil 7'de görülmektedir.

**TCT AAA CGG ATC GGA ATG TTT TGC AAG TTC GGC TCC GTG GAG CTT  
 AGC CGC CCC GTT TGC GTC AGC GCC TGA TTA AAA ATG GTG TGC ACT  
 TTG TGG GTG TCG CAA TGC ACT ACT TTT AGC AAT CCT TCA ATA TAG  
 GTC GAC TAT TAG GAG TTC GTC ATG GAC TTG CAG CAG CAT CCG CGC  
 TTG CAG CTT TTC TTG CTT TAG CCG ATC CGC CAA ATC AAT CAT CGC CTT  
 TTT AAT AAT ATC GGC GGC GCT TCC TTG AAT CGG CGT ATT CAT CGC CGT  
 CCG TTCGGC AAA GCT GCG CAG GTT GAA GTT GCG GCT CGT AAT GTC CGG  
 CAA ATA GCG GCG GCG GTG CAA CAG CGT CGT GAC ATA TCC TTT TTG CTT  
 CGC TTC TTG GAC GAT GTT TTC CAT ATA CTG CTT AAC GCC CGG AAA AAT  
 TTC AAA ATA CCG GCG GAT AAA TTC CGC TGC CTC TTT TCG TGG GAT GTT  
 TAA ATT TTG TGA CAG CCC GTA GTC GCT GAT GCC GTA AAC AAT GCC AAA  
 GTT CAC CGC TTT CGC CTG CCT GCG CAT GTT TGG CGT CAC TTC ATC GGC  
 TGT GAC GTG GAA AAT ATC CAT CGC CGT TTT CGT ATG AAT ATC TAA ATC  
 GTG GCG AAA CGC ATC GAT TAA ATT TTC ATC ATT GGC AAT ATG GGC AAG  
 CAC GCG CAG CTC AAT TTG CGA ATA ATC GGC GGA AAA AAT GAC CCA  
 ATC CGG CTT GGG ACG GAA CGA ACG CCT GGC GAA TTT TCC GCC CTT CCC  
 AGC CGC TTT ACT TCT TCT TTC GGC GCT TCC AAA ATC AA**

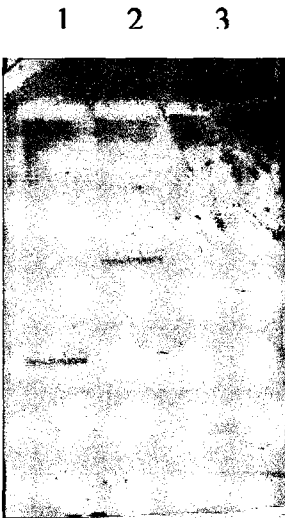
Şekil 7. TK4 Pol F1-Pol R2 primerleri ile ve invers PCR yöntemiyle elde edilen TK4 DNA polimeraz geninin bir bölümünün baz dizisi

Şekil 7'deki baz sırası üzerinde koyu olarak gösterilen nükleotidler invers PCR ile elde edilen *Pst* I parçacığından okunan nükleotidlerdir. Böylece genin önceden bilinen

sırasına ilaveten 5' yönünde 143 nükleotit ve 3' yönünde ise 39 yeni nukleotit ortaya çıkarılmış oldu.

### 3.4.3. TK4 DNA Polimeraz Geninin Southern Blotting Yöntemiyle Elde Edilmesi

Yapılan hibridizasyon işlemi sonucunda jele pozitif kontrol olarak yüklenen ve nitroselüloz membrana geçirilen 700 bp'lik TK4 DNA polimeraz parçasını içeren pGEM-T klonundaki pozitif sinyalin kısa bir sürede görünmesinin ardından *EcoR* I, *EcoR* V ve *Pst* I restriksiyon enzimleriyle kesilen genomik DNA hatlarında da birer bant olmak üzere pozitif sinyaller elde edildi. Filtreye aktarılmadan önce jele diğer DNA'larla birlikte yüklenen ve nitroselüloz filtreye aktarım işleminden önce alınan fotoğraftan faydalanılarak oluşan bu bantların büyüklükleri yaklaşık olarak tahmin edildi. Yapılan incelemeler sonucunda Şekil 8'den de görüldüğü gibi *EcoR* I enzimiyle pozitif sinyal veren bantın yaklaşık olarak 5500 bp civarında, *EcoR* V restriksiyon enzimiyle oluşan bantın 3000 bp civarında ve *Pst* I enzimiyle pozitif sinyal veren bantın ise 1000 bp civarında olduğu görüldü. Nitroselüloz filtreden konumları belirlenin her bir parçacık buzdolabında bekletilen agaroz jelden kesilerek çıkarıldı ve uygun enzimlerle kesilmiş olan pUC18 vektörüne klonlanmaya çalışıldı.



Şekil 8. TK4 bakterisinin DNA Polimeraz geninin Southern Blotting ile belirlenmesi, 1. TK4 genom DNA'sının *EcoR* V pozitif bantı, 2. TK4 genom DNA'sının *EcoR* I pozitif bantı, 3. TK4 genom DNA'sının *Pst* I pozitif bantı

Yapılan klonlama denemeleri sonucunda doğru olduğu düşünölen klonlar TK4 DNA polimeraz geninin yaklaşık 700 bp'lik kısmı prob olarak kullanılarak "Slot Blot" hibridizasyonuna maruz bırakıldı. Yapılan hibridizasyon neticesinde çok sayıdaki klonun pozitif sinyal verdiği göröldü. En güçlü pozitif sinyal gösteren klonlardan 5 tanesi seçildi ve baz dizin analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda klonlardan hiçbirinin doğru DNA polimeraz parçasını içermediği göröldü.

#### 3.4.4. G2 İzolatının Sahip Olduğu Ksiloz (Glukoz) İzomeraz Aktivitesinin Araştırılması

Karbohidrat kullanma testleri sonucunda G2 nolu termofilik izolatın da içinde bulunduğu izole edilen birkaç termofilik bakterinin ksiloz şekerini karbon kaynağı olarak kullandığı göröldü. Bakterilerde ksiloz kullanımının ilk enzimi ksiloz izomerazdır. Ksiloz içeren LB besiyerinde G2 bakterisinin 60 °C'de 24 saat büyütölmeginin ardından ksiloz izomeraz aktivitesi Lee ve arkadaşlarının (1990) geliştirdiği yöntemle göre ölçöldü ve G2 bakterisinin literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında yüksek aktiviteye sahip bir enzim içerdiği göröldü.

Tablo 11. G2 izolatının ksiloz izomeraz aktivitesi

<b>Karbon kaynağı</b>	<b>Ksiloz izomeraz (U/litre)</b>
<b>Ksiloz</b>	0.78
<b>Glukoz</b>	0.5



#### 4. İRDELEME

Termofilik basiller aerobik veya fakültatif aerobik endospor oluşturabilen optimum büyüme sıcaklıkları 45-70 °C arasında olan bakterilerdir. Termofilik ve mezofilik ortamdan izole edilmiş yüzden fazla termofilik basil bulunmaktadır. Son zamanlarda elde edilen basil şekilli termofilik bakteriler *Bacillus* ve *Alicycbacillus* olmak üzere iki cins altında sınıflandırılmaktadırlar. Ancak sınıflandırılan çoğu termofilik basilin *Bacillus* cinsine ait olduğu bilinmektedir (Rainey vd., 1994).

Araştırma alanlarından izole edilen bakterilerin genel olarak bakıldığında *Bacillus* cinsine veya bu cinsten son zamanlarda ayrılmış olan çok yakın cinslere ait oldukları görülmektedir. Termofilik *Bacillus* türleri çok çeşitli termal ve termal olmayan çevrelerden izole edilmiştir (Sharp vd., 1992). Literatürler incelendiğinde, sadece birkaç termofilik *Bacillus* türünün sıcak su kaplıcalarından izole edildiği görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada, elde edilen bakterilerin bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından birbirlerine göre farklılıklar gösterdiği ve bazı özellikler bakımından ise literatürlerde var olan bakteri türlerine benzer oldukları tespit edildi. Ancak sadece morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayanılarak yapılan sınıflandırmanın bazı karışıklıklara neden olduğu ve bu yüzden de kesin ve tam sınıflandırmanın yapılabilmesi için sonuçların bazı genetik, kemotaksonomik ve serolojik bulgularla desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Johnson, 1986).

Bilindiği gibi makromoleküllerin filogenetik analizlerde kullanılması, önemli bilgiler sağlamaktadır. rRNA'ların özellikle de 16S rRNA'nın akrabalıkların incelenmesinde önemli olduğu bilinmektedir. Çünkü 16S rRNA yapısında büyük oranda bilgi içermekte olup, korunmuş bir tabiatı ve evrensel bir dağılımı vardır (Lane vd., 1985). Ayrıca Stackebrandt ve Goebel (1994), aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin bazı dizileri arasındaki benzerliğin % 97'den daha az olduğunu ve aynı türe ait suşların ise 16S rRNA genleri açısından birbirlerine % 97'den daha fazla benzer olduğunu önermektedirler. Ayrıca aralarında 16S rRNA gen dizisi açısından % 95'den fazla benzerlik bulunan bakterilerin aynı cinse ait türler olduğu vurgulanmaktadır (Ludwig vd., 1998).

Bu amaçla klasik taksonomik özellikleri belirlenerek birbirlerinden farklı oldukları düşünülen termofilik izolatların ilk olarak 16S rRNA genleri PCR yardımıyla artırıldı ve

elde edilen PCR ürünleri uygun bir vektöre klonlandıktan sonra baz dizinlerinin ortaya çıkarılması için baz dizin analizi yapıldı. Dizin analizi sonucunda elde edilen gen sıralarının Gen bankasında var olan bakteriyal 16S rRNA genleriyle karşılaştırılması sonucunda Tablo 5'den de görüldüğü gibi Diyardin Kaplıcasından elde edilen A2, A4, A7 ve A8 nolu izolatların, Kestanbol kaplıcasından izole edilen K4 nolu izolatların ve Gönen Kaplıcasından izole edilen G2 nolu izolatın 16S rRNA gen dizisi açısından *Anoxybacillus flavithermus*'a % 97'den (Heinen vd., 1982; Pikuta vd., 2000) daha fazla benzer oldukları gözlemlendi. Ayrıca A1 izolatının 16S rRNA gen dizisinin *Bacillus licheniformis*'e % 97 (Chester, 1901), A3, K3 ve K5 nolu izolatların *Bacillus thermosphaericus*'a % 99 (Andersson vd., 1995), TK4 nolu izolatın *Saccharococcus caldoolyolyticus*'a % 98 (Ahmad vd., 2000), G1 nolu izolatın ise *Bacillus thermoleovarans*'a % 99 (Zarilla ve Perry, 1987) oranında benzer oldukları görüldü.

Ancak son zamanlarda 16S rRNA gen dizisi açısından aralarında % 97'den fazla benzerlik bulunan aynı cinse ait bakterilerin bile kesin olarak aynı tür bakteriler olmayabileceği önerilmektedir (Stackbrant ve Goebel, 1994). Bu yüzden birçok cins içerisinde görülen, farklı bakteri türleri arasındaki % 97'den fazla olan benzerliğin bu bakterilerin aynı tür olduğunu göstermeyebileceği ve 16S rRNA'ya göre yeni bakteri türlerinin belirlenmesinin güvenilir olmayacağı önerilmektedir (Yoon vd., 1997). 16S rRNA genleri arasındaki benzerliğin birbirlerine aşırı derecede benzeyen organizmaların ayrılmasında kullanılması çok zordur. Bundan dolayı elde edilen 16S rRNA gen dizisi karşılaştırılması sonuçlarının diğer bazı sonuçlarla desteklenmesi gerekmektedir.

Fox ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan bir çalışmada sakrofilik türler olan *Bacillus globisporus* W25<sup>T</sup> ve *Bacillus psychrophilus* W16A<sup>T</sup> ile W5 suşları karşılaştırıldı. Yapılan 16S rRNA gen analizleri sonucunda bu üç suşun birbirlerine % 99,5'dan daha fazla benzerliğe sahip olduğu görüldü. Ayrıca bu suşlar arasındaki taksonomik akrabalıklar fenotipik özelliklerine de yansımaktaydı. Ancak son zamanlarda bakterilerin kesin tür tayinlerinin yapılmasında temel teşkil eden DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda bu her üç suşun da DNA-DNA homolojisi açısından birbirlerine % 70'den daha az oranda benzer olduğu ve bu yüzden de farklı türlere ait bakteriler olduğu görüldü. Bütün bakteri sistematik otoriteleri tarafından da kabul edilen görüş, aynı türe ait olan suşlar arasında DNA-DNA homolojisi açısından benzerliğin % 70'den daha fazla olmasıdır (Wayne vd., 1987). Bu sonuçlar ve benzeri diğer sonuçlar dikkate alındığında 16S rRNA gen dizininin tür ayırımında kullanımının çok garantili bir metot olmadığı görülmektedir. 16S

rRNA gen dizisinin her zaman doğru sonucu vermemesinin nedenlerinden biri, çok nadir durumlarda bile olsa bir organizmanın aralarında büyük oranda farklılık bulunan iki ya da daha fazla 16S rRNA genine sahip olmasıdır (Mylvaganam ve Dennis, 1992; Nübel vd., 1996). Bu nedenle sistematik otoriteleri 16S rRNA gen dizin analizinin cinslerin ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayrımında kullanılmasının uygun olduğunu vurgulamaktadırlar.

Bütün bu görüşler dikkate alınarak elde edilen termofilik izolatlar ile bu izolatların 16S rRNA gen dizileri açısından benzer oldukları tip bakteri suşlarının bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldı. Yapılan bu karşılaştırma sonucunda *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzer olan izolatların bu türe ait olmayabileceği görüldü.

Fenotipik karakterler sadece biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi ile ortaya çıkarılmaz aynı zamanda yağ asidi profili gibi kemotaksonomik markırların analiziyle de ortaya çıkarılabilir. Yağ asidi profiline ilave olarak toplam hücre proteinlerinin jel elektroforezi ve çok lokuslu enzim elektroforezi yapılarak da bazı fenotipik özellikler ortaya çıkarılmış olur.

*Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzer olan izolatların ve *Saccharococcus caldxylosilyticus*'a % 98 oranında benzer olan TK4 izolatının benzer oldukları tip suşlar ile protein profili açısından karşılaştırması yapıldı. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda Şekil 4'de görüldüğü gibi *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine % 97'den daha fazla benzer olan A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, G2, K1, K2 ve K4 nolu izolatlardan A8'in dışında kalan izolatların *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine belli bir oranda benzer olduğu ancak aralarında bazı farklılıklar olduğu, genel olarak bakıldığında A2, A4, A5, A6, A9 ve G2 nolu izolatların protein profillerinin birbirine benzer olduğu, K1, K2 ve K4 nolu izolatların benzer bir protein profili gösterdiği ve TK4 izolatı ile *Saccharococcus caldxylosilyticus* izolatının ise benzer bir protein profili gösterdiği görülmektedir. Daha önceden de belirtildiği gibi aynı türe ait olan suşlar DNA-DNA homolojisi açısından birbirlerine en az % 70 oranında benzemektedirler. Cato ve arkadaşları (1982) yaptıkları bir çalışmada, aralarında % 40 oranında DNA-DNA homolojisi olan, aynı *Clostridium* türü olduğu öne sürülen suşların, protein profili açısından çok belirgin farklılıklara sahip olduğunu ve bu yüzden de bunların farklı türler olabileceğini önerdiler. Cato ve arkadaşları (1982) tarafından, 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını esas

alan bir araştırma yapılmış ve araştırmanın sonucunda aralarında % 80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların, aynı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür (Cato vd., 1982). Aralarında % 70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken, farklı türlerin ise birbirinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür (Cato vd., 1982). Elde edilen protein profili sonuçları fizyolojik ve biyokimyasal sonuçları destekler niteliktedir.

Elde edilen tüm termofilik izolatların ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'in yağ asidi içerikleri ortaya çıkarıldı. Yapılan analizler sonucunda, A2, A4, A5, A6, A7, A9, K1, K2, K4 ve G2 nolu izolatların birbirlerine benzer bir şekilde ana yağ asidi olarak yaklaşık % 60-68 arasında değişen miktarlarda C<sub>15:izo</sub> yağ asidine sahip oldukları, A8 izolatının bunlardan biraz farklı bir şekilde ana yağ asidi olarak C<sub>15:izo</sub> yağ asidine % 53,83 oranında sahip olduğu, A1 izolatının ana yağ asidi olarak % 43,04 oranında C<sub>14:0</sub> yağ asidini içerdiği, A3, K3 ve K5 nolu izolatların ise ana yağ asidi olarak yaklaşık % 40 oranında C<sub>16:izo</sub> yağ asidini taşıdığı, G1 nolu izolatın ana yağ asidi olarak % 45,83 oranında C<sub>15:0 izo</sub> yağ asidine sahip olduğu, TK4 nolu izolatın ise ana yağ asidi olarak % 49,45 oranında C<sub>17:0 izo</sub> yağ asidine sahip olduğu ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641'in ise ana yağ asidi olarak % 54,85 oranında C<sub>15:0 izo</sub> yağ asidine sahip olduğu ortaya çıkarıldı.

Hücre sel yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizine dayalı kemotaksonomik yaklaşımlar 1960'lı yıllardan beri mikroorganizmaların, bakterilerin, fungusların, mayaların ve aktinomisetlerin belirlenmesinde ve karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Şahin, 2001). Lipidlerin başlıca bileşeni olan yağ asitleri fosfolipidler, glikolipidler veya lipopolisakkaritler halinde biyolojik membranlarda bulunurlar ve membranın akıcılık, bütünlük, geçirgenlik membrana bağımlı enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olurlar. Yağ asitlerinin konsantrasyonunun ve içeriğinin filogenetik olarak birbirlerinden farklı mikroorganizmalarda yağ asidi zincirinin boyu, çift zincir konumlarının ve substitüsyonların yerleri bakımından değişkenlik arzettiği bilinmektedir. Bununla birlikte standart şartlar altında bu sayılan özelliklerin birbiriyle yakın ilişkili organizmalar için benzer olduğu bilinmektedir. Yağ asitlerinin bu özellikleri dikkate alındığında elimizde bulunan ve birbirleriyle yakın ilişkili olduğunu düşündüğümüz izolatların yağ asidi profillerinin birbirine benzemesi gerekmektedir. Tablo 9 ve Tablo 10'dan da görüldüğü gibi birbiriyle, belirlenen diğer özellikleri bakımından benzer olan A2, A4, A5, A6, A7, A9, K1, K2, K4 ve G2 nolu izolatların temel yağ asidi olarak yaklaşık % 65 oranında C<sub>15:iso</sub> yağ asidini ihtiva ettiği, A8 nolu izolatın bunlardan biraz farklı bir şekilde temel yağ

asidi olarak C<sub>15:iso</sub> yağ asidine % 53,83 oranında sahip olduğu, A1 nolu izolatin ise temel yağ asidi olarak % 43,04 oranında C<sub>14:0</sub> yağ asidini içerdiği, birbirlerine benzer özellikler gösteren A3, K3 ve K5 nolu izolatlardan ise yine benzer şekilde temel yağ asidi olarak yaklaşık olarak % 40 oranında C<sub>16:izo</sub> yağ asidini taşıdığı, incelenen diğer özellikleri bakımından diğer bütün termofilik izolatlardan farklılıklar gösteren G1 nolu izolatin ana yağ asidi olarak % 45,83 oranında C<sub>15:0 iso</sub> yağ asidine sahip olduğu ve TK4 nolu izolatin ise ana yağ asidi olarak % 49,45 oranında C<sub>17:0 iso</sub> yağ asidine sahip olduğu görülmektedir. *Bacillus* cinsine ait organizmalar olan *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus flavothermus*, *Bacillus thermoruber*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus caldolyticus* ve *Bacillus thermocloacae* türlerinin benzer bir şekilde temel yağ asidi olarak C<sub>15:0 iso</sub> yağ asidini ihtiva ettiği C<sub>16:iso</sub>, C<sub>17:0 iso</sub> ve C<sub>17:0 anteiso</sub> gibi dallanmış yağ asitlerini ise düşük miktarda içerdikleri rapor edilmiştir (O'Leary ve Wilkinson, 1988; Demhanter ve Hensel, 1989). Bu sonuçlar dikkate alındığında *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine benzer oldukları düşünülen termofilik izolatların içerdikleri C<sub>15:0 iso</sub> yağ asidinin bu bakteriye benzer olduğu ve yağ asidi sonuçlarının elde edilen diğer sonuçları destekleyici mahiyette olduğu görülmektedir.

*Anoxybacillus flavithermus* bakterisine 16S rRNA gen dizisi açısından % 97'den daha fazla benzer olan izolatların bu türe ait olup olmadıklarının ve kendi aralarındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkarılması için ilk olarak termofilik izolatlar ile *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin karşılaştırılması amacıyla ITS PCR (Daffonchio vd., 1998) yöntemi kullanıldı. 16S-23S rRNA genleri arasındaki "spacer" bölgelerin dizi çeşitliliği, tiplendirmede, RFLP'de ve bakteri türlerinin ve aynı türe ait suşların ayrılmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Yoon vd., 1997). 16S-23S rRNA genleri arasındaki intergenik transkriptlenen boşluk bölgelerinin uzunlukları bazı durumlarda tür içinde çeşitlilik gösterirken bazı durumlarda ise farklılık göstermeyip tür içinde sabit kalmaktadır (Daffonchio vd., 1998). Daffonchio ve arkadaşları (1998) yaptıkları bir çalışmada *Bacillus cereus* bakterisinde 16S-23S ITS bölgesinin uzunluğunun tür içinde sabit kaldığını buna karşılık *Bacillus licheniformis* bakterisinde ise bu bölge açısından iki farklı uzunlukta PCR bantının oluştuğunu ortaya çıkardılar. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada (Wunschel vd., 1994) *Bacillus subtilis*'in iki farklı uzunlukta ITS bantı oluşturduğu ortaya çıkarıldı. Bu çalışmalar dikkate alınarak yapılan ITS PCR sonucunda *Anoxybacillus flavithermus*'a 16S rRNA gen dizisi açısından % 97'den daha fazla benzer olan türlerin bu bakteriyle benzer bir ITS profili göstereceği düşünüldü. Ancak Şekil 2'den

de görüldüğü gibi elde edilen sonuçlar incelendiğinde termofilik izolatların hiçbirisinin *Anoxybacillus flavithermus*'a benzer bir ITS PCR profili göstermediği tespit edildi. Bu sonuç ve önceden bahsedilen literatürler düşünüldüğünde bu termofilik izolatların *Anoxybacillus flavithermus* türüne ait bakteriler olmayabileceği fikri güçlendi.

Ancak elde edilen 16S rRNA gen dizisi sonuçlarına göre *Anoxybacillus flavithermus*'a benzer olan 10 adet termofilik bakteri izolatu bulunmaktaydı. Bilindiği gibi bakteri tür tayininde bütün sistematik otoriteleri tarafından bir bakterinin hangi tür bir bakteri olduğunun kesin olarak ortaya çıkarılması için DNA-DNA hibridizasyonunun yapılması gerekmektedir. Wayne ve arkadaşları (1987) aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin kesinlikle % 70'den daha fazla olduğunu önermektedirler. Ancak on adet bakteri suşunun DNA-DNA hibridizasyonu yöntemiyle karşılaştırılması çok pahalı bir çalışma olduğundan bu on suşun birbirleriyle aynı ya da yakın olanlarının elenmesi yoluna gidildi. Bu amaçla elimizde bulunan ve *Anoxybacillus flavithermus*'a 16 S rRNA gen dizisi açısından % 97'den daha fazla benzer olan türlerin kendi aralarındaki benzerliklerin ve aynı suşa ait olan izolatların birbirlerinden ayrılması amacıyla RAPD PCR (Williams vd., 1990) ve Rep-PCR (Versalovic vd., 1994) yöntemleri uygulandı. Literatürler incelendiğinde görüldüğü gibi RAPD PCR yöntemiyle bir türün suşları arasındaki genotipik farklılıklar ortaya çıkarılmaktadır. Yapılan RAPD PCR çalışması sonucunda Şekil 1'den de görüldüğü gibi A2, A4, A5, A6, A9 ve K4 nolu izolatların birbirlerine benzer bir RAPD profili gösterdiği, diğer izolatların ise hem birbirlerinden hem de *Anoxybacillus flavithermus*'dan farklı bir profil gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde elde edilen Rep-PCR sonuçları incelendiğinde, Şekil 3'de görüldüğü gibi A2, A4, A5, A6, A9 ve G2 nolu izolatların ise birbirlerine benzer bir profil gösterdiği diğer izolatların ise birbirlerinden ve *Anoxybacillus flavithermus*'dan farklı bir profil gösterdiği görülmektedir.

Yapılan bütün karşılaştırmalar sonucunda *Anoxybacillus flavithermus*'dan farklı olduğu ortaya çıkarılan ve kendi aralarında da birbirlerine benzerlikleri ve farklılıkları teyit edilen termofilik izolatların hem kendi aralarında hem de *Anoxybacillus flavithermus* ile olan DNA-DNA homoloji benzerliklerinin ortaya çıkarılması için DNA-DNA hibridizasyonu çalışması yapıldı. Yapılan bu çalışma sonucunda, Tablo 6'de görüldüğü gibi A4 nolu izolatin *Anoxybacillus flavithermus*'a % 45,4, A7 nolu izolatin % 52,3, A8 nolu izolatin % 46,3, A9 nolu izolatin % 46,7, K4 nolu izolatin % 60,4 ve G2 nolu izolatin ise % 53,4 oranında benzer olduğu gözlemlendi. Bu benzerlik oranları ve Wayne ve

arkadaşlarının (1987) önerileri göz önüne alındığında DNA-DNA hibridizasyonu yapılan hiçbir termofilik izolatin *Anoxybacillus flavithermus*'a ait bir suş olmadığı ortaya çıkarıldı.

Ancak elde edilen ve *Anoxybacillus flavithermus*'a 16S rRNA gen dizisi açısından % 97'den daha fazla benzer olan izolatların hem fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal, toplam protein profili, yağ asidi sonuçları ve hem de genetiksel test sonuçları incelendiğinde bunların en yakın olduğu cinsin *Anoxybacillus flavithermus*'u da içine alan *Anoxybacillus* cinsi olduğu görüldü. Rainey ve arkadaşları (1994) 16S rRNA gen dizisi analizine dayanan, daha çok mezofilik *Bacillus* türlerini (Ash ve ark. 1991), sınırlı sayıda termofilik *Bacillus* türünü ve *Bacillus*'lara çok benzer olan *Saccharococcus thermophilus*'u (Rainey ve Stackebrandt, 1993) içine alan bir çalışma yaptılar. Yapılan bu çalışmada 16S rRNA gen dizisi ve G+C içeriğine göre *Bacillus* türleri 5 büyük gruba ayrıldı ve termofilik özellik gösteren *Bacillus* türlerinin Grup 5'i teşkil ettiği ortaya konuldu. Grup 5 ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde *Bacillus flavothermus* ve *Saccharococcus thermophilus*'un bu gruba dahil edildiği görülmektedir. Ancak bu grup içinde *Bacillus flavothermus*'a bakıldığında tam kesin sistematiği yapılamayan bir bakteri olduğu görülmektedir. Pikuta ve ark (2000)'larının yaptıkları bir çalışmada anaerobik, alkalofilik ve orta derecede termofilik özellikte bir bakteri olan *Anoxybacillus pushchinoensis*'i tespit ettiler. Bu bakterinin fenotipik özellikleri, 16S rRNA geninin sırası ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçlarının diğer *Bacillus* türleri ile karşılaştırıldığında aralarında farklılıkların olduğunu ve bu bakteri türünün *Bacillus* cinsinin dışında bir cinse dahil edilmesi gerektiğini vurguladılar ve yaptıkları çalışma sonucunda *Anoxybacillus* cinsi yeni bir cins olarak literatürlere dahil edildi. Heinen ve arkadaşları (1982) tarafından ilk sistematiği yapılan ancak Rainey ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus*'ların Grup 5 içerisine yerleştirilmesine rağmen sistematik olarak kesinliği tam olmayan bir bakteri olarak belirtilen *Bacillus flavothermus*'un özellikleri açısından *Anoxybacillus* cinsine yakın olduğu ve bu cinsin diğer bir üyesi olduğu yine Pikuta ve ark (2000) yaptıkları çalışma sonucunda ortaya konuldu ve *Bacillus flavothermus* bakterisinin adı *Anoxybacillus flavithermus* olarak değiştirildi.

*Anoxybacillus* cinsi olduğu dikkate alındığında sadece iki türle temsil edilen bu cinse ait oldukları düşünülen termofilik izolatların bu cinsin diğer üyesi olan *Anoxybacillus pushchinoensis* (Pikuta vd., 2000) ile de DNA-DNA homolojisi açısından karşılaştırılması gerektiği düşünüldü ve yapılan diğer bir DNA-DNA hibridizasyonu çalışmasında ilk olarak *Anoxybacillus flavithermus* olmadığına karar verilen termofilik izolatlar birbirleriyle

karşılaştırıldı. Yapılan bu karşılaştırma sonucunda A4 nolu izolata A7 nolu izolata % 88,2, G2 nolu izolata ise % 82,3 ve A7 nolu izolata G2 nolu izolata % 77,9 oranında benzer olduğu ve daha öncede belirtildiği gibi Wayne ve arkadaşlarının (1987) görüşü dikkate alındığında bu üç izolata aynı tür bakterinin farklı şuşları olduğuna karar verildi. Ayrıca yapılan bu karşılaştırma sonucunda A8 ve K4 nolu izolatların ise A4, A7 ve G2 nolu izolatların oluşturduğu bakteri türüne benzerlik oranlarının % 50'nin altında olduğu ve bu türden farklı birer bakteri türü oldukları görülmektedir. Ayrıca DNA-DNA homolojisi açısından birbirlerinin aynı türü olduğu belirlenen G2, A4 ve A7 izolatlarından biri olan G2 bu grup bakterilerin tip suşu olarak seçildi ve G2 nolu izolat *Anoxybacillus* cinsinin diğer bir türü olan *Anoxybacillus pushchinoensis* ile DNA-DNA homolojisi açısından karşılaştırıldı. Ayrıca G2 ve onun ait olduğu bakteri grubundan farklı olduğu tespit edilen A8 ve K4 nolu izolatlarda *Anoxybacillus pushchinoensis* ile DNA-DNA homolojisi açısından karşılaştırıldılar. Tablo 8'da görüldüğü gibi A8 nolu izolat *Anoxybacillus pushchinoensis*'e % 76,7 oranında benzerken, G2 nolu izolat *Anoxybacillus pushchinoensis*'e % 45 oranında ve K4 nolu izolat ise *Anoxybacillus pushchinoensis*'e % 42,9 oranında benzemektedir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, A8 nolu izolata *Anoxybacillus pushchinoensis* türüne ait yeni bir suş olduğu, G2 ve K4 nolu izolatların ise bu türe ait suşlar olmadığı görülmektedir.

Yapılan bütün morfolojik, fizyolojik, kemotaksonomik, genetiksel ve DNA-DNA homolojisi çalışmaları sonucunda *Anoxybacillus flavithermus* ve *Anoxybacillus pushchinoensis* türlerinden birine ait türler olmadıkları kesin olarak ortaya çıkarılan G2 ve K4 nolu izolatların literatürlerde bulunmayan ve *Anoxybacillus* cinsine ait olan yeni bakteri türleri olduğuna karar verildi. Yeni bakteri türleri olduğuna karar verilen G2 nolu izolata izole edildiği Gönen kaplıcasının ismine atfen, *Anoxybacillus gonensis* ismi verilirken, Kestanbol kaplıcasından izole edilen K4 nolu bakteriye ise yine bu kaplıcanın ismine atfen *Anoxybacillus kestanbolinensis* adı verildi.

*Anoxybacillus* cinsine ait olan termofilik izolatların sınıflandırılmasında 16S rRNA gen dizin analizi, çok başarılı sonuçlar vermemesine rağmen elde edilen diğer termofilik izolatların sınıflandırılmasında ise doğru sistematik yapılmasını sağladı. Daha önce de belirtildiği gibi sistematik otoriteleri, 16S rRNA gen dizin analizinin cinslerin ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayırımında kullanıldığında doğru sonuçları verdiğini önermektedirler. Bu nedenle 16S rRNA gen dizilerinin benzer olduğu bakteri türleri ve elimizdeki termofilik izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal



özellikleri karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmalar neticesinde birbirlerine benzer olduğu düşünülen tip suşlar ve izole edilen termofilik izolatlar arasında benzerlik olduğu görüldü.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda, A1 nolu izolatın genel olarak bakıldığında Gram (+) hücre duvarına sahip, spor oluşturabilen, katalaz üretebilen, jelatini ve nişastayı parçalayabilen, Voges Proskauer pozitif, sitrat ve propiyonatu karbon kaynağı olarak kullanabilen, nitratı nitrite indirgeyebilen, indol negatif, % 7 NaCl içeren besiyerde büyüeyebilen, büyüme sıcaklığı 30 ile 70 °C arasında değişen bir izolat olduğu gözlemlendi. Bu özellikler ve 16S rRNA gen dizisi bakımından *Bacillus licheniformis*'e olan % 97'lik benzerlik dikkate alındığında A1 izolatının bu türe ait bir suş olduğuna karar verildi.

Elde edilen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal sonuçlar karşılaştırıldığında A3, K3 ve K5 nolu izolatların birbirlerine benzer oldukları görüldü. Yapılan 16S rRNA gen dizisi analizi sonucunda bu her üç izolatın da *Bacillus thermosphaericus*'a % 99 oranında benzer olduğu görüldü. *Bacillus thermosphaericus* bakterisi Andersson ve arkadaşları (1995) tarafından havadan izole edilmiş bir termofilik bakteridir. Bizim çalışmamızda ise bu bakteri kaplıca suyundan izole edilmiştir. Elimizdeki A3, K3 ve K5 nolu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve yağ asidi analizi sonuçlarını *Bacillus thermosphaericus*'la karşılaştırdığımızda birbirine benzer özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Tablo 4'den görüldüğü gibi her üç termofilik izolat test edilen hiçbir karbohidratı kullanmamakta, jelatini ve nişastayı hidroliz etmemekte sadece üreyi kullanmaktadır ve *Bacillus thermosphaericus*'a bakıldığında bu bakterinin de benzer özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca bu her üç izolat ve *Bacillus thermosphaericus*'un yağ asidi içerikleri karşılaştırıldığında benzer bir şekilde ana yağ asidi olarak C<sub>16:0</sub> izo ve C<sub>15:0</sub> izo yağ asidlerini ihtiva ettikleri görülmektedir. Bütün bu özellikler ve 16S rRNA gen dizisi analizi karşılaştırma sonuçları dikkate alındığında A3, K3 ve K5 nolu izolatların *Bacillus thermosphaericus* türüne ait suşlar olduğuna karar verildi.

16S rRNA gen dizisi analizi karşılaştırma sonuçları dikkate alındığında Gönen kaplıcasından izole edilen G1 nolu izolatın *Bacillus thermoleovarans* bakterisine % 99 oranında benzer olduğu görülmektedir. G1 nolu izolat ve *Bacillus thermoleovarans* bakterisi karşılaştırıldığında her ikisinin de katalaz ve jelatinaz pozitif olduğu, nişastayı hidroliz edebildiği, propionatu karbon kaynağı olarak kullanabildiği, nitratı nitrite indirgeyebildiği ve % 4'e kadar NaCl'ye karşı toleranslı olduğu görülmektedir. Bu

özellikleri dikkate alındığında G1 nolu izolatin *Bacillus thermoleovarans* bakterisine ait bir suş olduğu görülmektedir.

16S rRNA gen dizisi analizi karşılaştırma sonuçları dikkate alındığında Kestanbol kaplıcasından izole edilen TK4 nolu termofilik izolatin *Saccharococcus caldoxylosilyticus* bakterisine % 98 oranında benzer olduğu görüldü. Ayrıca Tablo4’de görülen fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal özellikleri dikkate alındığında bu izolatin *Saccharococcus caldoxylosilyticus* bakterisine ait bir suş olduğu düşünüldü. Ancak bu izolatin tam ve kesin tür tayininin yapılabilmesi amacıyla *Saccharococcus caldoxylosilyticus* bakterisi ile DNA-DNA hibridizasyonu yapıldı. Yapılan bu hibridizasyon neticesinde Tablo 8’da görüldüğü gibi her iki bakterinin DNA-DNA homolojisi açısından benzerliğinin % 79,8 olduğu görüldü. Bu sonuç ve Wayne ve arkadaşlarının (1987) görüşleri dikkate alındığında TK4 suşunun kesinlikle *Saccharococcus caldoxylosilyticus* bakterisine ait yeni bir suş olduğuna karar verildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda dünya literatürüne *Anoxybacillus* cinsine ait iki adet yeni bakteri türü kazandırılmıştır. Bu yeni türler *Anoxybacillus gonensis* ve *Anoxybacillus kestanbolinensis* olarak adlandırılmıştır. Ayrıca Diyadin kaplıcasından izole edilen A2, A4, A5, A6, A7, A9 nolu izolatlardan *Anoxybacillus gonensis* türünün suşları olduğu, Kestanbol kaplıcasından izole edilen K1 ve K2 nolu izolatlardan ise *Anoxybacillus kestanbolinensis* türüne ait suşlar olduğuna karar verildi. Ayrıca Ağrı Diyadin Kaplıcasından izole edilen A1 nolu izolatin *Bacillus licheniformis* türüne, A8 nolu izolatin ise *Anoxybacillus pushchinoensis* türüne ait yeni birer suş olduğu, Diyadin ve Kestanbol kaplıcalarından izole edilen A3, K3 ve K5 nolu izolatlardan ise *Bacillus thermosphaericus* türüne ait suşlar olduğuna karar verildi. Ayrıca Gönen kaplıcasından izole edilen G1 nolu izolatin *Bacillus thermoleovarans* türüne, Kestanbol kaplıcasından izole edilen TK4 nolu izolatin ise *Saccharococcus caldoxylosilyticus* bakterisine ait yeni birer suş oldukları görüldü. Yapılan bu çalışma sonucunda, bakteri sistematğinde rutin olarak kullanılan fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal bulguların sistematik açıdan sadece ön bilgiler verdiği, daha kesin ve doğru sonuçların alınması için bu bulguların kemotaksonomik ve genetiksel testlerle kesinlikle desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kestanbol Kaplıcasından izole edilen ve maksimum büyüme sıcaklığı 75 °C’nin üzerinde olan TK4 nolu bakterinin DNA polimeraz geninin sırasının ortaya çıkarılması amacıyla tasarlanmış dejenere primerler ile bu genin 3’ ucuna yakın bölgesinden yaklaşık 700 bp’lik bir kısmın sırası belirlendikten sonra invers PCR yöntemi de dahil olmak üzere

Southern blotting yöntemi, sırası bilinen bölgenin PCR ile çoğaltılarak 3' uçlarına poli-C kuyruklarının ilave edilmesi, Gen Bankasında var olan DNA polimeraz enzimlerinin sıralarından faydalanılarak bu genin baş ve son kısımlarına göre tasarlanmış primerlerle yapılan PCR'ı da içine alan bir dizi yöntem kullanılarak genin geri kalan kısımları elde edilmeye çalışıldı. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda invers PCR metoduyla sadece yaklaşık 180 bp'lik bir gen bölümünün daha sırası ortaya çıkarılabildi. Bu metodun çok başarılı olamayışının nedeni halen anlaşılamadı. Çünkü yapılan Southern Blotting çalışması sonucunda TK4 genom DNA'sının *EcoR* V ile kesimi neticesinde oluşan DNA parçalarının işaretli 700 bp'lik TK4 DNA polimeraz probu ile hibridizasyonu sonucunda DNA polimeraz geninin yaklaşık 3000 bp'lik bir parça içinde olduğu, TK4 genom DNA'sının *EcoR* I ile kesilmesi sonucunda ise oluşan DNA fragmentlerinin işaretli 700 bp'lik TK4 DNA polimeraz probu ile hibridizasyonu sonucunda DNA polimeraz geninin yaklaşık 5000 bp civarında bir parça içinde olduğu görüldü. Bu parçalarının uzunluklarına bakıldığında bunların büyüklüklerinin ne herhangi bir vektöre klonlamak için, ne de invers PCR ile genin geri kalan kısımlarının elde edilmesi için çok büyük olmadığı, yapılan çalışmaların sonuç vermesi gerektiği düşünülmektedir. DNA polimeraz geninin klonlanması sırasında kullanılan Southern blotting yönteminin sonuç vermemesinin bir nedeninin, elde edilen klonların Slot blot hibridizasyonla taranması sırasında genel olarak pozitif sinyal vermesidir. Bu sonucun alınmasının nedeninin DNA polimeraz enzimini kodlayan genin *E. coli*'de dahil olmak üzere bütün hücrelerde var olması ve belli bir oranda korunmuş bir tabiata sahip olmasıdır. Böylece plazmidlerin izolasyonu sırasında azda olsa ortama karışmış olan genomik kaynaklı DNA polimeraz genleri proba reaksiyona girmekte ve pozitif sinyal oluşturmaktadır. Ancak bu metotlar ve klonlama denemeleri üzerinde uzun süre çalışılmasına rağmen halen daha olumlu bir sonuç alınamamıştır ve genin klonlanması üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Ksiloz (glukoz) izomeraz, ksilozun ksiluloza, glukozun fruktoza dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. Enzimin bu özelliğinden faydalanılarak gıda sanayiinde fruktozlu tatlandırıcılar elde edilmektedir (Meng vd., 1993). Daha önceki bölümlerde de bahsedilen nedenlerden dolayı bu işlemin meydana getirilmesinde termofilik enzimlerin kullanılması mezofilik enzimlere göre daha kullanışlıdır. Son zamanlarda termofilik ksiloz izomerazlar üzerine yapılan çalışmalara sıkça rastlanmaktadır. Ahmad ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada yüksek ksiloz izomeraz aktivitesine sahip bir bakteri olan *Saccharococcus caldxylosilyticus* izole edildi. Yapılan bu çalışmada, *Saccharococcus*

*caldoxylosilyticus* bakterisinin glukozu karbon kaynağı olarak kullandığında 0,6 ünitelik bir glukoz izomeraz aktivitesine sahip olduğunu, ksilozu karbon kaynağı olarak kullandığında ise 0,8 ünitelik bir ksiloz izomeraz aktivitesine sahip olduğu ortaya konuldu. G2 bakterisi üzerinde yapılan çalışmada Tablo 11'de görüldüğü gibi glukozun karbon kaynağı olarak kullanımında 0,5 ünitelik bir aktivite görülürken, ksilozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumda ise 0,78 ünitelik bir aktivitenin olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar ve literatürler karşılaştırıldığında G2 bakterisinin *S. caldoxylosilyticus* gibi yüksek bir ksiloz (glukoz) izomeraz aktivitesine sahip olduğu görülmektedir.

Mikroorganizmalar fenolik bileşiklerin mineralizasyonunda ve yıkımında önemli bir rol oynarlar. Bu parçalanma işleminde mezofilik bakterilerin rolü üzerinde pekçok çalışma bulunmasına rağmen termofilik bakterilerin bu parçalama işlemindeki rolleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Çok sayıdaki termofilik *Bacillus* türünün fenol ve kresol gibi maddeleri parçalayabildiği bilinmektedir (Adams ve Ribbons, 1988; Buswell ve Twomey, 1975; Gurujeyalakshmi ve Oriel, 1989). Aynı zamanda literatürler incelendiğinde *Bacillus thermoleovarans* bakterisinin fenol ve benzeri türevli maddeleri karbon kaynağı olarak kullanabilen bazı suşlarının olduğu görülmektedir (Duffner ve Müller, 1998). Yapılan sistematik çalışmaları sonucunda G1 izolatının *Bacillus thermoleovarans* türüne ait bir suş olduğu ve fenolü karbon kaynağı olarak kullanım testlerinde bu suşun fenollü minimal agar besiyerinde büyüebildiği gözlemlendi. Bu özellikler dikkate alındığında G1 nolu izolatın çevre kirliliği açısından fenolik maddelerin parçalanmasında önemli bir suş olduğu ve içerdiği fenol parçalayıcı enzimlerin ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerektiği görülmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, Ağrı Diyadin, Çanakkale Kestanbol ve Balıkesir Gönen kaplıcalarının termofilik bakteri floraları belirlendi.

Su örneklerinin filtreden geçirilmesi suretiyle ve yapılan zenginleştirme kültürleri sonucunda birbirlerinden farklı olduğu düşünülen onyediyedi adet termofilik izolat seçildi. Uygulanan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve genetiksel testler sonucunda A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, K1, K2, K3, K4, K5, TK4, G1 ve G2 nolu izolatlardan tür tayinleri yapıldı. Yapılan tür tayinleri sonucunda Gönen kaplıcasından izole edilen G2 nolu termofilik izolatın *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir termofilik bakteri türü olduğu belirlendi ve bu izolat *Anoxybacillus gonensis* olarak adlandırıldı. Diyadin kaplıcasından izole edilen A2, A4, A5, A6, A7 ve A9 nolu termofilik izolatlardan *Anoxybacillus gonensis*'e ait suşlar olduğu ortaya çıkarıldı.

Aynı şekilde Kestanbol kaplıcasından izole edilen K4 nolu termofilik izolatın *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir bakteri türü olduğu ortaya çıkarıldı. Yeni bir tür olduğu tespit edilen bu izolat *Anoxybacillus kestanbolinensis* olarak adlandırıldı ve aynı kaplıcadan izole edilen K1 ve K2 nolu izolatlardan ise bu türe ait suşlar oldukları belirlendi.

Ayrıca Diyadin kaplıcasından izole edilen A1 nolu izolatın *Bacillus licheniformis*, A8 nolu izolatın *Anoxybacillus pushchinoensis*, Diyadin kaplıcasından izole edilen A3 ve Kestanbol kaplıcasından izole edilen K3 ve K5 nolu izolatlardan *Bacillus thermosphaericus*, Kestanbol kaplıcasından izole edilen TK4 nolu izolatın *Saccharococcus caldoolyolyticus* ve Gönen kaplıcasından izole edilen G1 nolu izolatın ise *Bacillus thermoleovorans* bakterilerine ait yeni suşlar olduğuna karar verildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda bakteri tür tayininde son zamanlarda kullanılan tüm genetiksel testlerin kullanılması ile dünya literatürüne iki adet yeni bakteri türü ve 15 adet yeni bakteri suşu kazandırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda *Saccharococcus caldoolyolyticus* bakterisinin DNA polimeraz geninin bir bölümünün sırası ortaya çıkarılmış olup bu gen üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca *Anoxybacillus gonensis* bakterisinin ksiloz (glukoz) izomeraz aktivitesi ortaya çıkarılmıştır.

## 6. ÖNERİLER

Kaplıcalardan izole edilen bakterilerden *Anoxybacillus gonensis* ve *Anoxybacillus kestanbolinensis* yeni bakteri türleri olduğundan bunların içerdiği ısıya dayanıklı enzimlerin araştırılması sonucunda yeni ısıya dayanıklı enzimlerin ortaya çıkarılması ve bu enzimlerin bilimin ve endüstrinin hizmetine sunulması düşünülmektedir.

Bu amaçla, ilk olarak ksilozu karbon kaynağı olarak kullanabilen *Anoxybacillus gonensis* bakterisinin içerdiği ısıya dayanıklı ksiloz izomeraz enziminin aktivitesi araştırıldı ve yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bundan sonra yapılacak olan daha detaylı çalışmalarda bu enzimi kodlayan genin baz dizisinin ortaya çıkarılıp, daha yüksek bir aktivitenin ortaya çıkarılması için yapılması gerekli olan mutasyonlar üzerinde çalışılması gerekmektedir.

Kestanbol kaplıcasından izole edilen TK4 nolu termofilik izolatın *Saccharococcus caldoolyolyticus* bakterisine ait yeni bir suş olduğu ortaya çıkarıldı. Ayrıca klonlama çalışmaları sonucunda bu bakterinin içerdiği termofilik DNA polimeraz geninin bir bölümü ortaya çıkarılabildi. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda bu genin geri kalan kısımlarının ortaya çıkarılması ve genin *E. coli*'ye aktarılıp tam olarak ekspresyonunun ve enzim karakterizasyonunun yapılması planlanmaktadır.

Literatürler incelendiğinde *Bacillus* cinsine ait çok sayıdaki mezofilik ve termofilik bakteri türünün çevre kirliliği açısından önemli bir tehlike olan fenol ve benzeri maddeleri parçalayabildiği görülmektedir. Yapılan ön çalışmada Gönen kaplıcasından izole edilen *Bacillus thermoleovorans* bakterisinin fenolik maddeleri parçalayıp karbon kaynağı olarak kullanabildiği görüldüğünden bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda bu bakterinin fenolik maddelerin parçalanmasında rol oynayan enzimleri üzerinde daha ayrıntılı çalışılmaların yapılmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

Ayrıca bu çalışmada izole edilen termofilik izolatlar literatürler açısından yeni bakteri tür veya suşları olduğundan bu bakterilerin içerdiği tüm ısıya dirençli enzimlerin özellikle karbohidratların modifikasyonunda ve parçalanmasında rol oynayan lipazlar, amilazlar, pullulanazlar, sellülozlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar gibi çok değişik enzimler açısından araştırılmalarının uygun olacağı görüşündeyiz.

## 7. KAYNAKLAR

- Abel, K., De Schmertzing, H., Peterson, J.I., 1963, Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition. Feasibility of Utilizing Gas Chromatography, J. Bacteriol., 85, 1039-1044.
- Adams, D., Ribbons, D.W., 1988, The Metabolism of Aromatic Compounds by Thermophilic Bacilli, Appl. Biochem. Biotechnol., 17, 231-244.
- Adamsen, A. K., Lindhagen, J., Ahring, B. K., 1995, Optimization of Extracellular Xylanase Production by *Dictyoglomus* sp. B1 in Continuous Culture, Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 327-332.
- Aguilar, A., 1996, Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations, FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Ahmad, S., Scopes, R.K., Rees, G.N., Patel, B.K.C., 2000, *Saccharococcus caldoxylosilyticus* sp. nov., an Obligately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 517-523.
- Amelunxen, R.E., Lins, M., 1968, Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125, 765-771.
- Andersson, M., Laukkanen, M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Rainey, F.A., Niemela, Salkinoja-Salonen, M., 1995, *Bacillus thermosphaericus* sp. nov. A New Thermophilic Ureolytic *Bacillus* Isolated from Air, Syst. Appl. Microbiol., 18, 203-220.
- Anonim, 1994, Maden Suyu Analiz Raporu, T.C. İstanbul Üniversitesi Tıbbi Ekoloji ve Hidro-Klimatoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul.
- Asakura, K., Komatsubara, H., Soga, S., Yomo, T., Oka, M., Emi, S., Urabe, I., 1993, Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of DNA Polymerase Gene (*polA*) from *Thermus thermophilus* hb8, J. Ferment. Bioeng., 76, 265-269.
- Ash, C., Farrow, A. E., Wallbanks, S., 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.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., Aragno, M., 1996, Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C), Appl. Environ. Microbiol., 62, 1723-1727.

- Belduz, A. O., Lee, E. J., 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.
- Benson, H.J., 1985, Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, fourth Edition, Wm C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa.
- Bradford, M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Braithwhite, D.K., Ito, J., 1993, Compilation, Alignment and Phylogenetic Relationships of DNA Polymerases, Nuc. Acids. Res., 21, 787-802.
- Brock, T.D., Brock, M.L., Bott, T.L., Edward, M.R., 1971, Microbial Life at 90°C: The Sulfur Bacteria of Boulder Spring, J. Bacteriol., 190, 303-314.
- Brock, T.D., Freeze, H., 1969, *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile, J. Bacteriol., 98, 289-297.
- Brock, T.D., 1985, Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Brock, T.D., 1986, Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T. D., Ed., John Wiley and Sons, New York.
- Busse, J., Auling, G., 1988, Polyamine Pattern as a Chemotaxonomic Marker within the *Proteobacteria*, Syst. Appl. Microbiol., 11, 1-8.
- Buswell, J.A., Twomey, G., 1975, Utilization of Phenol and Cresols by *Bacillus stearothermophilus*, strain PH24, J. Gen. Microbiol., 87, 377-379.
- Cappuccino, J.G., Sherman, N., 1992, Microbiology: a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman, L.V., Moore, W.E.C., 1982, Electroforetic Study of *Clostridium* Species, J. Clin. Microbiol., 15, 688-702.
- Chester, F.D. 1901, A Manual of Determinative Bacteriology, The Macmillan Co., New York.
- Colacino, F., Crichton, R.R., 1997, Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 14, 211-277.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L., Sorlini, C., 1998, PCR Fingerprinting of Whole Genomes: the Spacers Between the 16S and 23S rRNA Genes and of Intergenic tRNA Gene Regions Reveal a Different Intraspecific Genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 107-116.



- Das, R., Gerstein, M., 2000, The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics, 1, 76-88.
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A., 1970, The Quantitative Measurement of DNA Hybridization from Renaturation Rates, Eur. J. Biochem., 12, 133-142.
- Demhanter, W., Hensel, R., 1989, *Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a New Thermophilic Species from Sewage Sludge, Syst. Appl. Microbiol., 11, 272-276.
- Duffner, F.M., Müller, R.A., 1998, Novel Phenol Hydroxylase and Catechol 2,3-Dioxygenase from the Thermophilic *Bacillus thermoleovorans* Strain A2: Nucleotide Sequence and Analysis of the Genes, FEMS Microbiol. Lett., 161, 37-45.
- Dülger, S., 1997, Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Endo, S., 1962, Studies on Protease Produced by Thermophilic Bacteria, Ferment. Technol., 40, 346-351.
- Erişen, B., Akkuş, İ, Uygur, N., Koçak, A., 1996, Türkiye Jeotermal Envanteri, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Escara, J.F., Hutton, J.R., 1980, Thermal Stability and Renaturation of DNA in Dimethyl Sulphoxide Solutions: Acceleration of the Renaturation Rate, Biopolymers, 19, 1315-1327.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P.J.R., 1992, How Close is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient to Guarantee Species Identity, Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 1, 166-170.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tümmler, B., Römling, U., 1997, Genome Organization of *Pseudomonas stutzeri* and Resulting Taxonomic and Evolutionary Considerations, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 132-143.
- Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., 1993, Root of Bacterial Systematics. Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Gray, M.W., Sankoff, D., 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.
- Grimm, E., Arbuthnot, P., 1995, Rapid Purification of Recombinant *Taq* DNA Polymerase by Freezing and High Temperature Thawing of Bacterial Expression Cultures, Nuc. Acids Res., 23, 4518-4519.
- Grupta, M., 1995, Thermostability of Enzymes, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

- Guagliardi, A., Martino, M., Iaccarino, I., de Rosa, M., Rossi, M., Bartolucci, S., 1996, Purification and Characterization of the Alcohol Dehydrogenase from a Novel Strain of *Bacillus stearothermophilus* Growing at 70°C, Int. J. Biochem. Cell Biol., 28, 239-246.
- Gueguen, Yannick, Rolland, J.I., Lecompte, O., Azam, P., Romancer, G.L., Flament, D., Raffin, J.P., Dietrich, J., 2001, Characterization, of two DNA Polymerases from the Hyperthermophilic Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*, Eur. J. Biochem., 268, 5961-5969.
- Gurujeyalakshmi, G., Oriel, P., 1989, Isolation of Phenol-Degrading *Bacillus stearothermophilus* and Partial Characterisation of the Phenol Hydroxylase, Appl. Environ. Microbiol., 55, 500-502.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., Olsen, G., 1999, Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Heinen, W., Lauwers, A.M., Mulders, J.W.M., 1982, *Bacillus flavothermus*, a Newly Isolated Facultative Thermophile, Antonie van Leeuwenhoek, 48, 265-272.
- HuB, V.A.R., Festl, H., Schleifer, K.H., 1983, Studies on the Spectrophotometric Determination of DNA Hybridization from Renaturation Rates, Syst. Appl. Microbiol., 4, 184-192.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y., 1998, Alkaline Detergent Enzymes from Alkaliphiles: Enzymatic Properties, Genetics and Structures, Extremophiles, 2, 185-190.
- Jaenicke, R., Bohm, G., 1998, The Stability of Proteins in Extreme Environments, Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 738-748.
- Johnson, J.L., 1986, Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Jung, S.E., Choi, J.J., Kim, H.K., Kwon, S.T., 1997, Cloning and Analysis of the DNA Polymerase-Encoding Gene from *Thermus filiformis*, Mol. Cells, 7, 769-776.
- Kahler, M., Antranikian, G., 2000, Cloning and Characterization of a Family B DNA Polymerase from the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*, J. Bacteriol., 182, 655-663.
- Koffler, H., 1957, Protoplasmic Differences Between Mesophiles and Thermophiles, Bacteriol. Rev., 21, 227-232.
- Kong, H., Kucera, R.B., Jack, W.E., 1993, Characterization of a DNA Polymerase from the Hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA Polymerase,

Steady State Kinetics, Thermal Stability, Processivity, Strand Displacement, and Exonuclease Activities, J. Biol. Chem., 268, 1965-1975.

Kornberg, A., Baker, T.A., 1992, DNA Replication, Second Edition, W.M. Freeman, New York.

Kristjansson, J.K., Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes, Trends Biotechnol., 7 (1989) 349.

Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1992, Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J.K., CRC Press, Boca Raton.

Laemli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of the Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985, Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetics Analysis, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 6955-6959.

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Sakikiş, R.K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D.H., 1989, Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the DNA Polymerase Gene from *Thermus aquaticus*, J. Biol. Chem. 264, 6427-6437.

Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M., Zeikus, G., 1990, Catalytic Mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*, J. Biol. Chem. 265, 19082-19090.

Lee, K.Y., Wahl, R., Barbu, E., 1956, Contenu en Bases Purique et Pyrimidiques des Acides Deoxyribonucleiques des Bacteries, Ann. Inst. Pasteur, 91, 212-224.

Louws, F.J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., 1996, Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples, Toranzos G., Ed., Technomic Publishing Co. New York.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.-H., 1998, Bacterial Phylogeny Based on Comparative Sequence Analysis, Electrophoresis, 19, 554-568.

Lupski, J.R., Weinstock, G.M., 1992, Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes, J. Bacteriol., 174, 4525-4529.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2000, Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., New Jersey.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York.

Matsumura, M., Katakura, Y., Imanaka, T., Aiba, S., 1984, Enzymatic and Nucleotide Sequence Studies of a Kanamycin-Inactivating Enzyme Encoded by a Plasmid from

- Thermophilic Bacilli in Comparison with That Encoded by Plasmid pUB110, J. Bacteriol., 160, 413-420.
- Meng , M., Bagdasarian, M., Zeikus, J.G., 1993, Thermal Stabilization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, Biotecnol., 11, 1157-1161.
- Miquel, P., 1888, Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C, Ann Micrographic, 1, 3.
- Moon, I.S., Krause, M.O., 1991, Common RNA Polymerase I, II, and III Upstream Elements in Mouse 7SK Gene Locus Revealed by the Inverse Polymerase Chain Reaction, Cell Biol., 10, 23-32.
- Mullis, K., Faloona, F., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H., 1986, Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 247, 7116-7122.
- Mylvaganam, S., Dennis, P.P., 1992, Sequence Heterogeneity Between the two Genes Encoding 16S rRNA from the Halophilic Archaeobacterium *Haloarcula marismortui*, Genetics, 130, 399-410.
- Niehaus, F., Frey, B., 1997, Antranikian, G., Cloning and Characterisation of a Thermostable  $\alpha$ -DNA Polymerase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* sp. TY, Gene, 204, 153-158.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996, Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis, J. Bacteriol., 178, 5636-5643.
- O'Leary, W.M., Wilkinson, S.G., 1988, Microbial Lipids, Volume 1, Ratledge, C., Wilkinson, S.G., Eds., Academic Press, London.
- Palleroni, N. J., 1993, Structure of Bacterial Genome, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd, London.
- Pereira, R.A, Graham, D., Rainey, F.A., Cowan, D.A., 1998, A Novel Thermostable Nitrile Hydratase, Extremophiles, 2, 347-357.
- Phang, S.M., Teo, C.Y., Lo, E., Wong Thi Wong, V., 1995, Cloning and Complete Sequence of the DNA Polymerase-Encoding Gene (BstpolI) and Characterisation of the Klenow-Like Fragment from *Bacillus stearothermophilus*, Gene, 163, 65-68.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G., 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.

- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989, Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate, Lett. Appl. Microbiol., 8, 151-156.
- Priest, F.G., 1984, Extracellular Enzymes, Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd. Wokingham, Berkshire, England.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A., Mozo-Villarians, A., 1996, Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Eng., 9, 265-271.
- Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1993, Phylogenetic Analysis for the Relationship of *Saccharococcus thermophilus* to *Bacillus stearothermophilus*, Syst. Appl. Microbiol., 16, 224-226.
- Rainey, F. A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994, The Phylogenetic Diversity of Thermophilic Members of the Genus *Bacillus* as Revealed by 16S rDNA Analysis, FEMS Microbiol Lett., 115, 205-212.
- Relman, D.A., Schmidt, T.M., MacDermott, R.P., Falkow, S., 1992, Identification of the Uncultured *Bacillus* of Whipple's Disease, N. Engl. J. Med., 327, 293-301.
- Russell, R.J.M., Taylor, G.L., 1995, Engineering Thermostability: Lessons from Thermophilic Proteins, Curr. Opin. Biotechnol., 6, 370-374.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P.C., 1998, Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie., 80, 933-941.
- Schleifer, K. H., Kandler, O., 1972, Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications, Bacteriol. Rev., 36, 143-187.
- Schleifer, K.H ve Stackebrandt, E., 1983, Molecular Systematics of Prokaryotes, Ann. Rev. Microbiol., 37, 143-187.
- Sharp, R.J., Riley, P.W., White, D., 1992, Heterotrophic Thermophilic Bacilli, Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J.K., Ed., CRC Press, Boca Raton.
- Sherlock Microbial Identification System (Version 4.0), MIS Operating Manual, 145 pp, MIDI, Inc, Newark, DE, USA.
- Sneath, A.P., 1986, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S., Holt, J.G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Spink, C.H., Chaires, J.B., 1999, Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA, Biochemistry, 38, 496-508.
- Stackebrandt, E., Goodfellow, M., 1991, Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Chichester, John Wiley and Sons.
- Stackebrandt, E., 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.

- Strobel, S.A., Dervan, P.B., 1990, Site-Specific Cleavage of a Yeast Chromosome by Oligonucleotide-Directed Triple-Helix Formation, Science, 249, 73-75.
- Suzuki, K., Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., 1993, Cell Envelopes and Classification, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Şahin, F., 2001, Computer-Aided System for Cellular Fatty Acid Analysis in Identification of Microorganisms Isolated from Environmental, Industrial and Clinical Samples, Proceedings of the 1<sup>st</sup> Eurasian Congress on Molecular Biotechnology, 1, 253-256.
- Tamaoka, J., 1994, Determination of DNA Base Composition, Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., John Wiley and Sons, Chichester.
- Tenover, F.C., Arbeit, R. D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995, Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, J. Clin. Microbiol., 33, 2233-2239.
- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., Ishino, Y., 1997, A Novel DNA Polymerase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*: Gene Cloning, Expression, and Characterization., Genes Cells, 2, 499-512.
- Uemori, T., Ishino, Y., Fujita, K., Asada, K., Kato, I., 1993, Cloning of the DNA Polymerase Gene of *Bacillus caldotenax* and Characterization of the Gene Product, J. Biochem., 113, 3, 401-410.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Swings, J., 1996, Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J., 2000, Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*, Phytopathology, 90, 677-682.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijin, F.J., Lupski, J.R., 1994, Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence Based PCR (rep-PCR), Meth. Cell. Mol. Biol., 5, 25-40.
- Vieille, C., Burdette, D.S., Zeikus, J.G., 1996, Thermozyms, Biotechnol. Ann. Rev., 2, 1-83.
- Vogt, G., Argos, P., 1997, Protein Thermal Stability: Hydrogen Bonds or Internal Packing?, Folding Design, 2, 40-46.
- Vogt, G., Woell, S., Argos, P., 1997, Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Watanabe, K., Oshima, T., Nishimura, S., 1976, CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nuc. Acids. Res., 3, 1703-1713.

- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimon, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebract, E., Starr, M.P., Trüper, H.G., 1987, Report of The *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 463-464.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers, Nuc. Acids Res., 18, 6531-6535.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990, Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 4576.
- Wunschel, D., Fox, K. F., Black, G. E., Fox, A., 1994, Discrimination Among *B. cereus* Group, in Comparison to *B. Subtilis*, by Structural Carbohydrate Profiles and Ribosomal RNA Spacer Region, Syst. Appl. Microbiol., 17, 625-635.
- Yoon, J.H, Lee, S.T., Kim, S.B., Goodfellow, M., Park, Y.H., 1997, Inter- and Intraspecific Genetic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S Ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA Internally Transcribed Spacer Sequences, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 661-669.
- Zarilla, K.A., Perry, J.J., 1987, *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a Species of Obligately Thermophilic Hydrocarbon Utilizing Endospore-Forming Bacteria, Syst. Appl. Microbiol., 9, 258-264.

## 8. EKLER

### Ek 1. A1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz sayısı: 1269

Baz içeriği: 316 A 301 C 393 G 259 T

Gen Bankası No: AY248716

```
GGAGCTTGCT CCCTTAGGTC AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGTTA
ACCTGCCTGT AAGACTGGGA TAACTCCGGG AAACCGGGGC TAATACCGGA
TGCTTGATTG AACCGCATGG TTCAATCATA AAAGGTGGCT TTCAGCTACC
ACTTACAGAT GGACCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC
ACCAAGGCGA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCCACTGG
GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC
CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTT
TTCGGATCGT AAAACTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAC CGTTCGAATA
GGGCGGCACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC
CAGCAGCCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGCCGG AATTATTGGG
CCTTAAAGCC CCCCAGGCC GGTTCCTAAA GCTTGATGTG AAAGCCCCCG
GTTCAACCGG GGAGGGGTCA TTTGGAACT GGGGAACTTG AGTGCAGAAG
AGGAGAGTGG AATTCACGTT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATGTGGAGG
AACACCAGTG GCGAAGGCGA CTCCTCTGGTC TGTAAC TGAC GCTGAGGCC
GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACCCGTAA
CGATAGTGCT AGTGTTAAGG GTTCCCGCCT TTAAGTGTTG CAAGCAAACG
CATTAAAGCAT TCGGCTTGGG AAGTCGGTTG CAAGCTTGAA CTCAGGAAT
TGACGGGGGC CGGCACAAGC GGTGAAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCACG
CGAAGACCCT TACCAGGTCT TGACATCCTC TGACAACCCT AGAGATAGGG
CTTTCCCCTT CGGGGGCAGA GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT
CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTGATC
TTAGTTGCCA GCATTCAGTT GGGCACTCTA AGGTGACTGC CGGTGACAAA
CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA TCATGCCCTT TATGACCTGG
GCTACACACG TGCTACAATG GGCAGAACAA AGGGCAGCGA AGCCGCGAGG
CTAAGCCAAT CCCACAAATC TGTTCTCAGT TCGGATCGCA GTCTGCAACT
CGACTGCGTG AAGCTGGAA
```



## Ek 2. A2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

Baz sayısı: 1376

Baz içeriği: 338 A 335 C 442 G 261 T

Gen Bankası No: AY248706

```

ACGAACGCTG GCGGCGTGCC TAATACATGC AAGTCGAGCG GACGATTCAA
AAGCTTGCTT TTGGATCGTT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGCA
ACCTGCCCTG TAGACGGGGA TAACACCGAG AAATCGGTGC TAATACCGGA
TAATACGGAA GGCCGCATGG TCTTTCGTTG AAAGGCGGCG CAAGCTGTCTG
CTACAGGATG GGCCCGCGGC GCATTAGCTA GTTGGTGAGG TAACGGCTCA
CCAAGGCGAC GATGCGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG CCACACTGGG
ACTGAGACAC GGCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC
GCAATGGACG AAAGTCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGCG AAGAAGGCCT
TCGGGTCGTA AAGCTCTGTT GTTAGGGAAG AACAAGTACC GCAGTCACTG
GCGGTACCTT GACGGTACCT AACGAGGAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA TTATTGGGCG
TAAAGCGCGC GCAGGCGGTT CCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC
AACCCGTGGA GGGTCATTGG AAACGGGGG ACTTGAGTGC AAAAAAGAAA
GCGGAATTCC ACGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATGTG AAGGAACACC
AGTGGCGAAG GCGGCTCTTT TGGTCTGTAA CTGACGCTGA GCGCGGAAAG
CGTGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT
GAGTGCTAAG TGTTAGAGGG TATCCACCCT TTAGTGCTGT AGCTAACGCA
TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGCTCGC AAGAGTGAAA CTCAAAGGAA
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA
CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC CCTGACAACC CGAGAGATCG
GGCGTTCCCC CTTCCGGGGG ACAGGGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT
CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT
CGACCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGCT
AAAAGTCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA
CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGGCGG TACAAAGGGT CGCGAACCCG
CGAGGGGGAG CCAATCCCAA AAAGCCGCTC TCAGTTCGGA TTGCAGGCTG
CAACTCGCCT GCATGAAGCC GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC
CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTG

```

**Ek 3. A3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1373

Baz içeriği: 344 A 330 C 425 G 274 T

Gen Bankası No: AY248714

AACGCTGGCG GCGTGCCTAA TACATGCAAG TCGAGCGAAC CAATTGAAAG  
CCTAGCTTTC ATGAGGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC  
CTGCCCTATA GACTGGGATA ACTCGCGGAA ACGCGTGCTA ATACCGGATA  
ATACATCAAA GTGCATGCTT TGATGTTGAA AGATGGCTCC GCTATCACTA  
TAGGATGGGC CCGCGGCGCA TTAGCTTGTT GGTGGGGTAA CGGCCTACCA  
AGGCGACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT  
GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCACA  
ATGGGCGAAA GCCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGCGAAG AAGGTCTTCG  
GATCGTAAAG CTCTGTTGTA AGGGAAGAAC AAGTGCAGTA GTAACCTGGCT  
GCACCTTGAC GGTACCTTAC TAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA  
GCCCCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA  
AAGCGCGCGC AGGCGGTCTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGCTTAA  
CCCCGGGAGG GTCATTGGAA ACTTGGGAGA CTTGAGTGCA GGAAAAGGAA  
GCCGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC  
AGTGGCGAAG GCGGGCTTCC TGGCCTGTAA CTGACGCTGA GGC CGGAAAG  
CGTGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT  
GAGTGCTAAG TGTTAGGGGG TTTCCACCCC TTAGTGCTGC AGCTAACGCA  
TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGACTGAAA CTCAAAGGAA  
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA  
CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC CGCTGACCGC TATGGAGACA  
TAGCCTTCCC TTCGGGGACA GCGGTGACAG GTGGTGATG GTTGTCTGCA  
GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTG  
TCCTTAGTTG CCATCATTCA GTTGGGCACT CTAAGGAGAC TGCCGTACAA  
ATACGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAAT CATCATGCC CTTATGACCT  
GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGACGGTAC AAACGGTCGC GAAGTCGCGA  
GACGGAGCCA ATCCGAAAA ACCGTTCTCA GTTCGGATTG CAGGCTGCAA  
CTCGCCTGCA TGAAGCCGGA ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCATGCCGC  
GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTG

**Ek 4. A4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz Sayısı: 1427

Baz içeriği: 347 A 351 C 457 G 272 T

Gen Bankası No: AY248707

ATTCTAGAGT TTGATCATGG CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT  
 ACATGCAAGT CGAGCGGACG ATTCAAAGC TTGCTTTTGG ATCGTTAGCG  
 GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGCAACCT GCCCTGTAGA CGGGGATAAC  
 ACCGAGAAAT CGGTGCTAAT ACCGGATAAT ACGAAAGGCC GCATGGTCTT  
 TCGTTGAAAG GCGGCGCAAG CTGTGCTAC AGGATGGGCC CGCGGCGCAT  
 TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GCGGACGATG CGTAGCCGAC  
 CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA  
 CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAG TCTGACGGAG  
 CAACGCCGCG TGAGCGAAGA AGGCCTTCGG GTCGTAAAGC TCTGTTGTTA  
 GGAAGAACA AGTACCGCAG TCACTGGCGG TACCTTGACG GTACCTAACG  
 AGGAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGCGCGCAG GCGGTTCCCTT  
 AAGTCTGATG TGAAAGCCCA CGGCTCAACC GTGGAGGGTC ATTGGAAACT  
 GGGGACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGCGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA  
 ATGCGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCAAGTG CGAAGCGGCT CTCTGGTCTG  
 TAACTGACGC TGAGGCGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC  
 CTGGTAGTCC ACGCCGTAAG CGATGAGTGC TAAGTGTTAG AGGGTATCCA  
 CCCTTTAGTG CTGTAGCTAA CGCATTAAGC ACTCCGCTG GGGAGTACGC  
 TCGCAAGAGT GAAACTCAA GGAATTGACG GGGGCCGCA CAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA GAACCTTACC AGGTCTTGAC  
 ATCCCCTGAC AACCCGAGAG ATCGGGCGTT CCCCCTTCGG GGGGACAGGG  
 TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT  
 AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTCGACCT TAGTTGCCAG CATTAGTTG  
 GGCACCTCTAA GGTGACTGCC GGCTAAAAGT CGGAGGAAGG TGGGGATGAC  
 GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG  
 GCGGTACAAA GGGTCGCGAA CCCGCGAGGG GGAGCCAATC CAAAAAGCC  
 GCTCTCAGTT CGGATTGCAG GCTGCAACTC GCCTGCATGA AGCCGGAATC  
 GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG  
 TACACACCGC CCGTCACACG GTACCAT

**Ek 5. A7 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1355

Baz içeriği: 339 A 325 C 437 G 254 T

Gen Bankası No: AY 248708

GGCGCCCCTA ATACATGCAA GTCGAGCGGA CGATTCAAAA GCTTGCTTTT  
GGATCGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGCAAC CTGCCCTGTA  
GACGGGGATA ACACCGAGAA ATCGGTGCTA ATACCGGATA ACACGAAAGA  
CTGCATGGTC TTTCGTTGAA AGGCGGCGCA AGCTGTCGCT ACAGGATGGG  
CCCGCGGCGC ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCGACGA  
TGCGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG  
CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGACGAA  
AGTCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGCGAG AAGGCCTTCC GGTTCGTAAAG  
CTCTGTTGTT AGGGAAGAAC AAGTACCGCA GTCACTGGCG GTACCTTGAC  
GGTACCTAAC GAGGAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA  
TACGTAGGTG GCAAGCGTTG TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGCGCGCA  
GGCGGTTCCCT TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC CCGTGGAGGG  
TCATTGAAA CTGGGGGACT TGAGTGCAGA AGAAGAGAAG CCGGAATTC  
ACGTGTAGCG GTGAAAATGC GTAGAGATGT GAAGGAACAC CAGTGGCGAA  
GGCGGGCTCT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCGCGAAA GCGTGGGGAG  
CAAACAGGAT TAGATACCCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG ATGAGTGCTA  
AGTGTTAGAG GGTATCCACC CTTTAGTGCT GTAGCTAACG CATTAAGCAC  
TCCGCCTGGG GAGTACGCTC GCAAGAGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG  
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACGCGAAGA  
ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCCCTGACAA CCCGAGAGAT CGGGCGTTCC  
CCCTTCGGGG GGACAGGGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT  
GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTCGACCTTA  
GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG CTAAAAGTCG  
GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT  
ACACACGTGC TACAATGGGC GGTACAAAGG GTCGCGAACC CGCGAGGGGG  
AGCCAATCCC AAAAAGCCGC TCTCAGTTAG GATTGCAGGC TGCAACTCGC  
CTGCATGAAG CCGGAATCGG TAGTAATCGC GGATCAGCGT AAGGGGTATT  
GCAA

**Ek 6. A8 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1380

Baz içeriği: 348 A 327 C 440 G 265 T

Gen Bankası No: AY248715

GACGAACGCT GGCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACGATTCA  
AAAGCTTGCT TTTGAATCGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC  
AACCTGCCCT GTAGACGGGG ATAACACCGA GAAATCGGTG CTAATACCGG  
ATAACACGAA ATGTTCGCATG ACGTTTCGTT GAAAGACGGC GCAAGCTGTC  
GCTACAGGAT GGGCCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC  
ACCAAGGCGA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG  
GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAACTTC  
CGCAATGGAC GAAAGTCTGA TGGAGCAACG CCGCGTGAGC GAAGAAGGCC  
TTCGGGTGCT AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAA CGTAGTAACT  
GGCGTTACTG TGACGGTACC TAACGAGAAA GCCACGGTAA CTACGTGCCA  
GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA TTATTGGGCG  
TAAAGCGCGC GCAGGCGGTT CCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC  
AACCCGTGGA GGGTCATTGG AAAGTGGGGG ACTTGAGTGC AAAAAAGAA  
AAGCGGAATT CCACGTGTAG CGGTGAAATG CGTAAAGATG TGGAGGAACA  
CCAGTGGCGA AGGCGGCTCT TTTGGTCTGT AACTGACGCT GAGGCGCGAA  
AGCGTGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG  
ATGAGTGCTA AGTGTTAGAG GGTATCCACC CTTTAGTGCT GTAGCTAACG  
CATTAAACAC TCCGCCTGGG GAGTACGCTC GCAAGAGTGA AACTCAAAGG  
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTGGAAGCA  
ACGCGAAGAA CCTTACCAGG TCTTGACATC CCCTGACAAC CCGAGAGATT  
GGGTGTTCCC CCTTCGGGGG GGACAGGGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC  
GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC  
CTCGACCTTA GTTGCCAGCG AGTCAAGTCG GGCACCTAA GGTGACTGCC  
GGCTAAAAGT CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT  
ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG GCGGTACAAA GGGTTGCGAA  
CCC GCGAGGG GGAGCCAATC CCAAAAAGCC GCTCTCAGTT CGGATTGCAG  
GCTGCAACTC GCCTGCATGA AGCCGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC  
ATGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG

**Ek 7. K1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1430

Baz içeriği: 354 A 345 C 455 G 276 T

Gen Bankası No: AY248709

ATTCTAGAGT TTGATCATGG CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT  
 ACATGCAAGT CGAGCGGACG AATCGAAAGC TTGCTTTTGA TTCGTTAGCG  
 GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGCAACCT GCCCTGTAGA CGGGGATAAC  
 ACCGAGAAAT CGGTGCTAAT ACCGGATAAC ACGAAATGTC GCATGACGTT  
 TCGTTGAAAG ACGGCGCAAG CTGTGCTAC AGGATGGGCC CGCGGCGCAT  
 TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA GGCGACGATG CGTAGCCGAC  
 CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA  
 CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAG TCTGACGGAG  
 CAACGCCGCG TGAGCGAAGA AGGTCTTCGG GTCGTAAAGC TCTGTTGTTA  
 GGGAAGAACA AGTAACGCAG TAACTGGCGT TACCGTGACG GTACCTAACG  
 AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGCGCGCAG GCGGTTCCCTT  
 AAGTCTGATG TGAAAGCCCA CGGCTCAACC GTGGAGGGTC ATTGGAAACT  
 GGGGGACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGTGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGA GATGTGGAGG AACACCAGTG GCGAAGGCGA CTCTCTGGTC  
 TGTAACTGAC GCTGAGGCGC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA  
 CCCTGGTAGT TCACGCCGTA AACGATGAGT GCTAAGTGTT AGAGGGTATC  
 CACCCTTTAG TGCTGTAGCT AACGCATTAA GCACTCCGCC TGGGGAGTAC  
 GCTCGCAAGA GTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT  
 GGAGCATGTG GTTTAATTTCG AAGCAACGCG AAGAACCCTA CCAGGTCTTG  
 ACATCCCCTG ACAACCCGAG AGATCGGGCG TTCCCCCTTC GGGGGGGACA  
 GGGTGACAGG TGGTGCATGG TTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG  
 GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTCGA CCTTAGTTGC CAGCATTGAG  
 TTGGGCACTC TAAGGTGACT GCCGGCTAAA AGTCGGAGGA AGGTGGGGAT  
 GACGTCAAAT CATCATGCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGCTACAA  
 TGGGCGGTAC AAAGGGTTGC GAACCCGCGA GGGGGAGCCA ATCCCAAAA  
 GCCGCTCTCA GTTCGGATTG CAGGCTGCAA CTCGCCTGCA TGAAGCCGGA  
 ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC  
 TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACGGTACCAT

**Ek 8. K2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1428

Baz içeriği: 354 A 347 C 453 G 274 T

Gen Bankası No: AY248710

ATTCTAGAGT TTGATCATGG CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT  
 ACATGCAAGT CGAGCGGACG AATTGAAAGC TTGCTTTTGA TTCGTTAGCG  
 GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGCAACCT GCCCTGTAGA CGGGGATAAC  
 ACCGAGAAAT CGGTGCTAAT ACCGGATAAC ACGAAATGTC GCATGACGTT  
 TCGTTGAAAG ACGGCGCAAG CTGTCTGCTAC AGGATGGGCC CGCGGCGCAT  
 TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA GGCGACGATG CGTAGCCGAC  
 CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA  
 CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAG TCTGACGGAG  
 CAACGCCGCG TGAGCGAAGA AGGCCTTCGG GTCGTAAAGC TCTGTTGTTA  
 GGGAAGAACA AGTAACGCAG TAACTGGCGT TACCGTGACG GTACCTAACG  
 AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCACGGTAAT ACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGCGCGCAG GCGGTTCCCTT  
 AAGTCTGATG TGAAAGCCCA CGGCTCAACC GTGGAGGGTC ATTGGAACCT  
 GGGGGACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGCGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGA GATGTGGAGG AACACCAGTG GCGAAGCGGC TCTCTGGTCT  
 GTAACCTGACG CTGAGGCGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC  
 CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GAGGGTATCC  
 ACCCTTTAGT GCTGTAGCTA ACGCATTAA GACTCCGCCT GGGGAGTACG  
 CTCGCAAGAG TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG  
 GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA  
 CATCCCTGA CAACCCGAGA GATCGGGCGT TCCCCCTTCG GGGGGACAGG  
 GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT  
 TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTCGACC TTAGTTGCCA GCATTCAGTT  
 GGGCACTCTA AGGTGACTGC CGGCTAAAAG TCGGAGGAAG GTGGGGATGA  
 CGTCAAATCA TCATGCCCTT TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG  
 GGCGGTACAA AGGGTTGCGA ACCCGCGAGG GGGAGCCAAT CCCAAAAGC  
 CGCTCTCAGT TCGGATTGCA GGCTGCAACT CGCCTGCATG AAGCCGGAAT  
 CGCTAGTAAT CGCGGATCAG CATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT  
 GTACACACCG CCCGTCACAC GGTACCAT

**Ek 9. K3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1369

Baz içeriği: 342 A 328 C 425 G 274 T

Gen Bankası No: AY248712

GAACGCTGGC GGCGTGCCTA ATACATGCAA GTCGAGCGAA CCAATTGAAA  
 GCCTAGCTTT CATGAGGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA  
 CCTGCCCTAT AGACTGGGAT AACTCGCGGA AACGCGTGCT AATACCGGAT  
 AACACATCAA AGTGCATGCT TTGATGTTGA AAGATGGTTC TGCTATCACT  
 ATAGGATGGG CCCGCGGCGC ATTAGCTTGT TGGTGGGGTA ACGGCCTACC  
 AAGGCGACGA TGCGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGGAC  
 TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCAC  
 AATGGGCGAA AGCCTGATGG AGCAACGCCG CGTGAGCGAA GAAGTCTTC  
 GGATCGTAAA GCTCTGTTGT AAGGGAAGAA TAAGTGCAGT AGTAACTGGC  
 TGCACCTTGA CGGTACCTTA CTAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC  
 AGCCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT  
 AAAGCGCGCG CAGGCGGTCT CTTAAGTCTG ATGTGAAAGC CCCC GGCTTA  
 ACCCGGGGAG GGTCAATTGGA AACTGGGAGA CTTGAGTGCA GGAAAGGGAA  
 GCCGGAATTC CATGTGTACG GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGAACACCA  
 GTGGCGAAGC GGCTTCCTGG CCTGTAAGTG ACGCTGAGGC GCGAAAGCGT  
 GGGGAGCAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAG  
 TGCTAAGTGT TAGGGGGGTT CCACCCCTTA GTGCTGCAGC TAACGCATTA  
 AGCACTCCGC CTGGGGAGTA CGGTCGCAAG ACTGAAACTC AAAGGAATTG  
 ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGT'TTAATTC GAAGCAACGC  
 GAAGAACC'TT ACCAGGTCTT GACATCCCGC TGACCGCTAT GGAGACATAG  
 CCTTCCCTTC GGGGACAGCG GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT  
 CGTGTTCGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC ACGAGCGCAT ACCCTTGTC  
 TTAGTTGCCA TCATTCAGTT GGGCACTCTA AGGAGACTGC CGTACAAATA  
 CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG  
 CTACACACGT GCTACAATGG ACGGTACAAA CGGTCGCGAA GTCGCGAGAC  
 GGAGCCAATC CGAAAAACC GTTCTCAGTT CGGATTGCAG GCTGCAACTC  
 GCCTGCATGA AGCCGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT  
 GAATACGTTT CCGGGCCTT



**Ek 10. K4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1376

Baz içeriği: 345 A 329 C 436 G 266 T

Gen Bankası No: AY248711

GGACGAACGC TGGCGGCGTG CCTAATACAC GCAAGTCGAG CGGACGAATT  
GAAAGCTTGC TTTTGATTTCG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG  
CAACCTGCCC TGTAGACGGG GATAACACCG AGAAATCGGT GCTAATACCG  
GATAACACGA AATGCCGCAT GACGTTTCGT TGAAAGACGG CGCAAGCTGT  
CGCTACAGGA TGGGCCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT  
CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG  
GGACTGAGAC ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT  
CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG CGAAGAAGCC  
TTCGGGTCTGT AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAA CGCAGTAACT  
GGCGTTACCG TGACGGTACC TAACGAGAAA GCCACGGTTA ACTACGTGCC  
AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC  
GTAAAGCGCG CCCAGGCGGT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCACGGTTCA  
ACCGTGGAGG GTCATTGGAA ACTTGGGGGA CTTGAGTGCA AAAAAGGAAA  
GCGGAATTCC CGTTGTAGCG GTGAAATGCG TAAAGATGTG AAGGAACACC  
AGTGGCGAAG GCGGCTCTTT TGGTCTGTAA CTGACGCTGA GGCGCGAAAG  
CGTGGGAGCA AACAGGATTA GATACCC TGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT  
GAGTGCTAAG TGTTAGAGGG TATCCACCCT TTAGTGCTGT AGCTAACGCA  
TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGCTCGC AAGAGTGAAA CTCAAAGGAA  
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA  
CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC CCTGACAACC CGAGAGATCG  
GGCGTTCCCC CTTGCGGGGG ACAGGGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT  
CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT  
CGACCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGACT  
AAAAGTCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA  
CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGGCGG TACAAAGGGT TGCGAACCCG  
CGAGGGGGAG CCAATCCCAA AAAGCCGCTC TCAGTTCGGA TTGCAGGCTG  
CAACTCGCCT GCATGAAGCC GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCATCATGC  
CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTG

**Ek 11. K5 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1373

Baz içeriği: 344 A 326 C 428 G 275 T

Gen Bankası No: AY248713

GGACGAACGC TGGCGGCGTG CCTAATACAT GCAAGTCGAG CGAACCAATT  
GAAAGCCTAG CTTTCATGAG GTTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTGG  
GTAACCTGCC CTATAGACTG GGATAACTCG CGGAAACGCG TGCTAATACC  
GGATAATACA TCAAAGTGCA TGCTTTGATG TTGAAAGATG GTTCTGCTAT  
CACTATAGGA TGGGCCCGCG GCGCATTAGC TTGTTGGTGG GGTAACGGCC  
TACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG  
GGACTGAGAC ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT  
CCACAATGGG CGAAAGCCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG CGAAGAAGGT  
CTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTAAGGGA AGAACAAGTG CAGTAGTAAC  
TGGCTGCACC TTGACGGCAC CTTACTAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC  
CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCGG AATTATTGGG  
CGTAAAGCGC GCGCAGGCGG TCTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCCGGC  
TTAACCCGGG GAGGGTCATT GGAAACTGGG AGACTTGAGT GCAGGAAAGG  
GAAGCGGAAT TCCATGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT ATGGAGGAAC  
ACCAGTGGCG AAGGCGGCTT TCCTGGCCTG TAACTGACGC TGAGGCGCGA  
AAGCGTGGGA GAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG  
ATGAGTGCTA AGTGTTAGGG GGTTCACC CTTAGTGCT GCAGCTAACG  
CATTAAGCAC TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGACTGA AACTCAAAGG  
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC  
AACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCCGCTGACC GCTATGGAGA  
CATAGCC TTCCTCGGGGA CAGCGGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT  
CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA CGCAACCCTT  
GTCCTTAGTT GCCATCATTC AGTTGGGCAC TCTAAGGAGA CTGCCGTACA  
AATACGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAA TCATCATGCC CCTTATGACC  
TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGACGGTA CAAACGGTCG CGAAGTCGCG  
AGACGGAGCC AATCCGAAAA AACCGTTC TCAGTTCGATT GCAGGCTGCA  
ACTCGCCTGC ATGAAGCCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG  
CGGTGAATAC GTTCCGGGCC TTG

**Ek 12. TK4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1380

Baz içeriği: 335 A 343 C 450 G 251 T

Gen Bankası No: AY248718

GACGAACGCT GCGGCGGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACCGAGCA  
 GGAGCTTGCT CTTGTTCGGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT  
 AACCTACCCG TAAGACCGGG ATAACTCCGG GAAACCGGAA CTAATACCGG  
 ATAACACCAA AGACCGCATG GTC'TTTGGTT GAAAGGCGGC TTCGGCTGTC  
 ACTTACGGAT GGGCCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC  
 ACCAAGGCGA CGATGCGTAG CCGGCCTGAG AGGGTGACCG GCCACACTGG  
 GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAACTCTC  
 CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CCGAGCGACG CCGCGTGAGC GAAGAAGGTC  
 TTCGGATCGT AAAGTCTGT TGT'TAGGGAA GAAGAAGTAC CGTTCGAATA  
 GGGCGGTACG GTGACGGTAC CTAACGAGAA AGCCCCGGCT AACTACGTGC  
 CAGCAGCCCG CGGTAATACG TAGGGGGCGA GCGTTGTCCG GAATTATTGG  
 GCGTAAAGCG CGCGCAGGCG GTCCCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCACCG  
 CTCACCCGTG GAGGGTCATT GGAAACTGGG GGACTTGAGT GCAAAAAAAG  
 AAAAGCGGAA TTCCACGTGT AGCGGTGAAA TCGGTAAAGA TGTGAAGGAA  
 CACCAGTGGC GAAGGCGGCT CTCTGGTCTG TAACTGACGC TGAGGCGCGA  
 AAGCGTGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC  
 GATGAGTGCT AAGTGTTAGA GGGGTCAAAC CCTTTAGTGC TGTAGCTAAC  
 GCGTTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTG AAAC'TCAAAG  
 GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATT'CGAAG  
 CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCCCTGACA ACCCTGCAGA  
 CAGGGCGTTC CCCCTTCGGG GGGACAGGGT GACAGGTGGT GCATGGTTGT  
 CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC  
 CCTCGCCCT AGTTGCCAGC ATTCAGTTGG GCACTCTAGG GGGACTGCCG  
 GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCTTA  
 TGACCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGG CCGTACAAAG GGCTGCGAAC  
 CCGCGAGGGG GAGCCAATCC CAAAAGCCG CTCTCAGTTC GGATTGCAGG  
 CTGCAACTCG CCTGCATGAA GCCGGAATCG CTAGTAATCG CGGATCAGCA  
 TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTG

**Ek 13. G1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1378

Baz içeriği: 323 A 350 C 465 G 240 T

Gen Bankası No: AY248717

AACGCTGGCG GCGTGCCTAA TACATGCAAG TCGAGCGGAC CAAATCGGAG  
CTTGCTCTGG TTTGGTCAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGCAACC  
TGCCCGCAAG ACCGGGATAA CTCCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA  
CACCGAAGAC CGCATGGTCT TTGGTTGAAA GCGGCGCTTT GGCTGTCACT  
TGCGGATGGG CCCGCGGCGC ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA ACGGCTCACC  
AAGGCGACGA TGCGTAGCCG GCCTGAGAGG GTGACCGGCC AACTGGGAC  
TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC  
AATGGGCGAA AGCCTGACGG AGCGACGCCG CGTGAGCGAA GAAGGCC TTC  
GGGTCGTAAA GCTCTGTTGT GAGGGACGAA GGAGCGCCGT TCGAAGAGGG  
CGGCGCGGTG ACGGTACCTC ACGAGGAAGC CCCGGCTAAC TACGTGCCAG  
CAGCCGCGGT AATACGTAGG GGGCGAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT  
AAAGCGCGCG CAGGCGGTTT CTTAAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA  
ACCCGTGGAG GGTCATTGGA AACTGGGGGA CTTGAGTGCA GGAAAAGGAA  
AACCGGAATT CCACGTGTAG CCGGTGAAAT GCGTAAAGAT GTGGAGGAAC  
ACCA GTGGCG AAGGCGGCTC TCTGGCCTGC AACTGACGCT GAGGCGCGAA  
AGCGTGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG  
ATGAGTGCTA AGTGTTAGAG GGGTCACACC CTTTAGTGCT GCAGCTAACG  
CGATAAGCAC TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA AACTCAAAGG  
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTGGAAGC  
AACCGGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCCCTGACAA CCAAGAGAT  
TGGGCGTTCC CCCTTCGGGG GGACAGGGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC  
GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC  
CTCGCCTCTA GTTGCCAGCA CGAAGGTGGG CACTCTAGAG GGACTGCCGG  
CGACAAGTCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCTTAT  
GACCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGGC GGTACAAAGG GCTGCGAACC  
CGCGAGGGGG AGCGAATCCC AAAAAGCCGC TCTCAGTTCG GATTGCAGGC  
TGCAACTCGC CTGCATGAAG CCGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT  
GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTG

**Ek 14. G2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası**

Baz sayısı: 1382

Baz içeriği: 338 A 336 C 446 G 262 T

Gen Bankası No: AY122325

GGACGAACGC TGGCGGCGTG CCTAATACAT GCAAGTCGAG CGGACGATTC  
AAAAGCTTGC TTTTGGATCG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG  
CAACCTGCC TGTAGACGGG GATAACACCG AGAAATCGGT GCTAATACCG  
GATAATACGG AAGGCCGCAT GGTCTTTCGT TGAAAGGCGG CGCAAGCTGT  
CGCTACAGGA TGGGCCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT  
CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG  
GGACTGAGAC ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT  
CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG CGAAGAAGGC  
CTTCGGGTCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTA CCGCAGTCAC  
TGGCGGTACC TTGACGGTAC CTAACGAGGA AGCCACGGCT AACTACGTGC  
CAGCAGCCGC GGTAAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCGG AATTATTGGG  
CGTAAAGCGC GCGCAGGCGG TTCCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCACGGC  
TCAACCCGTG GAGGGTCATT GGAAACTGGG GGACTTGAGT GCAGAAAAAG  
AGAGCGGAAT TCCACGTGTA GCGGTGAAAT GCCTTAAAGA TGTGGAGGAA  
CACCAGTGGC GAAGGCGGCT TTTTTGGTCT GTAAGTACG CTGAGGCGCG  
AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA  
ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GAGGGTATCC ACCCTTLAGT GCTGTAGCTA  
ACGCATTAAG CACTCCGCCT GGGGAGTACG CTCGCAAGAG TGAAGTCAA  
AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTGGA  
AGCAACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCCCGTA CAACCCGAGA  
GATCGGGCGT TCCCCCCTTC GGGGGGACAG GGTGACAGGT GGTGCATGGT  
TGACGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC  
AACCCTCGAC CTTAGTTGCC AGCATTAGT TGGGCACCTT AAGGTGACTG  
CCGGCTAAAA GTCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC  
TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGGCGGTACA AAGGGTCGCG  
AACCCTCGAG GGGGAGCCAA TCCCAAAAAG CCGCTCTCAG TTCGGATTGC  
AGGCTGCAAC TCGCCTGCAT GAAGCCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA  
GCATGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGCCT TG

## **ÖZGEÇMİŞ**

1972 yılında Sürmene'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Araklı'da Lise öğrenimini Samsun'da tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1993 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1997 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora eğitimine başladı ve 1998-2002 yılları arasında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Halen KTÜ. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Uzman olarak çalışmaktadır. Evlidir.

