

**HASANABDAL KÖYÜ TERMAL TESİSLERİNDEN
ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Sümevra ACAR

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE
2009**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HASANABDAL KÖYÜ TERMAL TESİSLERİNDEN ALINAN SU
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYON**

Sümevra ACAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2009

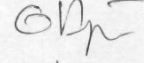
Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Sümeyra ACAR tarafından hazırlanan bu çalışma 23.../24.../2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

İmza : 

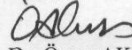
Üye : Doc. Dr. Güleray AĞAR

İmza : 

Üye : Doc. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

**HASANABDAL KÖYÜ TERMAL TESİSLERİNDEN ALINAN SU
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE
EDİLEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Sümevra ACAR

Atatürk Üniversitesi Fen
Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE

Yeni termofilik bakteri türleri bulmak, fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmek amacıyla Erciş ilçesi Hasanabdall Köyü termal tesislerinden su örnekleri alınarak termofilik bakterilerin izolasyonları gerçekleştirildi.

Elde edilen koloniler, morfolojilerine göre ayrılarak, klasik (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal) ve moleküler testlerle (16S rDNA, BOX PCR) karakterize edildi. Sekans analizleri sonucunda bu izolatların; *Geobacillus pallidus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus borstelensis* türlerinin suşları olduğu belirlendi.

2009, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, 16S rDNA PCR, BOX PCR, klonlama

ABSTRACT

MS Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM WATER SAMPLES TAKEN FROM VILLAGE HASANABDAL

Sümeysra ACAR

Atatürk University
Arts and Sciences Faculty
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In order to identify novel thermophilic species and then characterize them by phenotypical and genotypical methods, thermophilic bacteria were isolated from water samples of village Hasanabdal.

The colonies were separated according to their morphological structure and defined by classic tests such as morphologic, physiologic and biochemical tests, and by molecular tests such as 16S rDNA, BOX PCR techniques. We have reached the conclusion that these isolates belong to strain of *Geobacillus pallidus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus borstelensis*.

2009, 53 pages

Keywords: Thermophile bacteria, 16S rDNA PCR, BOX PCR, cloning

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE' ye, bana fikirleriyle ve laboratuvar çalışmalarında çok büyük destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, ayrıca Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a, yine çalışmalarında her konuda desteklerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Özlem BARIŞ'a ve laboratuvar çalışma arkadaşlarım Sayın Biyolog Mehmet KARADAYI ve Sayın Biyolog Furkan ORHAN'a ve yardımlarını esirgemeyen aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

Sümeyra ACAR

Ocak 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1-GİRİŞ	1
2-KURAMSAL TEMELLER	4
2.1-Canlı-Çevre İlişkileri ve Biyolojik Çevre	4
2.2. Bakteriler ve Bakteri Sistematigi	5
2.3.Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri	11
2.4.Temofilik Bakterilerin Habitatları	13
2.5. Bakterilerin Tanısında Kullanılan Yöntemler	14
A-Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	14
2.5.1. Koloni morfolojisi	14
2.5.2. Hücresel morfoloji	14
2.5.3. Gram boyama	14
2.5.4. Spor oluşturma	15
2.5.5. Katalaz testi	15
2.5.6. Amilaz testi	15
2.5.7. Oksidaz testi	15
2.5.8. Nitrat testi	16
B-Moleküler Testler	16
2.5.9. BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi	16
2.5.10. 16S rDNA Geninin Klonlanması	18

3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	18
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı.....	19
3.1.3. Çalışmada kullanılan termofilik bakteriler	23
3.2. Yöntemler	23
3.2.1. Örneklerin alınması ve termofilik bakterilerin izolasyonu	24
3.2.2. Morfolojik ve biyokimyasal testler	25
3.2.3. Moleküler testler	27
3.2.3.1. Bakteri hücresinden genomik DNA'ların izolasyonu	27
3.2.3.2. DNA konsantrasyon tespiti ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması	29
3.2.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	30
a) 16S rDNA bölgesinin PCR yardımıyla çoğaltılması	30
b) BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi	32
3.2.3.4. 16S rDNA Geninin Klonlanması, Sekans Analizi ve Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. Termofilik Bakterilerin Klasik Fenotipik Özellikleri	34
4.2. Termofilik Bakterilerin Bazı Genetiksel Özellikleri:.....	34
4.2.1. BOX PCR Amplifikasyon Sonuçları	37
4.2.2. BOX PCR Sonuçlarına Göre Cluster Analizi	38
4.2.3. 16S rDNA PCR amplifikasyon sonuçları	39
4.2.4. İzolatların 16S rDNA Genlerinin Baz Dizileri	40
TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
Bç	Baz çifti
BSA	Bovın Serum Albumin
M	Molarite
Ma	Miliamper
Mmol	Mili mol
Ng	Nano gram
NA	Nutrient Agar
Nm	Nanometre
PCR	Polimerase Chain Reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Termofilik bakterilerin BOX PCR elektroforez sonuçları.....	38
Şekil 4.2. Termofilik bakterilerin BOX PCR cluster analiz sonuçları	39
Şekil 4.3. Termofilik bakterilerin 16S rDNA PCR elektroforez sonuçları.....	40
Şekil 4.4. Termofilik bakterilerin 16S rDNA PCR elektroforez sonuçları.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hasan Abdal Kaplıcasından İzole edilen Termofilik bakterilerin klasik fenotipik özellikleri	35
Çizelge 4.2. Hasan Abdal Kaplıcasından İzole edilen Termofilik bakterilerin klasik fenotipik özellikleri	36
Çizelge 4.3. İzole edilen bakterilerden elde edilen 16S rDNA gen dizileri ile gen bankasındaki 16S rDNA gen dizilerinin karşılaştırılması.	40

1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar biyosferin oldukça büyük ve önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Doğal ortamda çok fazla sayıda ve çeşitli organizmanın varlığına karşın, biyosfer üzerindeki prokaryotlar, temel üye konumunda bulunmaktadır. Mikrobiyal hayat, metabolik olarak esnek, çok yönlü ve ekstrem koşullara kolayca adapte olabilmeleri sonucunda, yalnızca hava, toprak, göl ve denizlerde değil, kutuplardaki buzullardan, yanardağlara; alkali ortamlardan, yüksek asidik ortamlara kadar geniş bir yayılım göstermektedir (Başbülül 2002).

Mikroorganizmaların, çok değişik çevre şartlarına adaptasyon göstererek hayatlarını devam ettirebilmeleri, bu organizmaların hem yapısal, hem de hücresel düzeyde farklı özelliklerinin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Bakterilerin gelişiminde etkin parametrelerden biri olan sıcaklık faktörü, organizmaların evrimine ve aktivitelerine etki eden çevresel faktörlerden en önemlisidir. Aynı zamanda mikroorganizmaların gelişimleri ile ilgili bütün proseslerinin, sıcaklıklardan etkilenen kimyasal reaksiyonlara bağlı olmasından dolayı, sıcaklık, mikroorganizmaların gelişiminde önemli bir role sahiptir (Tortora *et al.* 1995; Kristjasson 1989) Bir mikrobiyal türün gelişim sıcaklıkları mikroorganizmanın yaşam döngüsündeki evre ve ortamın besin içeriğine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle, gelişim için gerekli optimum sıcaklık, her hücresel aktivite için optimum sıcaklık olmayabilir. Bazı durumlarda, optimum sıcaklık, organizmanın maksimum gelişim sıcaklığına yakın olabilir. Çünkü enzim reaksiyon oranı sıcaklıkla birlikte artar. Bu durum, enzimin ısı ile bozulduğu ve hücrelerin gelişiminin durduğu noktaya kadar devam eder. Bu özellikler doğrultusunda, yapılan çalışmalar suyun kaynama sıcaklığının üzerindeki sıcaklık değerlerinde de mikroorganizmaların çok önemli bir kısmının yaşamsal aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir (Brock 1967; Kuşçuoğlu 1992).

Yükselen sıcaklıkla birlikte bakterilerin çeşitliliğinde azalma olmasına karşın, termofilikler bakterilerin sayısında artış gözlenmektedir. Bu, termofilik bakterilerin,

hücre duvarındaki proteinlerin göstermiş olduğu kararlılık, membran yağ bileşimleri, membran proteinlerinin yüksek termostabilitesi, enerji transdüksiyon enzimlerinin yüksek devinim oranları ve enerji transferindeki bağlanma iyonlarındaki değişimler, DNA'sının pozitif süper sarmal yapı göstermesi, özellikleriyle açıklanmaktadır (Tolner *et al.* 1997; Manier *et al.* 2001; Sara and Sleytr 2000; Tolner *et al.* 1997).

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. (Balows *et al.* 1991; Chen *et al.* 2002). Bu bağlamda, ekstrem sıcaklık şartlarında yaşamaya adapte olmuş termofilik bakterilerin içerdiği enzimler de günümüz biyoteknolojik ve endüstriyel çalışma alanlarındaki yerini almıştır. (Kurosawa *et al.* 2005; Nazina *et al.* 2005; Mohammed *et al.* 2006).

Termofilik bakteriler, gıda, tekstil, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan, çeşitli işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olan ve ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen özel enzimlerin üretiminde görev alırlar. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp, mezofilik bakterilerde ifade edilmesi sağlanmıştır. (Tarakçıoğlu 1979; Aira *et al.* 1983; Ekşi 1988; Aguilar 1996; Banerjee *et al.* 1999; Kıran *et al.* 2006).

Dünya üzerinde ekstrem mikroorganizmalar çok geniş bir yayılım göstermektedir. Bu mikroorganizmalar içerisinde yer alan Termofilik bakterilere tüm jeotermal alanlarda rastlanmakta olup bu alanlara kaplıcalar ve derin deniz dipleri örnek olarak verilebilir. Doğal jeotermal alanlar dünyada, yer kabuğu hareketlerinin görüldüğü tektonik aktif zon bölgelerinde bulunur. Çok sayıda araştırmanın gerçekleştirildiği jeotermal alanlar; İzlanda, Yeni Zelanda, Japonya, İtalya, Rusya ve Amerika Birleşik Devletlerinde yer alan Yellowstone uluslararası parkıdır (Kristjanson and Stetter, 1992; Hjørleifsdottir, 2002). Yüksek veya düşük pH'nın sonucu olarak karakteristik bir yüzey kimyasına sahip olan bu jeotermal alanlar, jeolojik ısı kaynağına bağlı olarak ikiye ayrılırlar. Bunlardan birincisi aktif volkanik zon bölgeleridir ki; bu alanlardaki su sıcaklığı 500-

3000 metre derinliklerde genellikle 150-350°C olup, yüzeye sürekli olarak volkanik gaz ile buhar çıkışı söz konusudur. Bu alanlarda, volkanik gazlarla birlikte yüzeye ulaşan H₂S ‘ün biyolojik ve kimyasal oksidasyonu sonucu oluşan sülfürik asitten dolayı pH sürekli asidiktir (Brock 1978; Kristjanson and Stetter, 1992; Kristjanson *et al.* 2000; Skirnisdottir 2000). Diğerleri ise düşük sıcaklığa sahip alanlar olarak adlandırılmakta olup, volkanik bölgelerin dışında yer alırlar. Buralardaki su sıcaklığı 500-3000 metre derinlikte 150°C nin altında olup çok düşük miktarlarda H₂S içerdiği için suyun pH’sı alkali düzeydedir (Kristjanson and Stetter 1992).

Dünyada jeotermal alanların yoğunluğu göz önüne alındığı zaman, zengin ülkelerden birisi de Türkiye’dir. Ancak ülkemizin değişik coğrafi bölgelerinde bulunan termal kaynaklardaki mikroorganizma florasının belirlenmesi ve bunlardan endüstride kullanılabilecek potansiyeli olan türlerin saptanması üzerine yapılmış olan bilimsel çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Dülger *et al.* 2003). Termofilik mikroorganizmaların tanımlanmasında fenotipik ve genotipik karakterler kullanılmaktadır. Bununla beraber daha çok morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere dayalı çalışan konvansiyonel metodlar, özellikle tür ve tür altı taksonomik grupların belirlemede yetersiz olduğu bilinmektedir (Belduz *et al.* 2003, Ahmet 2006). Ayrıca, konvansiyonel metodların uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, tecrübeli ve yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç duyması ve alınan sonuçlarında alternatif yorumlara açık olması, bu yöntemlerin bilinen dezavantajlarındandır (Miller and Joaquim 1993). Bu nedenle son yıllarda mikroorganizmaların tanısında kullanılmak üzere güvenilirliği daha fazla olan moleküler teknikler geliştirilmiştir (Manceau and Horvais 1997). Bunlardan yağ asit analizleri, SDS-PAGE protein analizi, metabolik enzim profilleri ve genetik profiller (16-23S rDNA, Rep, Eric ve Box-PCR) sık kullanılan yöntemlerdir.

Bu çalışmada; Türkiye’de daha önce çalışılmamış termal kaynaklardan biri olan Van-Erciş Hasanabdal kaplıcasından termofilik bakterilerin izolasyonu, fenotipik ve moleküler markerler ile karakterizasyonu ve tanımlanması amaçlanmıştır.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1-Canlı-Çevre İlişkileri ve Biyolojik Çevre

Biyosferde değişik habitatlar ve bu habitatlarda yaşayan çok çeşitli canlı türleri vardır. Biyolojik çeşitlilik deyimi tüm canlı organizmaların yaşam alanlarının çeşitliliğini birbirleri ve yaşadıkları ortamla olan ilişkilerini tanımlamak üzere kullanılmaktadır. Günümüze kadar canlıların yaşam alanları, onların hem çeşitliliği, hem de yapıları üzerine önemli etkiler oluşturmaktadır (Barış 2008).

Günümüzde biyosferin özellikle farklı bölgeleri (buzullar, kaplıcalar, derin denizler) ile ilgili çok sayıda mikrobiyolojik çalışma yapılmaktadır (Adıgüzel 2006). Ortam koşullarının olağandışı olduğu bu bölgelerde çalışmaların yoğunlaşmasının sebepleri ise;

- ✓ Bu ortamlarda yaşayan mikroorganizmaların, önemli adaptasyon özelliklerine sahip olması,
- ✓ Bu ortamların henüz yeterince araştırılmamış ve bunun sonucu olarak, biyolojik çeşitliliği hakkında yeterince bilginin bulunmaması,
- ✓ İzole edilen mikroorganizmaların metabolizmalarındaki farklılıklar,
- ✓ İzole edilen mikroorganizmaların, enzimlerinin veya metabolik ürünlerinin endüstriyel, tıbbi veya zirai amaçla kullanımlarının bulunması gibi sebepler sıralanabilir (Satarayana *et al.* 2005).

2.2. Bakteriler ve Bakteri Sistematigi

Bakteriler ve bakteri sistematiginden bahsetmeden önce karakterizasyon, tanılama, sistematik ve taksonomi gibi terminolojik olgulardan bahsetmek yerinde olacaktır. Karakterizasyon, saf bir prokaryotik kültürün tüm özelliklerinin bir tanımlama oluşturmak amacıyla elde edilmesidir. Tanılamanın ise saf bir kültürün, iyi karakterize edilmiş ve kabul görmüş bir türe dahil edilebilmesidir. Bir izolatu tanılamak için gerekli veri miktarı karakterizasyon için gerekli olandan daha azdır. Bu sebeple tanılama için, bir organizmayı diğerlerinden kesin olarak ayırabilecek karakterisitkler seçilir (Dworkin *et al.* 2006).

Canlıların sınıflandırılması sistematik veya taksonomi olarak adlandırılır. Bu iki kelime pratikte birbirinin yerine kullanılmasına rağmen taksonomi daha genel bir ifade taşır. Taksonomi, sınıflandırmanın teorik yapısını ve esaslarını ortaya koyarken sistematik, türlerin belli sistemlerdeki yerlerine yerleştirilmesini gerçekleştirir. Sistematik, taksonomi ile birlikte ekoloji, biyokimya, genetik, moleküler biyoloji ve mikroskopik kabulleri ihtiva eder (Aktümsek and Konuk 2002; Dworkin *et al.* 2006).

Günümüzde tespit edilen canlıların rRNA sentezi ile ilgili DNA bölgelerinin (rDNA) baz dizileri karşılaştırıldığında, canlıların üç büyük grup altında sınıflandırılacakları tespit edilmiştir. Bunlar; Bacteria (öbakteriler, gerçek bakteriler), Archea (arkeanlar, antik bakteriler) ve Eukaryotes (Ökaryotlar) olarak isimlendirilmektedir (Woese *et al.* 1990; Skirisdottir 2000; Mora and Amann 2001; Hasenekoğlu and Yeşilyurt 2002; Hugenholtz 2002). Bu üç temel grubun oluşturduğu organizma havuzundan zooloji ve botaniğin klasik teknikleri ile çalışılabilen organizmaları çıkarınca geriye mikrobiyologların çalışma alanlarını oluşturan organizmalar kalır. Bunlar genellikle özel ekipmanlarla (mikroskoplar) görülebilen küçük organizmaları içermektedir (Amann *et al.* 1995). Bitki ve hayvanlarla mukayese edildiğinde, mikroorganizmaların morfolojileri sağlam bir sınıflandırmaya temel oluşturmak ve güvenilir tanılama için oldukça yetersizdir. Bu nedenle bakterilerin tanılanması için, mikroskobik morfolojileri,

koloni morfolojileri, endospor oluşturup-oluşturmadıkları, hareketli olup-olmadıkları, Gram reaksiyonları (hücre duvar yapıları), ısı, O₂, ışık ve pH istekleri, karbon kaynağı olarak kullanabildiğı moleküller, hücrenin biyokimyasal yapısı ve nükleik asitlere dayalı birden fazla tespitite bulunmak gerekmektedir (Schlegel 1985; Amann *et al.* 1995; Mora and Amann 2001; Hasenekoğlu and Yeşilyurt 2002). Bu özelliklerin belirlenebilmesi için bakterinin kültüre alınabilmesi gerekmektedir. Bazı mikroorganizmaları kültüre almak mümkün olmamaktadır. Bu mikroorganizmaları kültüre almadan kendi doğal ortamlarında tanılamaya olanak sağılayan tekniklerin (*in situ* hibridizasyon problemleri) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır (Amann *et al.* 1995).

Bu tespitlerden nükleik asitlere (DNA ve RNA) dayalı yöntemler genotipik yöntemleri, diğerkleri ise fenotipik yöntemleri oluşturmaktadır.

Bakterilerin tanı amaçlı karakterizasyonu için, fenotipik ve genotipik karakterlerin her ikisine ait veriler de kullanılmaktadır. Genotipik ve fenotipik verilerin birbirlerini desteklediğı sonuçlar ideal verilerin alındığını göstermektedir. İlk olarak fenotipik gözlemler daha sonra bu verilerden faydalanılarak moleküler incelemeler yapılmaktadır. Bunlar; mikroskopik özellikler (hücre şekli, büyüklüğü, hareketliliğı, flagel oluşturup oluşturmadığı, spor oluşturup oluşturmadığı, hücresel inklüzyonlar, renk, koloni morfolojisi, gram boyanma özelliğı), hücre bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu (DNA , membran bileşimi, yağı asitleri, eter yağları, alifatik hidrokarbonlar, izoprenoid kuinonlar, sitokromlar, hücre duvarı yapıları ve bileşimi, bakteri antijenleri, lipopolisakkaritler, mikolik asitler, peptidoglikan, elektroforetik protein analizleri, poliaminler), metabolizma ile ilgili özellikler (temel enerji metabolizması, besinsel ve metabolik karakterler, özel besinsel gereksinimler, enzimler, ekolojik parametreler) ve nükleik asit propları ile belirlenen karakterler (spesifik nükleik asit proplarının sentezi veya izolasyonu, hedef nükleik asit ekstraksiyonu, spesifik nükleik asit proplarının çoğaltılması ve gözlemlenmesi, hedef nükleik asitin nükleik asit probu ile hibridizasyonu ve hibridlerin tespiti) veriler olarak sıralanabilmektedir (Woese *et al.* 1990; Vandamme *et al.* 1996; Skirnisdottir 2000; Mora and Amann 2001; Hugenholtz 2002; Logan *et al.* 2002; Martin 2002; Bohannon and Hughes 2003; Chelius and Moore 2004; Coenye *et al.* 2005; Dworkin *et al.* 2006; Singh *et al.* 2006).

Tanı ve karakterizasyon için kullanılan yöntemler konvensiyonel ve moleküler yöntemler olarak da sınıflandırılabilir (Adıgüzel 2006). Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıkları esas alarak geliştirilmiştir. Moleküler yöntemler karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımıyla mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir. Özellikle ribozomal operonların (*rrn*) dizi analizleri organizmalar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Ribozomal operonlar 3 gen içermektedirler. Bunlardan ilki 16S rRNA'yı şifreleyen *rrs* geni, diğeri ribozomun 23S rRNA'yı şifreleyen *rrl* geni, üçüncüsü ise 5S rRNA'yı şifreleyen gendir. Bu üç bölgeden özellikle 16S rRNA bölgesi üzerinde daha yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Lane *et al.* 1985; Kane *et al.* 1993; Vandamme *et al.* 1996; Woese 2000; Mora and Amann 2001; Martin 2002; Dworkin *et al.* 2006).

Serolojik teknikler (Radioimmunoassay, Immunoblot, Enzym-Linked Immunosorbent Assay, Dot Immunobinding Assay, Aglutinasyon ve Immunofluorescence), nükleik asit temelli analiz teknikleri (Randomly Amplified Polimorphic Detection = RAPD, Repetitive Extragenic Palindromic = rep-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus = Eric-PCR, Box-PCR, Spesifik PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP, PCR-RFLP, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis = ARDRA ve Denaturing Gradient Gel Electrophoresis = DGGE), metabolik enzim ürünlerinin belirlenmesi (Biolog), yağ asit analizleri (Mikrobial Identification System = MIS) gibi moleküler yöntemler son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan MIS ve BIOLOG tamamen bilgisayar kontrolünde olup, rutin testlerin yapıldığı laboratuarlarda mikroorganizmanın tanı ve karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Vaneechoutte *et al.* 1992; Campbell *et al.* 1997; Muyzer and Smalla 1998; Şahin *et al.* 2000; Adıgüzel 2006; Qiu *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

Mikroorganizmaların tanınması ve sınıflandırılması amacıyla uygulanmakta olan farklı birçok fenotipik ve genotipik metodun her biri sırasıyla cinsten, türe, alt türe,

varyeteye kadar belirli oranlarda filogenetik sınıflandırma yapmaya imkan sağlamaktadır. Bununla beraber her yöntem uygulamadaki kolaylık, uygulanabilirlik, ekipman ihtiyacı ve çözülebilirlik seviyesine bağlı olarak, bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Genellikle DNA temelli metotlar, mikroorganizmaların tanılanması ve sınıflandırılmalarında evrensel olarak uygulanabilen, oldukça güvenilir metotlar olup cins ve tür seviyesindeki ayrımlar, DNA-DNA hibridizasyon yöntemlerine ve artan oranda da 16S rRNA baz dizilimine bağlı modern filogeniye dayanmaktadır (Vandamme *et al.* 1996; Rademaker *et al.* 1997; Daffonchio *et al.* 1998; Mora and Amann 2001). Moleküler teknikler, mikrobiyal ekolojide, bakterilerin, tanılanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılmasın da büyük öneme sahiptir. (Schloter *et al.* 2000; Alp 2003; Singh *et al.* 2006).

Moleküler biyolojide ve özellikle de polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction= PCR) teknolojisindeki gelişmeler, mikroorganizmaların genomik analizlerine bağlı olarak belirlenen bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin saptanmasında, izolatların sınıflandırılması ve karakterizasyonunda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Özellikle 16S-23S rDNA-PCR, ITS-PCR (Internaly Transcribed Spacer), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), T-RFLPs (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), tRNA PCR (Transfer RNA), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) gibi PCR temelli parmak izi yöntemlerinin geliştirilmesi ve spesifik primerlerin kullanılmasıyla bakterilerin tanı ve teşhisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Adıgüzel 2006). Bu da bilgisayar destekli PCR teknolojisi kullanan protokollerin, bakteriyel patojenlerin popülasyon dinamikleri ve ekolojilerinin tespitinde bizlere önemli bilgiler sunmaktadır. Mikroorganizmaların genom haritalarının ortaya konulması onların taksonomik iskeletlerinin, popülasyon yapılarının, hastalık risklerinin tespitinde önemli faydalar sağlamaktadır (Muyzer and Smalla 1998; Louws *et al.* 1999, 2001).

Son yıllarda birbiriyle oldukça yakın akrabalığı bulunan bakterileri izolatları arasındaki farklılıkların ortaya konulmasında, tüm gen bölgelerinin analizine imkan sağlayan, sınıflandırma ve karakterizasyonda oldukça hızlı bir yöntem olan PCR temelli teknikler kullanılmaktadır. PCR, DNA veya RNA üzerindeki seçilmiş bir veya birden fazla

sayıda bölgenin *in vitro* koşullarda oligonükleotid primerler ve bir DNA polimeraz (*Taq*) enzimi kullanılarak PCR aleti yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Beffa *et al.* 1996; Miteva *et al.* 1999; Şahin *et al.* 2000; Smith *et al.* 2001). PCR üç farklı basamaklı bir reaksiyon serisinden oluşmaktadır. Çift zincirli DNA molekülleri 90°C'nin üzerindeki sıcaklıkla muamele edilerek, zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanır (denatürasyon basamağı). Daha sonra cihaz, primerin hedef bölgeye yapışması için gerekli olan ısı derecesine getirilir ki, bu sıcaklık (T_m) değeri hesaplanırken, her bir A ve T için 2°C, G ve C için 4°C alınır. Ancak T_m sıcaklığı bunun 5°C altındadır (primerin yapışması). *Taq* DNA polimeraz, primerin 3' ucuna yeni nükleotidleri ekleyerek zincirin uzamasını sağlar (uzama basamağı). Bu sayede iki primerin kısıtladığı, genellikle 100 ile birkaç yüz baza kadar olan bölge çoğaltılmış olur. Tüm bu aşamalar bir PCR döngüsünü oluşturmaktadır. Her döngü sonrası hedef DNA'nın çoğaltılan kısmı iki katına çıkar (Louws *et al.* 1999; Şahin *et al.* 2000; Altaş and Midilli 2003; Brown 2006).

PCR tekniği günümüzde, temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi), klinik tıpta (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, AIDS, lösemi tanısı gibi), analık babalık tayininde, tıbbın diğer kollarında, *in vitro* şartlarda çoğalabilen veya çoğalamayan patojen mikroorganizmaların neden oldukları hastalıkların tespitinde, tohum saflığının belirlenmesinde, doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısında, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı 1999). Bir mikroorganizmanın detaylı tanısında, o mikroorganizma genomu üzerinde bulunan bilgiler çok önemli olduğu, son yıllarda bu bilgilerin bakteri sistemi alanındaki potansiyel uygulamalarını gösterir çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Tenover *et al.* 1995; Ginard *et al.* 1997; Muyzer and Smalla 1998; Woese 2000; Mora and Amann 2001; Martin 2002; Adıgüzel 2006; Dworkin *et al.* 2006; Qiu *et al.* 2008; Ruzsnyak *et al.* 2008).

Son zamanlarda, 16S-23S rDNA genini kodlayan “internal transcrib spacer” gen bölgelerini hedef alarak, bakteriyel tanı, tarama uygulamaları ve bir tür içerisindeki izolatların ayırımına yönelik çalışmalarda büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Tek bir mikroorganizma grubunun teşhisi ve tanısında yüksek hassaslık ve özgüllüğe sahip olan

tekniklerin yerini, ribozomal genlere bağılı tanı yöntemleri almaktadır. 16S ve/veya 23S rDNA bölgelerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesiyle, bakterilerin filogenetik sınıflandırılması gerçekleştirildi (Ginard *et al.* 1997; Maiddak *et al.* 1997, 2001; Muyzer and Smalla 1998; Woese 2000; Mora and Amann 2001; Martin 2002; Harris and Hartley 2003; Woese 2004; Adıgüzel 2006; Dworkin *et al.* 2006; Qiu *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

Farklı mikroorganizmalar arasındaki genetiksel ilişkinin ortaya konulmasında yaygın olarak genomik parmak izi analiz yöntemleri kullanılmaktadır (Palleroni 1993; Singh *et al.* 2006). Bu yöntemleri birkaç başlık altında toplamak mümkün olmaktadır. Bu yöntemlere ilk örnek PCR temelli genomik parmak izi analiz yöntemleridir. PCR temelli parmakizi analiz yöntemlerine RAPD-, BOX-, ERIC-, REP-, GTG5- PCR gibi çok sayıda örnek vermek mümkündür. Bu yöntemlerin her biri sınırlı bir gruptan bütün canlıların akrabalıklarını belirlemeye kadar geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Her araştırmacı çalışmasına, alt yapısına ve uygulanabilirliğine göre bu yöntem veya yöntemleri kullanmaktadır.

Bu yöntemlerden bir diğeri önemli başlığı olan AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ise saflaştırılan DNA'nın uygun bir veya iki restriksiyon enzimi kullanarak kesilmesi ve kesilen bu bölgenin çoğaltılması esasına dayanır (Stead *et al.* 1998).

Son olarak değineceğimiz yöntem ise, PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) yöntemidir. Bu yöntem: PCR ile çoğaltılan DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilip agaroz jelde yürütülerek boyanması ve oluşan bantların yer ve sayılarının mukayesesi ile elde edilen çeşitlilik esasına dayanır (Yoon *et al.* 1997; Stead *et al.* 1998).

Özellikle, rRNA gen bölgelerinin dizi çeşitliliği tiplendirmek için 16S PCR ve RFLP tekniklerinin birleştirilmesi ile ortaya çıkan ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), bakteri türlerinin veya aynı türe ait izolatların ayrılmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Vanechoutte *et al.* 1995; Heyndrickx *et al.* 1996; Jawad *et*

al. 1998; Pramanik *et al.* 2003; Rahman *et al.* 2003; Michaud *et al.* 2004; Goyal 2006; Krizova *et al.* 2006; Bonomo *et al.* 2008; Lawongsa *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

2.3.Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

Termofilik mikroorganizmalar yüksek sıcaklıkta büyüebilme yeteneğine sahip tek hücreli canlılardır (Madigan and Naris 1997). Gerçekte, yüksek sıcaklık yaşam için gerekli birçok makromolekülün denatürasyonuna neden olmasından dolayı birçok mikroorganizma için tehlike oluşturur (Cowan 1992). Termofillerin durumu ve orijini uzun süre tartışma konusu olmuştur. 1927 yılında, Arrhenius, termofiliklerin güneşten gelen radyasyon basıncı ile Venüs gezegeninden yeryüzüne geldiklerini ileri sürmüştür (Babich and Stotzky 1987). İlk izolasyonu yapılan termofilik organizma, *Sulfolobus acidocaldarius* olup, 75°C’de optimum gelişme göstermektedir (Huber *et al.* 1992). Bunun yanında ilk termofilik *Bacillus* ise, 1888 yılında Paris Seine nehrinden, 70°C’de Miquel tarafından izole edilmiştir. Miquel termofilik bakterileri topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole etmiştir (Miquel 1888).

Termofiller, aerobik, anaerobik veya fakültatif anaerobik olup, genellikle Gram(-) mikroorganizmalar olarak bilinirler. Hücre duvarında glikoprotein ve protein miktarı yüksek olduğundan Gram (-) sonuç vermektedir (Tolner *et al.* 1997).

Termofilik mikroorganizmalar yapısal ve moleküler olarak mezofilik mikroorganizmalara göre farklılık gösterirler. Termofillerin yüksek sıcaklığa adaptasyonunu; membran yağ bileşimleri, membran proteinlerinin yüksek termostabilitesi, enerji transdüksiyon enzimlerinin yüksek devinim oranları ve enerji transferindeki bağlanma iyonları gibi protonlardan sodyum iyonlarının kullanımındaki değişimler sağlamaktadır (Tolner *et al.* 1997).

Termofilik canlıların DNA yapısına bakıldığında, yüksek sıcaklıktaki DNA’nın denatürasyonuna karşı, sitoplazmanın iyon içeriği ve düşük su aktivitesiyle korunduğu

düşünülmektedir (Dölger 2003). Bununla birlikte birçok mikroorganizma DNA'sı negatif süper sarmal iken, termofiliklerin DNA'sının pozitif süper sarmal olduğu görülür. Bu özellik ve DNA'ya bağlanan histon ve benzeri proteinler, DNA'nın denatürasyonuna karşı direnç sağlar (Kristjansson 1992).

Termofilik bakterilerin protein ve enzim yapıları da yüksek sıcaklığa dayanıklı özel katlanmalar yapmaktadır. Bu proteinler bazı kritik aminoasitlerce zengindir. 1996 yılında yapılan bir çalışmada, termal kararlılığı artıran en az 13 tane farklı fiziksel ve kimyasal faktörün varlığı belirlenmiştir. Bu faktörlerden önemli olanlar; tuz köprüleri, hidrojen bağları, kısa halkalar, halkalarda bulunan prolin miktarı fazlalığı ve glisin miktarının azlığı şeklindedir. Bu faktörler üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Termofilik özellik gösteren *Thermus aquaticus* ve *Thermococcus litoralis*'den elde edilen enzim DNA polimeraz olup, PCR reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen enzim yüksek sıcaklığa dayanıklı olup, DNA çift zincirini birbirine bağlayan zayıf hidrojen bağlarını kırabilecek özelliğe sahiptir. Bu sayede DNA'nın tek zincirini kalıp olarak kullanarak polimerizasyon zincir reaksiyonunu tamamlar (Aguilar 1996).

Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp, mezofilik bakterilere aktarılmıştır. Bu enzimler: Amilazlar, Ksilenzimler, Proteazlar, Lipazlar, Selülozlar olup gıda, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan enzimlerdir (Aguilar 1996). Bu enzimlerden proteazlar özellikle deterjanlar, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentez ve atıklara muamelede kullanılmaktadır (Banerjee *et al.* 1999). Amilaz enzimi ise ticari olarak ilk kullanılan enzim olma özelliği taşımaktadır (Aira *et al.* 1983). Bu enzim kağıt ve tekstil endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadır (Kıran *et al.* 2006).

Termofilik bakteriler etanol ve hidrojen üretimi için de kullanılmaktadır. 2007 yılında Koskinen ve arkadaşlarının Icelandic jeotermal bölgede yaptıkları bir çalışmayla bu

bölgeden etanol ve hidrojen üreten AK15 ve AK17 suşlarını belirlemişlerdir. *Thermoanaerobacter* genusuna üye bu suşlar, sakkarolitik, termofilik, anaerobik bakteriler olup, yüksek etanol üretim kapasitesine sahiptirler. Rusya'da Kamchatka Peninsu'da bulunan termal kaynaklardan izole edilen *C. uzonii*'de AK15 ile yakın akraba olduğu belirlenmiştir. AK15 suşunda *Thermoanaerobacterium* genusunda olup, %99,2 *T. aciditolerans* olduğu sanılmaktadır (Kublanov *et al.* 2007).

2.4.Temofilik Bakterilerin Habitatları

Termofillerin doğal yaşam alanları, termal kaplıcalar, volkanik aktiviteye sahip topraklar ve denizaltı jeotermal menfezlerdir. Termal bölgelerdeki biyoçeşitlilik ile ilgili yapılan çalışmalarda sıcaklığın 115°C olduğu alanlarda aşırı termofilik bakteriler izole edilebilmiştir. Bunlar *Pyrodictum* ve *Pyrolobus* cinslerine üyedir. Bununla birlikte sıcaklığı 110°C olan petrol alanlarında da aşırı termofilik organizmalara rastlamak mümkündür (Wharton 2002).

Yeraltı kaynakları, volkanik özellik taşımayan alanlar ile sıcak olan volkanik alanlar diye ikiye ayrılırlar. Bu termal enerji, bazen yeryüzünde kaplıcalar olarak görülebilirken, bazen de volkanik patlamalar şeklinde görülebilir. Volkanik özellik taşımayan alanlarda sıcaklık, derinliğin her kilometresinde 25°C yükselir, bu yüzden termofilik organizmalar derin yeraltı alanlarında üreyebilmektedirler (Marteinsson *et al.* 2001). Pek çok termofilik bakteri, kıtasal ve deniz diplerindeki petrol kaynaklarından (Greene *et al.* 1997) ve ayrıca sıcaklığı 113°C'yi geçmeyen diğer kaynaklardan izole edilmiştir (Pedersen 2000). Volkanik alanlarda ise, yer kabuğundan gelen sıcaklık, volkanik patlamalar ve jeotermal sistemlerdeki su ile yeryüzüne taşınır.

Nötral pH'lı kaplıcalar, asidik ve kükürtlü kaplıcalar, demirce zengin kaplıcalar gibi çeşitli özelliklerde kaplıcalar bulunmaktadır. Kaplıca sularının sıcaklıkları genellikle 50-130°C'dir ve yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtikleri alanlardaki bazı mineralleri çözerek mineral maddelerce zengin duruma gelirler. Bu suların çoğunun,

hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce 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 sıcaklığına göre değişmektedir (İnan 2005).

2.5. Bakterilerin Tanısında Kullanılan Yöntemler

A-Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

2.5.1. Koloni morfolojisi

Bakteriyal bir koloninin morfolojisi büyük oranda sıcaklık, pH, atmosfer, yaş ve bulunduğu ortama bağlıdır. Yani standardize edilmiş besiyeri ve şartlar altında koloni morfolojisi, tanılama için kullanılabilecek karakteristikleri ihtiva eder. Koloni pigmentasyonu, boyutu, şekli, yüksekliği, salgı oluşturması, kokusu, opaklığı, kıvamı, kümelenme karakteri ve besiyerinin rengini değiştirmesi organizmaların karakterizasyonu bakımından önemli parametrelerdir.

2.5.2. Hücresel morfoloji

Hücre şekli bakteriyolojide oldukça önemli bir ayırt edici özellik olup tıbbi mikrobiyolojide de fusiform bakteriler, spiriller, vibriolar ve coryneform bakterilerin tanısı bakımından oldukça önemlidir. Hücre boyu ve çapı da yine ayırt edici karakterlerden olup çap boya oranla çoğu zaman daha kararlı bir veri oluşturmaktadır.

2.5.3. Gram boyama

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri hücreleri arasındaki farklar oldukça iyi tanımlanmış olduğundan bakterilerin tanımlanmasında geniş ölçüde faydalanan bir metottur. Yaş ve diğer faktörlere bağlı olarak gram boyanma özelliğinin değişkenlikler gösterebildiği örneklerle rağmen gram boyama tanımlamanın vazgeçilmez metotlarından

biridir.

2.5.4. Spor oluşturma

Sporların varlığı veya spor oluşturabilme, endospor oluşumu tanılamaya yardımcı bir karakter olduğundan dolayı önemlidir. Klinik öneme sahip endospor oluşturan bakterilerin yalnızca *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakteriler olduğu düşünülürse endospor oluşumunun ne derece önemli bir karakteristik olduğu daha iyi anlaşılır. Sporun sadece mevcudiyeti değil *Clostridium tetani* ve *Clostridium botulinum* da olduğu gibi hücre içindeki pozisyonu da tanılamada oldukça önemlidir. Sporlar adi boyama yöntemleri ile boyanamayıp özel boyama yöntemlerinden sonra incelenirler.

2.5.5. Katalaz testi

Mikroorganizmaların kütürlerinde oluşan hidrojen peroksiti parçalayan katalaz enziminin mevcudiyetinin araştırılması esasına dayanır. Aerobik mikroorganizmaların birçoğunda mevcut olan bu enzim özellikle aerop ve anaerop basillerin birbirinden ayrılmasında kullanılır.

2.5.6. Amilaz testi

Amilaz, bir polisakkarit olan nişastayı hidroliz eden enzim olup mikroorganizmaların tümünde mevcut değildir. Bu yönüyle yapılacak olan amilaz testi sayesinde mikroorganizmaların bu enzime sahip olup olmadıklarının araştırılması tanılama açısından önemli olup bu test özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerde daha da önemlidir.

2.5.7. Oksidaz testi

Elektron transferinde bakterilerin sitokrom c proteinine sahip olup olmadıklarının tespit etmek amacıyla bu test uygulanır. Solunum işleminde sitokrom c proteini (oksidaz c) görev almakta ve elektron transfer sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek

hücre sel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır (Klement *et al.* 1990; Narayanasamy 1997; Saygılı 2006).

2.5.8. Nitrat testi

Obligat aerop bakteriler oksijenin varlığında nitrat kullanarak nitrit ve N₂ ye indirgerler. Ortamda bakteri gelişimi nitrat pozitif, gelişmemesi ise negatif olarak değerlendirilir (Klement *et al.* 1990). Ayrıca bakterilerin geliştiği katmana bakılarak fakültatif aerop, fakültatif anaerop şeklinde gruplandırılır.

B-Moleküler Testler

2.5.9. BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda, prokaryot ve ökaryotların büyük bölümünün genomlarında bir çok tekrarlı repetetive DNA dizisinin bulunduğu tespit edildi. Hücre bölünmesinde fonksiyonu olduğu düşünülen bu diziler, zirai, çevresel, endüstriyel, kliniksel bakterilerin tür, alttür, biovar ve hatta patovar seviyesinde tanısı ,sınıflandırılması ve karakterizasyonunda kullanılmakta olup, rep-PCR (Repetetive Extragenic Palindromic) genomik parmak izi analiz yöntemi olarak adlandırılmaktadır. İlk defa bakteriler üzerinde uygulanan bu teknik, son zamanlarda fungal bitki patojenlerinin populasyon biyolojilerinin belirlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Bu diziler tekrarlı ekstragenik polindromik (REP), enterobakteriyal tekrarlı intergenik korunu diziler (ERIC) ve ilk kez gram pozitif bir bakteri olan, *Streptococcus pneumonia* da tanımlanan box A, box B, box C alt ünitelerinden oluşan BOX elementlerinden ibaret olup , bu yöntemlerin tümüne birden rep-PCR ad verilmektedir (Rademaker *et al.* 1998; Stead *et al.* 1998; Miteva *et al.* 1999; Smith *et al.* 2001; Banke and McDonald 2001). Intergenik tekrarlı elementler ilk kez *E. coli* tls geninin 3' ucunun analizi esnasında tanımlanmıştır (Sharples and Lloyd 1990). Daha sonra yapılan laboratuvar araştırmalarında bu dizilere *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio cholerae* gibi enterobakteriyal türlerde de rastlanmış ve bu elementlere ERIC adı verilmiştir. Bu diziler nükleotid açısından iyi derecede

korunan bölgeler olmalarına karşın, kromozomlardaki yerleri türden türe farklılık göstermektedir (Hulton *et al.* 1991). Actinomycetes lerin, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çoğunun genomlarında, sıralar büyük oranda korunmuş olan çok kopyalı tekrarlı diziler bulunmakta olup, rep-PCR primerleri bu dizilere göre tasarlanmıştır. Bu diziler, genomda farklı bölgelerde ve her iki oryantasyonda da bulunurlar ve bunlar n PCR reaksiyonlar ile belirlenebilmesi için REP ve ERIC elementleri için birbirlerine ters yönde iki, BOX elementleri için tek bir primer tasarlanmıştır (Versalovic *et al.* 1991; Lupski ve Weinstock 1992; Versalovic *et al.* 1994; Koeuth *et al.* 1995; Rademaker *et al.* 1998; Louws *et al.* 1998; Seurinck *et al.* 2003; Mkandawire *et al.* 2004). Bu primerler ve PCR yöntemleri kullanılarak REP (Repetitive Extragenic Palindrome), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), ve BOX elementleri arasında yerleşmiş olan farklı genomik bölgelerin seçici olarak amplifikasyonu gerçekleştirilmekte ve elde edilen profillerin karşılaştırılması ile aynı türe ait olan strainler arasındaki farklılık ortaya çıkarılmaktadır. rep-PCR yöntemi ekosistemdeki çeşitliliği araştırmada, strainler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymada ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmalar ayırmada oldukça etkin ve basit bir yöntemdir (Rademaker *et al.* 1998). Temel olarak bakıldığında üç farklı tekrarlı dizi belirlenmiştir. Bunlar; 35-40 bp uzunluğundaki tekrarlı ekstrasjenik palindromik (REP) dizileri, 124-127 bp lik enterobakteriyal tekrarlı genler arasındaki interjenik korunmuş (ERIC) dizileri, ve 154 bp lik BOX elementleridir (Versalovic *et al.* 1994; Rademaker *et al.* 1998). Bu elementler, genom etrafındaki interjenik bölgede veya kromozom üzerindeki oryantasyon bölgesinde görülebilirler. ERIC, REP ve BOX PCR metotları popülasyonlardaki genetiksel çeşitliliğin ortaya konulmasında önemli bilgiler vermektedir. Bu yöntemlerden BOX PCR reaksiyon şartlarında oluşabilecek inhibitör bileşiklere karşı ERIC PCR a göre daha az duyarlıdır. rep PCR hızlı bir yöntem olup, REP, ERIC ve BOX PCR yöntemleri termocycle şartlarında ve primerlerindeki farklılıkların dışında özdeş yöntemlerdir (Louws and Cuppels 2001).

2.5.10. 16S rDNA Geninin Klonlanması

16S rRNA geni, yapısında tüm bakteri genomunda olan değişmeyen bölgelerle birlikte, her bakteri genomunda kendine özgü olan değişken bölgeler bulundurur. Bakteri teşhisinde değişken bölgeler kullanılıyor olup, 16S rRNA geninde 8 adet korunmuş değişmeyen bölge ile, 9 adet benzersiz değişken bölge bulunmaktadır (Gary *et al.* 1984). Korunmuş bölgeler primer çoğaltma teknikleri için büyük ölçüde uygulanabilir başlangıç bölgeleri sağlarken, benzersiz değişken bölgeler de bakteriler arası filogenetik ilişkiyi belirlemede kullanılır (İnan 2005). 16S rDNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla özel primerler kullanılarak çoğaltılması ve 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır (Dülger 2003).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. 1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullandığım alet ve cihazlar:

Santrifüj (Eppendorf, GERMANY, 5414 D, SN 5425-40112)

Sterilizatör (Nüve, TÜRKİYE, FN 500, SN 303-3051)

Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

Inkübator (Nüve, TÜRKİYE, ES 500, SN 03-0591)

Mikroskop (Olympus, JAPAN, B x 50, OD04368)

Steril Kabin (Labcaire, UK, SN TC12-034)

Çalkalayıcı (Thermoshake, Gerhard, GERMANY, SN 4002319)
 Magnetik Karıştırıcı (Niive, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083)
 pH Metre (Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)
 Derin Dondurucu (Nuaire, U. S. A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)
 Hassas Terazı (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42-90908239)
 Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
 Saf Su Cihazı (Ateks, 7x35, Eu)
 Mini Karıştırıcı (IKA, U.S.A., M51, SN 03017581)
 PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
 Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
 Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
 Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir:

Nutrient broth: 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) 1 L steril distile su içerisine eklendi. Besiyeri otoklavda 121 °C de 15 dak. steril edildi.

Nutrient agar: 1 L distile su içerisine 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C de 15 dak. steril edildi. 45°C ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

Lauryl broth (LB): 1 L distile su'ya 10 g pepton, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract katıldı. Sıvı besiyeri otoklavda 121°C de 15 dak. steril edildi.

%30'luk Gliserol: 70 ml steril distile su içerisine 30 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121°C de 15 dak. steril edilerek hazırlandı.

Lugol solüsyonu: 1 g iyot ve 2 g KCl tartıldı, toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Nitrat besiyeri: 1 L distile suya 10 g pepton (Difco), 5 g NaCl, 2 g KNO₃ ve 3g agar katıldı ve agar çözülünceye kadar karışım kaynatıldı. pH'sı NaOH ile 7'ye ayarlanarak 3'er ml'lik tüplere aktarılıp ağızları pamuk tıkaçlarla kapatıldı. Otoklavda 121°C de 15 dak. steril edildi.

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

%7'lik H₂O₂ çözeltisi: 7 ml H₂O₂'nin hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Kristal violet: 0,5 g kristal violet (gentian violet), 100ml steril saf su içinde çözülerek hazırlandı.

Malaşit yeşili: 5 g malaşit yeşili (oksalat tuzu), 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlandı.

%0,25 Safranin: 0,25 g safranin, 100ml steril saf su içinde çözülerek hazırlandı.

Nutrient strach agar (NAS): 23 g nutrient agar (Difco) ve 10 g %1'lik nişasta 1 L saf su içerisine konularak otoklavda 121°C de 15 dak steril edildi. Sterilizasyon sonrası 45°C'ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere döküldü ve katılaşması sağlandı.

STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH 8 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl' nin 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Otoklavda steril edildi.

1XTE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'nin 100 ml saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildi ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide) 0,7 M NaCl çözeltisi: 80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. -20°C de muhafaza edildi.

Proteinaz K: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C de muhafaza edildi.

Bovine serum albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20°C de muhafaza edildi.

5xTBE Tamponu (pH: 8): 54 g Tris, 27,5 g borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA 500 ml steril distile su içerisinde çözündükten sonra karışımın pH'si 8'e ayarlandı. Toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

5XTAE Tamponu (pH: 8): 24,2 g Tris, 5,71 ml glacial asetik asit, 10ml 0,5 M EDTA, 500 ml steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH'si 8'e ayarlandı. Toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

1xTBE Tamponu: 100 ml 5xTBE' nin hacmi steril distile su 1L'ye tamamlanarak hazırlandı.

1xTAE Tamponu: 100 ml 5xTAE' nin hacmi steril distile su 1L'ye tamamlanarak hazırlandı.

Ethidium bromür çözeltisi: 100 ml distile su içerisinde 1 g ethidium bromür (10mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözüldü. Ağzı kapaklı bir erlen içinde karanlık şartlarda, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

6X yükleme tamponu: 100 ml için %100'lük gliserolden 40 ml alıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4 C de muhafaza edildi.

Gitschier tamponu: 200 ml için; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8,8)'den 67 ml, 1 M MgCl_2 'den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,8)' nin 1:100'lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14,4 ml P-mercapto-ethano Fun ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlanan solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml steril distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak 1,5 ml lik ependorf tüplerine paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de

muhafaza edilmiştir (Rademaker and Bruijn 1997).

Amfisilin Hazırlanması: Çözelti 1 ml su içerisinde 25 mg sodyum tuzlu amfisilin bulunacak şekilde hazırlandı. Filtrasyon yöntemiyle steril edilerek, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

CaCl₂'nin Hazırlanması: Çözelti 100 mM konsantrasyonda 200 ml olacak şekilde hazırlandı.

Kullanılan vektör: pGEM®-T Easy Vector kullanılmıştır.

Xgal: Bu çözelti 10 ml Dimetilformamide içerisinde 400 mg Xgal çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti kullanılıncaya kadar etrafı alüminyum folyo ile kaplanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

IPTG: Son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde hazırlanarak, filtrasyon yöntemiyle steril edilip kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan termofilik bakteriler

Bu çalışmada kullanılan termofilik bakteriler, Van'ın Erciş ilçesinin 20 km kuzeyinde bulunan Hasan Abdal Köyündeki termal tesisten, steril, ağzı kapaklı şişelere alınarak laboratuara getirilen su örneklerinden izole edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Örneklerin alınması ve termofilik bakterilerin izolasyonu

Çalışmada kullanılan su örnekleri, çalışma bölgesinde bulunan termal tesisten steril,

ağız kapaklı şişelere alınıp kaynakta sıcaklık ve pH değerleri tespit edildikten sonra en kısa süre içerisinde laboratuara getirildi. Bu kaplıca suları nutrient broth besi yerine inoküle edildi ve 55-56°C'ye ayarlı aerobik ve anaerobik inkübatörde 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılarak, bakterilerin üremeleri sağlandı. Daha sonra nutrient agar içeren petrilere 3-4 faz ekim yapılarak, birbirinden farklı olabileceği düşünülen koloniler saflaştırılarak uzun süreli muhafaza için, 1.5 ml' lik ependoflar içerisinde hazırlanan 500 ml gliserol ve 500 ml Lauren berttonni broth'dan ibaret karışım içerisine 2-3 öze dolusu mikroorganizma alınıp konuldu, vortekslendi. Hazırlanan bu stok kültürler kullanılmaya kadar kodlanarak (P22, P86, P13, P18, P19, P20, P27, P29, P17, P28, P33, P4, P15, P14, P16, P9, P56, P57, P58, P59, P60, P3) derin dondurucuda (-86°C) muhafaza edildi (Pask-Hughes and Williams 1977).

3.2.2. Morfolojik ve biyokimyasal testler

Çalışma bölgesinden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri tespit edildi. Aynı koşullar sağlanmak kaydıyla her bir test 3 kez tekrarlandı.

A. Morfolojik testler

Hücre morfolojisi: Stoklardan alınan saf bakteri strainleri, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine aktarıldıktan sonra 55-56°C de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanarak, kristal violet ile basit boyama yapıldı, 1 dakika bekleme periyodundan sonra boyanın fazlası suyla atıldı. Kurutulan preparat mikroskopta immersiyon objektifiyle incelendi (Saygılı 2007; Adıgüzel 2006).

Koloni morfolojisi: Saflaştırılan bakteriler çizgi ekim yöntemiyle nutrient agar besiyerine ekilerek, 56°C de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra koloni özellikleri incelendi (Adıgüzel 2006).

Hareket testi: Nutrient agar besiyerine ekilerek, 55-56°C'de bir gece inkübasyona bırakılan bakteri kültürlerinden bir öze dolusu alınarak içerisinde steril deiyonize suyun bulunduğu cam tüplere aktarıldı ve karışım homojenize edildikten sonra, bu süspansiyonlardan pastör pipeti ile lamel üzerine bir damla bırakıldı. Damla çukur lam üzerine çevrilerek bakterilerin hareketlilik durumu incelendi (Saygılı 2006).

Endospor testi: Saf bakteri strainleri stoklardan alınarak, çizgi ekimle nutrient agar besiyerine aktarıldıktan sonra 56°C de 24-48 saat süreyle üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlandı, 20 kez alevden geçirildi ve üzerleri tamamen boyayla kaplanacak şekilde malaşit yeşiliyle boyanarak, 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Soğuk su ile 10 sn muamele edildikten sonra, %0,25'lik safranin ile preparatın yüzeyi kaplandı ve 15 sn beklendi. Boyanın fazlası sudan geçirilerek atıldıktan sonra preparat kurutuldu ve mikroskopta immersiyon merceğiyle incelendi. Hücrenin pembe olarak boyanan kısımları vejetatif, yeşil olarak boyanan kısımları ise endospor bölgelerini göstermektedir (Temiz 1996).

B. Biyokimyasal testler

Gram reaksiyon testi: Bu testle, bakteri strainlerinin hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda steril lam üzerine, %3'lük KOH çözeltisinden bir iki damla damlatıldı, ardından öze ile alınan bakteri KOH çözeltisi ile 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırıldı. Eğer mikroorganizma gram negatif özellikte ise hücre duvarındaki peptidoglikan tabakası tek katlı olduğundan, teikoik asit içermediğinden dolayı KOH ile kolayca parçalandı ve sitoplazması ile onun içerisindeki DNA'sı serbest hale geçti. Bunun sonucunda da iplik şeklinde, viskoz bir uzama görüldü. Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan katmanı kalın olduğundan ve teikoik ve teikronik asit içerdiğinden dolayı KOH ile reaksiyona girmede ve öze yukarı doğru kaldırıldığında sulu bir hal aldığından uzama gözlemlenmedi. Bu sonuç negatif bir reaksiyon olarak değerlendirildi (Saygılı 2006).

Katalaz testi: Elde edilen strainlerin katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu testle tespit edilir. Aerobik veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Katalaz enzimi, solunum sonucunda meydana gelen hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijen gazına dönüştürür. Bu nedenle test için 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alındı ve üzerine 1 damla H_2O_2 ilave edilerek, kabarcık oluşturup oluşturmalarına bakıldı. Kabarcık oluşturma durumu pozitiflik, oluşturmama durumu ise negatiflik olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

Oksidaz testi: Elektron transferinde bakterilerin sitokrom-c proteinine sahip olup olmadıklarını tespit etmek amacıyla bu test uygulanır. Solunum işleminde sitokrom c proteini (oksidaz c) görev almakta ve elektron transfer sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek hücrel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır. Test için %1 tetra methyl-p-phenyldiamine dihydrochloride içeren diskler kullanılmaktadır. Öncelikle bu diskler 1 damla dH_2O ile doyuruldu ve sonra 24-48 saatlik bakteri ilave edildi. Bakteride sitokrom c proteini varsa bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. Bu durum pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişiminin görülmemesi ise negatiflik olarak not edildi (Adıgüzel 2006).

Nitrat testi: Obligat aerob bakteriler oksijenin varlığında nitratı kullanarak nitrit ve N_2 'ye indirgerler. Besi yeri için; 5 g NaCl, 10 g pepton, 2 g KNO_3 ve 3 g agar (Difco) kaynatılarak, 1 L distile deiyonize su içerisinde iyice çözüldü ve pH'sı NaOH ile 7'e ayarlandı. $121^\circ C$ 'de 15 dak süreyle otoklavlanan besiyerinden 3'er ml alınarak, 10 ml'lik steril test tüplerine aktarıldı ve donduktan sonra test edilecek strainler saplama ekim yöntemiyle besiyerine bulaştırıldı ve üzerleri otoklavlanarak, sıcaklığı $50^\circ C$ 'ye düşürülen %3'lük su agarı kapatıldı. Daha sonra tüplerin ağızları kontaminasyonu önlemek amacıyla pamuk tıkaçla kapatılarak, $55-69^\circ C$ 'de 2 gece inkübasyona bırakıldı. Ortamda bakteri gelişimi nitrat pozitif, gelişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990). Ayrıca bakterilerin geliştiği katmana bağlı olarak fakültatif aerob, fakültatif anaerob diye gruplandırıldı.

Nişasta hidroliz testi: Bakterilerin, nişasta molekülünü parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmede kullanılan amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek amacıyla bu test gerçekleştirildi. NAS besiyerine bakteriler nokta veya çizgi ekimle kontamine edildi. 2-3 günlük bir inkübasyon sonrasında bakteri kolonisinin etrafında görülen renk açıklığı amilaz + olarak değerlendirildi. Sonucun çıplak gözle fark edilememesi durumunda ise, lugol solüsyonundan (1g iyot, 2g KCl, 100 ml dH₂O) 5 ml kadar petrilere döküldü ve mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip ekim çizgileri etrafında açık renk oluşturanlar ise pozitif olarak değerlendirildi (Saygılı, 2006; Narayanasamy 1997).

3.2.3. Moleküler testler

3.2.3.1. Bakteri hücrelerinden genomik DNA'ların izolasyonu: Araştırmada kullanılan bakteri strainlerinin DNA izolasyonu aşağıdaki yönteme göre yapılmıştır (Adıgüzel 2006).

1. DNA'sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekildi, petrilere 56 °C ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
2. Steril edilmiş, ağız kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağılar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri ilave edildi.
3. Tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağılandı.
4. Vortekslenen tüpler 12 000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atıldı ve pelletin üzerine tekrar 1000 mikrolitre STE tamponu eklenerek, 5 dak. 12 000 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrarlandı.

5. Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılıp pellet üzerine 500 mikrolitre STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alınıp vermek suretiyle tamponun pelletle iyice karışması sağlandı.
6. Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 40 dakika süreyle inkübe edildi.
7. Su banyosundan çıkartılarak 50 mikrolitre %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 mikrolitre proteinaz K (proteinleri parçalar) ilave edildi ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 40 dakika süreyle inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 olacak şekilde 5 M NaCl ve 0,1 hacim %10 CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yi polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklendi.
9. Tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
10. Eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Kloroform, proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. Izoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilen tüpler 15 dakika oda sıcaklığında hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldı.
11. Tüpler 16 000 rpm'de 15 dak. santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarıldı. Her bir tüpe 0,1 hacim %10 CTAB / 0,7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elimine etmede kullanılır) ilave edildi.

12. 65°C' ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dak. bekletildi.
13. Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol eklendi ve tüpler 15 dak. oda sıcaklığında, hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı.
14. Tüpler 16 000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst faz yeni steril bir ependorfa alındı.
15. Üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA' yi bağlayarak, iplikçikler halinde çökmesini sağlar) eklendi.
16. Tüpler -20°C'de 1 saat süreyle bekletildi.
17. Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dakika santrifüjlendi.
18. Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 mikrolitre eklendi ve 15 000 rpm de 15 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz yavaşça döküldü.
19. Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 mikrolitre eklenerek, 15 000 rpm de 15 dak santrifüjlendi. Üst faz dikkatlice döküldü ve tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nin kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi.
20. Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 50 mikrolitre TE içinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek, iyice çözünmesi sağlandı ve üzerine 3 mikrolitre RNAz ilave edildi.
21. Kullanılincaya kadar -86°C de muhafaza edildi.

3.2.3.2.DNA konsantrasyon tespiti ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılarak belirlenirken, elde edilen genetiksel ürünün protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm’de ölçüm yapılarak tespit edildi. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konuldu. 260 nm’ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülerek elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edildi. Karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm’de absorbansı ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA’nın absorbans değeri bulundu. Yukarıda yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlandı. A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılarak $A_{260}/A_{280} = 1-1.7$ olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı.

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)= $A_{260} \times 500$ (Seyrelme Faktörü) $\times 50$ (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi.

3.2.3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

a) 16S rDNA bölgesinin PCR yardımıyla çoğaltılması

Primer çalışma konsantrasyonu (µM/ml): Primer konsantrasyonu, (nmol)/0,1 (100 µM/ml) formülü kullanılarak liyofilize halde bulunan primerleri çözmek için gerekli olan 1 X TE buffer miktarı belirlendi ve 100 µM/ml lik stok hazırlandı. Bundan da $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü kullanılarak, 5 µM/ml'lik primer çalışma solüsyonu hazırlandı ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Master mix'in hazırlanması: PCR'ı yapılacak her bir örnek için; 3 µl 10x PCR tamponu (100 mM Tris — HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0,01 jelatin pH: 8,3), 0,6 µl dNTP (deoksिनुकлеотидтрифосфатлар: dATP, dGTP, dCTP, dTTP — 10 mM), 2 µl

primer UNI 16S-L (forward ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA), 2 µl primer UNI 16S-R (reverse ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA), 1,5 µl BSA, 1,2 µl MgCl₂, 0,4 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 17,3 µl steril distile su ile 28 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 2 µl kalıp DNA (50 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl' ye tamamlandı. Master mix ve kalıp DNA içeren ependorf tüplerinde ki buharlaşmayı önlemek amacıyla 15 µl mineral oil ilave edildi.

PCR programı: Hazırlanan örnekler, 95°C de 2 dakika denetürasyon ile, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C de 1 dakika denatürasyon, 48°C de 1 dakika bağlanma ve 72°C de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 2,25 gr agaroz üzerine 150 ml 1X TBE tamponu ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 dak beklenerek jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve içerisinde 0,5xTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura , bant uzunluğu 50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000 olan PCR marker (Sigma D-7058)'dan 12 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 3 µl 6X yükleme tamponu, 27 µl PCR ürünü karıştırılarak pipetlendi.

Elektroforez jel düzeneği 70 volta ayarlanarak örnekler 2,5 saat yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, içerisinde etidium bromür solüsyonu bulunan bir kaba alınarak 1 saat inkübe edildi. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamında (Biolab, Quantity One Imaging and Analysis PDQest 2-D Gel Analysis Software, User Guide for Version 4.1 Windows) analiz edildi.

b) BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

1. 200 ml Gitschier Buffer (Rademaker and Bruijn, 1997).hazırlamak için; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8,8)'den 67 ml, 1 M MgCl'den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,8)'nın 1:100'lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14.4 ml β -mercapto-ethanol'un ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlanan solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml steril distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak 1,5 ml lik ependorf tüplere paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.
2. Primer konsantrasyonu (nmol)/0,1 (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$) formülü kullanılarak liyofilize halde bulunan primerleri çözmek için gerekli olan 1XTE buffer miktarı belirlendi ve 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ lik stok hazırlandı. Bundan da $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü kullanılarak, 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 'lik primer çalışma solüsyonu hazırlandı ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edildi.
3. 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20°C 'de muhafaza edildi.
4. Örnekler Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) cihazına konarak, denatürasyon basamağında 95°C de 7 dakika ve takip eden denatürasyon 94°C de 1 dakika, bağlama basamağında 53°C de 1 dakika ve uzama basamağında 65°C de 8 dakika olmak üzere, bu toplam 35 tekrar olacak şekilde ve son tekrarda uzama basamagında 65°C de 16 dakika olacak şekilde programlanmış ve istenen DNA bölgeleri çoğaltılmıştır.

BOX PCR ürünlerinin elektroforezi: 2,25 g agaroz üzerine 150 ml 0.5XTAE tamponu ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C 'ye kadar soğutulan agarose jel, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 dak beklenerek jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar

dikkatlice çıkarıldı ve içinde 0.5xTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, bant uzunluğu 50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000 olan PCR marker (Sigma D-7058)'dan 12 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 3 µl 6X yükleme tamponu, 27 µl PCR ürünü karıştırılarak pipetlendi.

Elektroforez jel düzeneği 40 volta ayarlanarak örnekler 5 saat yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, içerisinde etidium bromür solüsyonu bulunan bir kaba alınarak 1 saat inkübe edildi. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamında (Biolab, Quantity One Imaging and Analysis PDQest 2-D Gel Analysis Software, User Guide for Version 4.1 Windows) analiz edildi.

Sonuçların istatistikî olarak değerlendirilmesi: Denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmış ve elde edilen değerler SPSS 11.0 istatistik programı kullanılarak Jaccard'ın yakın komşuluk metodu kullanılarak analiz edilmiştir (Yıldız 1991).

3.2.3.4 16S rDNA Geninin Klonlanması, Sekans Analizi ve Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırılması

16S-23S rDNA PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rDNA genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti (Promega, A1360) kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla Güney Kore'de bulunan MacroGen firması tarafından belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1398 - 1412 bp uzunluğundaki 16S rDNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle

karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları tespit edilerek gen bankası kabul numaraları alındı.

.ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, Van'ın Erçiş ilçesinin 20 km uzağında bulunan Hasan Abdal kaplıcasından alınan su örneklerinden toplam 22 termofilik bakteri izole edilerek bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı.

4.1. Termofilik Bakterilerin Klasik Fenotipik Özellikleri

İzole edilen suşların hücre şekli, koloni rengi, hareket özelliği ve endospor oluşturup oluşturamama gibi morfolojik özelliklerine ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Hareket ve endospor testleri sonucunda incelenen tüm mikroorganizmaların hareketli ve endospor pozitif oldukları tespit edilmiştir. Basit boyama sonucu hazırlanan preparatların mikroskopik incelenmeleri sonucunda tüm suşların çubuk şeklinde bir görünüme sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca NA besiyerine ekilen bakterilerin tamamının krem renkte kolonilere sahip oldukları görülmüştür.

Çizelge 4.1 Hasan Abdal Kaplıcasından İzole edilen Termofilik bakterilerin klasik fenotipik özellikleri

Bakteri Kodu	Gram Testi	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Hareket Testi	O ₂ Gerekсинimi	Nitrat Testi	Amilaz Testi	Endospor Testi	Koloni Rengi	Hücre Şekli	NaCl'de Üreme							
											%2	%4	%5	%6	%7	%8	%9	%10
P22	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P86	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P13	+	+	+	+	Fakültatif	+	+	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P18	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P19	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P20	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P27	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P29	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P17	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P28	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P33	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P4	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P15	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P14	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P16	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P9	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P56	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P57	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P58	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P59	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P60	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-
P35	+	+	+	+	Fakültatif	+	-	+	Krem	Çubuk	+	+	+	+	+	+	-	-

Çizelge 4.2. Hasan Abdal Kaplıcasından İzole edilen Termofilik bakterilerin klasik fenotipik özellikleri

Bakteri Kodu	Farklı pH Değerlerinde Üreme										Farklı Sıcaklık Değerlerinde Üreme					
	5,0	5,5	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	11,5	30 °C	40 °C	56 °C	60 °C	65 °C	70 °C
P22	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
P86	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P13	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P18	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P19	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
P20	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
P27	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P29	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P17	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P28	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P33	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P15	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
P14	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
P16	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P9	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
P56	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P57	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
P58	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
P59	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P60	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
P35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-

Farklı sıcaklık değerlerinde (30, 40, 56, 60, 65 ve 70°C) yapılan çalışmalar sonucunda, test mikroorganizmalarının optimum büyüme sıcaklığının 56°C olduğu, 65-75°C de büyüme aktivitesi gösteremedikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Yapılan pH ve tuzluluk testleri sonucunda, tüm bakteriler için optimum pH aralığı değerleri 7,5-8,5 ve tuz konsantrasyonları değerleri ise %2-8 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Yapılan analizler sonucunda tüm bakterilerin Gram, katalaz, oksidaz, hareket, nitrat, endospor özellikleri yönünden pozitif, oksijen gereksinimleri bakımından fakültatif anaerob oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

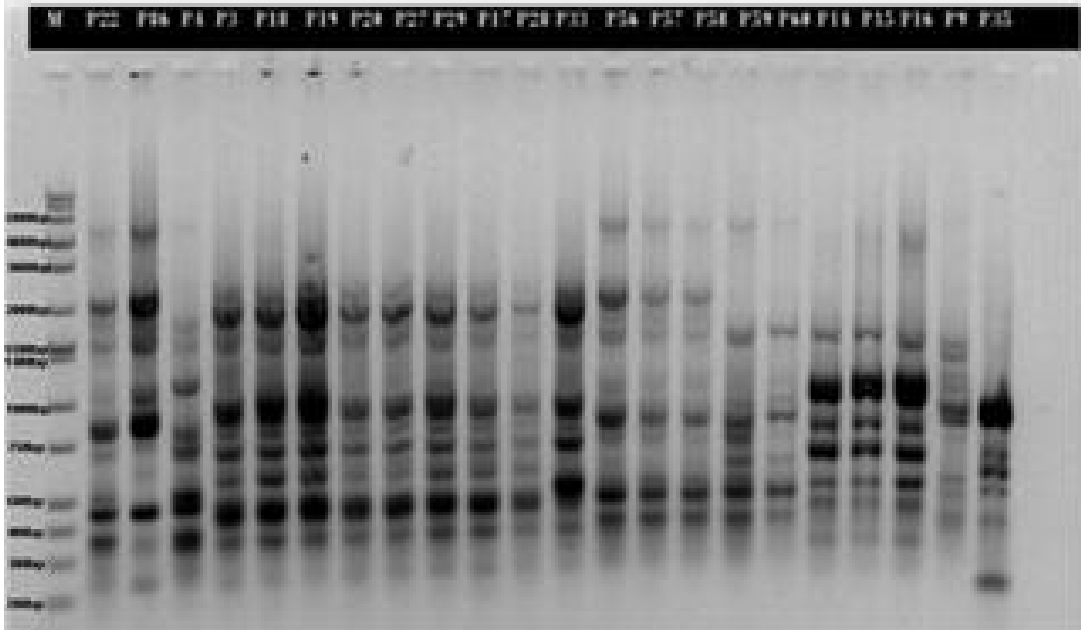
Amilaz testinde ise P13 kodlu bakterinin amilaz pozitif, diğerlerinin ise amilaz negatif oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.1.).

4.2. Termofilik Bakterilerin Bazı Genetiksel Özellikleri:

4.2.1. BOX PCR Amplifikasyon Sonuçları

Test edilen termofilik bakteri suşlarının BOX PCR sonuçları şekil 4.1.'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre; P22'nin 4500, 2000, 1500, 1100, 750, 700, 500, 450, 350 bp uzunluğunda 9 bant, P86'nın 4500, 2000, 1500, 1100, 800, 750, 600, 450, 350 bp uzunluğunda 9 bant, P59'nin 4800, 2500, 1800, 1300, 1000, 800, 700, 550, 450, 380 bp uzunluğunda 10 bant, P57'nin 4800, 2500, 1800, 1300, 1000, 800, 700, 550, 450, 380 bp uzunluğunda 10 bant, P58'in 4800, 2500, 1800, 1300, 1000, 800, 700, 550, 450, 380 bp uzunluğunda 10 bant, P56'un 4800, 2400, 1000, 900, 800, 700, 600, 550, 450 bp uzunluğunda 9 bant, P60'ın 4800, 1850, 1300, 950, 750, 700, 550, 450 bp uzunluğunda 8 bant, P14'ün 1800, 1200, 980, 700, 600, 500 bp uzunluğunda 6 bant, P15'in 1800, 1200, 980, 700, 600, 500 bp uzunluğunda 6 bant, P16'nın 1600, 1300, 970, 700, 650, 600, 500 bp uzunluğunda 7 bant, P4'ün 4700, 1700, 1200, 800, 700, 550, 480, 380, 350

bç uzunluğunda 9 bant verdiği, P13'ün 2000, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant, P18'in 2010, 1800, 1500, 1430, 950, 800, 730, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant verdiği, P19'un 2010, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant, P20'nin 2000, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380, bç uzunluğunda 10 bant, P27'nin 2050, 1800, 1500, 1300, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant verdiği, P29'un 2000, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant verdiği, P17'nin 2000, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant verdiği, P28'in 2000, 1800, 1500, 1450, 950, 800, 750, 550, 450, 380 bç uzunluğunda 10 bant, P35'in 1200, 800, 700, 680, 480 bç uzunluğunda 5 bant, P9'un ise 1600, 1550, 1350, 1300, 1200, 1000, 900, 700, 680 bç uzunluğunda 9 bant verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.).

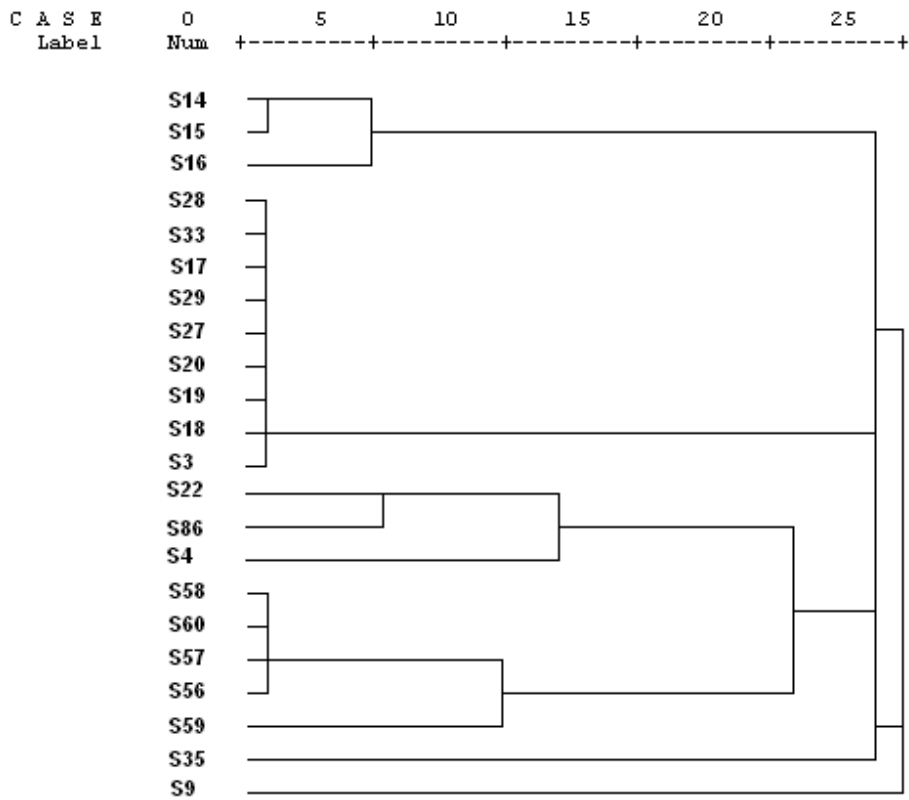


Şekil 4.1. Termofilik bakterilerin BOX PCR elektroforez sonuçları: M: Marker, Hat1: P22, Hat2: P86, Hat3: P4, Hat4: P13, Hat5: P18, Hat6: P19, Hat7: P20, Hat8: P27, Hat9: P29, Hat10: P17, Hat11: P28, Hat12: P33, Hat13: P59, Hat14: P57, Hat15: P58, Hat16: P56, Hat17: P60, Hat18: P14, Hat19: P15, Hat20: P16, Hat21: P9, Hat22: P35

4.2.2.BOX PCR Sonuçlarına Göre Cluster Analizi

BOX PCR cluster analizi sonucunda, test edilen bakterilerin toplam 5 gruba ayrıldığı

gözlenmiştir. Birinci grup üç (P14, P15, P16), ikinci grup dokuz (P17, P27, P29, P18, P19, P28, P20, P13, P33), üçüncü grup sekiz (P4, P86, P22, P56, P57, P58, P59, P60), dördüncü (P35) ve beşinci (P9) gruplar ise birer alt grupla temsil edilmiştir. Bundan yararlanarak her bir kümeyi temsil eden örnekler seçilerek dizin analizleri için klonlama işlemine geçilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Termofilik Bakterilerin BOX PCR Cluster Analiz Sonuçları

4.2.3. 16S rDNA PCR amplifikasyon sonuçları

Yapılan klasik testler sonucunda *Bacillus* cinsine ait oldukları tespit edilen test mikroorganizmalarının 16S-23S rDNA PCR analiz verileri incelendiğinde tüm isolatların 1400-1500 bp arasında bant verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).

4.2.4 İzolatların 16S rDNA Genlerinin Baz Dizileri

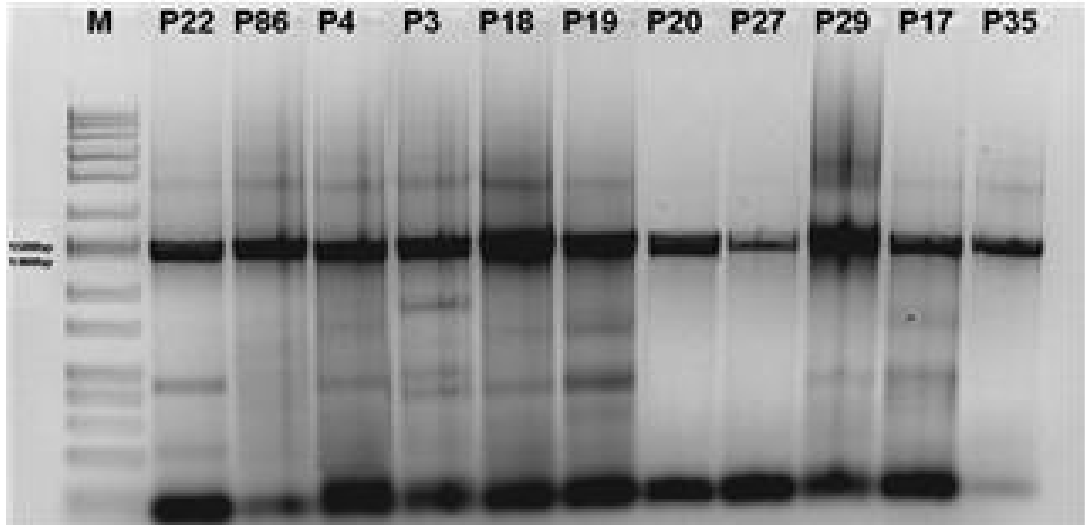
Hasanabdal kaplıcasından izole edilen 22 izolattan, BOX-PCR cluster analiz sonucuna göre her gruptan seçilen toplam 7 adet bakterinin 16S rDNA genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rDNA gen dizileri, Genbank'ta var olan diğer bakteriyel 16S rDNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalar sonucunda, 3 izolatın (P4, P22 ve P86) *Geobacillus pallidus*, sırasıyla birer izolatın (P13, P14, P9 ve P35) *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus brevis*, *B. pumilus* ve *Br. borstelensis* olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 16S rDNA gen dizilerinin gen bankasındaki dizilerle olan benzerlik oranları, kabul numaraları ve gen bankasına girilen nükleotit sayıları Çizelge 4.3 de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzole edilen bakterilerden elde edilen 16S rDNA gen dizileri ile gen bankasındaki 16S rDNA gen dizilerinin karşılaştırılması.

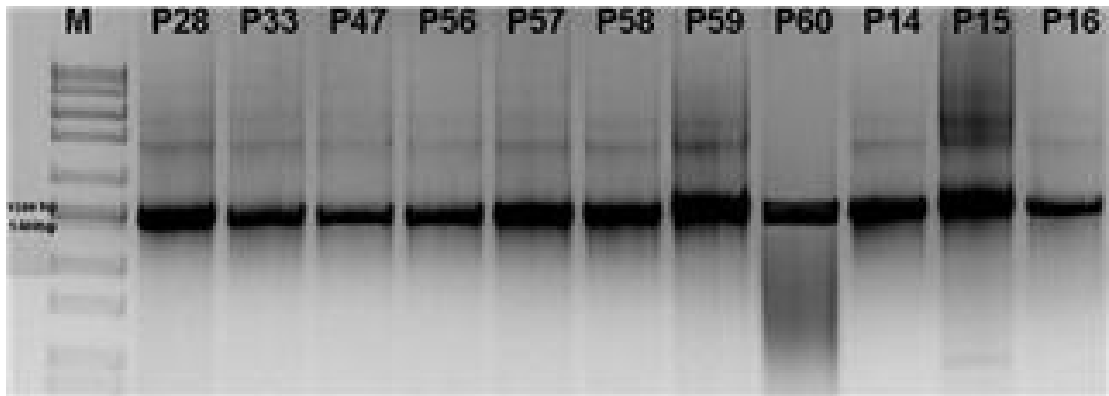
Sequence				
Test	Gen Bankası	Nükleotid Sayısı*	Benzerlik**	En Yakın Filogenetik
P22	FJ417405	1409	99%	<i>Geobacillus pallidus</i>
P86	FJ417407	1413	99%	<i>Geobacillus pallidus</i>
P4	FJ417401	1413	99%	<i>Geobacillus pallidus</i>
P13	FJ417403	1412	99%	<i>Bacillus licheniformis</i>
P14	FJ417404	1398	99%	<i>Brevibacillus brevis</i>
P9	FJ417402	1410	99%	<i>Bacillus pumilus</i>
P35	FJ417406	1398	99%	<i>Brevibacillus borstelensis</i>

* Eşleştirme için kullanılan 16S rDNA nükleotid sayısı

** En yakın filogenetik türün 16S rDNA dizisi ile benzerlik oranı



Şekil 4.3. Termofilik bakterilerin 16S rDNA PCR elektroforez sonuçları: M: marker; 1. Hat: P22, 2. Hat: P86, 3. Hat: P4, 4. Hat: P13, 5. Hat: P18, 6. Hat: P19, 7. Hat: P20, 8. Hat: P27, 9. Hat: P29, 10. Hat: P17, 11. Hat: P35 olup tamamı 1400-1500 bp uzunluğunda tek bant vermiştir.



Şekil 4.4. Termofilik bakterilerin 16S rDNA PCR elektroforez sonuçları: M: marker; 1. Hat: P28, 2. Hat: P33, 3. Hat: P47, 4. Hat: P59, 5. Hat: P57, 6. Hat: P58, 7. Hat: P56, 8. Hat: P60, 9. Hat: P14, 10. Hat: P15, 11. Hat: P16 olup tamamı 1400-1500 bp uzunluğunda tek bant vermiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde yaşadığımız biyosferin önemli bir parçasını mikroorganizmalar oluşturuyor olup, bu canlılardan hastalık etmeni olanlar ve besin üretenlerin dışında kalanların hala tanımlanamamış olduğu bildirilmektedir. Ancak mikrobiyal dünyada her geçen gün yeni türler izole edilmektedir ve yaşam devam ettikçe de yeni türler araştırılmaya devam edecektir. Ülkemizde taksonomik, filogenetik ve endüstriyel enzimlerin izolasyonları ve uygulama alanlarının tespitine yönelik birçok çalışma mevcuttur.

Günümüzde bakteri teşhisinde moleküler tekniklerle yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Tür tayini çalışmalarında, klasik metodlar sonucu bulunan bulguların desteklenmesi sonucun güvenilirliği açısından önemlidir.

Bu çalışmada Van iline bağlı Erciş ilçesine 20 km uzaklıkta bulunan Hasanabdal Köyünde bulunan Hasanabdal termal kaplıcalarından toplam 20 bakteri straini izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyal strainlerin Mikrobiyal Tanı Sistemi ile tanımlanması sonucunda 5 farklı strain belirlenmiştir. İzole edilen termofilik bakteriler *Bacillus* ve *Bacillus* genusundan yeni ayrılan *Geobacillus* genusu üyeleridir. *Bacillus* ve *Geobacillus* genusu üyesi mikroorganizmalar morfolojik, fenotipik ve genetiksel olarak birbirinden farklı özellik göstermektedir.

Nazina ve arkadaşları Rusya, Kazakistan ve Çin’de bulunan petrol bölgelerinde oluşan sülardan, termofilik, hareketli, endospor oluşturan, aerobik veya fakültatif anaerob 5 suş elde etmişlerdir. 16S rRNA ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonuçlarında bu izolatları yeni bir cins içindeki iki farklı tür olarak belirlemişlerdir. Bunları *Geobacillus uzenensis*, ve *Geobacillus subteraneus* şeklinde isimlendirmişlerdir. Bununla birlikte, önceden *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasis* ve *Bacillus thermodenitrificans* olarak bilinen türlerinde bu yeni cinse dahil edilmesini teklif etmişlerdir. Nazina ve arkadaşları *Geobacillus* cinsinin genel özelliklerini şu şekilde belirtmiştir; çubuk şeklinde, endospor oluşturabilen,

hareketli yada hareketsiz, gram (+) olup bazen gram (-) örneklerine rastlanabilen, terminal veya subterminal endosporlu, kemoorganotrof, aerobik yada fakültatif anaerob, zorunlu termofilik, gelişim sıcaklığı 35-75°C arasında olup, optimum 55-65°C arasında, nötrofilik, pH aralığı 6-8,5 arası olup, optimum 6,2-7,5 arasında, katalaz (+), genus üyelerinin 16S rRNA gen dizisi benzerlik oranı % 96,5 'den fazla olan ve doğada yaygın olarak bulunan bir genus olarak belirtmişlerdir.

Bacillus genusu üyeleri ile *Geobacillus* genusu üyelerinde benzerlik oranı oldukça fazladır. (2006) yılında Fattah ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Mısır'ın Toshki çölünden yaz aylarında yeni bir bakteri türü izole etmişlerdir. Gram(+), endospor forma sahip, 40-70°C arasında büyüeyebilen, 65°C optimum sıcaklığa sahip, glikoz, arabinoz ve fruktozu karbon kaynağı gibi kullanırken, yağ, jelatin, kazein ve nişastayıda hidrolize edebilir özellikteki suşu, 16S rDNA dizi analizi ile tanımladılar ve sonrasında lipaz genini T/A klonlama vektörü ile E.coli'ye expresse ettiler. Yaptıkları bu çalışmalardan sonra suşun % 98 oranında *G.thermoleovorans* olduğunu belirttiler. Benzer uygulamalarla yapılan bir başka çalışmada da *B.thermoleovorans* ID-1 lipaz geninde *G.thermoleovorans* Thoshki lipaz geniyle % 87 benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır (Lee *et al.* 2001).

Yaptığımız çalışmada öncelikle izole ettiğimiz suşlarımızın tanı ve karakterizasyonu için morfolojik ve fizyolojik özelliklerini tespit edip, bunlardan sonra sadece morfolojik ve fenotipik karakterler dikkate alınarak yapılan sınıflandırmanın kesin ve tam bir tanı sonucu vermeyeceğini düşünerek, bu çalışmalara ek olarak genotipik yöntemleri uygulamaya çalıştık (Guillorit- Rondeav *et al.* 1996; Schena 2000).

(2004) yılında Ağrı ve Balıkesir' de Beldüz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, çamur ve sıcak su örneklerinden izole ettikleri termofilik bakteri strainlerinin morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle tanısını yapmışlardır. Bu tanı sonucunda strainlerin krem koloni rengine sahip, çubuk formda, endospor oluşturan, hareketli, fakültatif anaerob, gram (+), katalaz (+) ve amilaz (+) olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan morfolojik testler sonucunda strainlerin *Anoxybacillus* genusunda olduğunu ancak bunların bu

genusa ait yeni bir tür olduğu kanısına varmışlardır. Fakat yaptıkları çalışmanın güvenilirliği açısından morfolojik testlerin yetersizliğine inanıp, moleküler testler yaparak sonuçlarını desteklemişler ve iki yeni türün teşhisini yapmışlardır.

Benzer şekilde (2003) yılında Başbülbul'un Aydın bölgesi jeotermal sularında yapmış oldukları çalışma sonucunda, elindeki suşların yalnızca fenotipik ve morfolojik özelliklerini incelemiş ve bu örneklerin ikisini *Bacillus stearothermophilus*, diğer ikisini de *Bacillus sp.* olarak tanılamıştır. Ancak çalışmanın sonucunda moleküler testlerle çalışmanın desteklenmesi gerektiğini bildirmiştir.

Son yıllarda bakteriyal strainlerin familya, cins ve tür düzeyinde tespitinde genomik profillemeye yöntemi (PCR) yaygın olarak kullanılmakta olup, bu yöntemlerden 16S rRNA ve 16S-23S rDNA baz dizi analizi yöntemi özellikle kültüre edilmemiş mikroorganizmaların sınıflandırılmasında bilim dünyasına önemli avantajlar sağlamıştır (Adıgüzel 2006). Bu çalışmada mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonları için 16S rRNA dizi analizi, BOX PCR ve 16S gen bölgesinin klonlanması ile sekans analizi yöntemleri kullanılmıştır.

Bakterilerde 16S rRNA bölgesi korunmuş bölge olarak kabul edilmektedir (Lane vd., 1985) ve 16S rRNA gen dizisi açısından % 95'den fazla benzerlik bulunan bakterilerin aynı cinse ait türler olduğu kabul edilmektedir (Ludwig *et al.* 1998).

16S rRNA PCR yöntemi, genomik DNA üzerindeki rRNA ve tRNA genleri ve bu genler arasındaki intergenik bölgelerin amplifikasyonu esasına dayanmaktadır. rRNA'nın her bir bakteri türünde bulunduracağı kopya sayısı ve ihtiva ettiğı baz sayılarının farklı olduğu kabul edilmekte ve mikroorganizmaların tanı ve araştırılmasında yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Lee *et al.* 1997; Dönmez 2004).

Bu çalışmada PCR' de çoğaltılan 16S rRNA genlerinin elektroforez jelinde yürütülmesi sonucunda tüm suşların 1400-1500 bp arasına tek bant verdikleri görülmüştür.

Sonrasında bu bölge PGEMT vektörüyle E.coli' de klonlanıp baz dizisi ortaya çıkarılmış ve morfolojik olarak benzer özellikler gösteren S17, S27, S29, S18, S19, S28, S20, S3, S33 izolatlarının %97 oranında benzer olup, *Bacillus licheniformis* suşları olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde S14, S15, S16 suşlarının % 97 oranında *Brevibacillus brevis*, S4, S86, S22, S56, S57, S58 suşlarının aynı oranda *Geobacillus pallidus*, S35'in %97 oranında *Brevibacillus borstelensis* ve S9'un da *Bacillus pumilus* olduğu sonucuna varıldı.

Benzer bir çalışma (2008) yılında Mohammed ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar Tunus'un Sfax bölgesinde bulunan yüksek termal özellik gösteren petrol alanlarında C5 strainin izole etmişlerdir. Yaptıkları morfolojik analizler sonucunda bu suşun gram(+), aerobik, termofilik, % 2-3 NaCl' de yaşayabilen, 25-70°C gelişim gösteriyor olup, optimum sıcaklığı 50°C olan, karbonu enerji kaynağı olarak kullanabilen bir suş olduğunu belirlemişlerdir. Fenotipik özellikleri bakımından *Geobacillus* genusunun üyesi olduğuna karar verdikleri suşun 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda %99 oranında *Geobacillus pallidus* olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan bu çalışma bizim yaptığımız çalışma ile benzer olup, moleküler çalışmanın desteklediğini göstermiştir.

Yine (2004) yılında Goto ve arkadaşları' nın moleküler tanımlama üzerine yaptıkları bir çalışmanın sonucunda DSM 6472 no'lu kodun suşun genotipik olarak ve kemotaksonomik olarak *Brevibacillus* genusu özelliklerini gösterdiğini belirlemişlerdir. Ancak sonrasında yaptıkları 16S rDNA dizi analizi sonucunda bu suşun % 95,4-98,8 arası değerinde *Brevibacillus brevis* olacağını belirttiler ve son olarakta DNA-DNA hibridizasyonu ile sonuçlarını desteklemişlerdir (Goto *et al.* 2004).

(2008) yılında Haghighat ve arkadaşlarının Tahran rafinelerinde yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri gram (+) özellik gösteren izolatların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakmışlar ve sonrasında elde ettikleri verileri Bergey's Manuel'in taksonomik sınıflandırmasıyla karşılaştırmışlardır. Son olarakta eldeki verileri 16S rRNA dizi analizi ile desteklemişlerdir. Sonuç olarak bu suşların %99 *Bacillus*

licheniformis ve *Bacillus subtilis* olduğunu belirlediler.

16S rRNA dizi analizi moleküler yöntemi birçok çalışmada başarılı ve doğru sonuçlar vermiştir. Ancak (2004) yılında Mirada ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada termofilik *Petrotoga mobilis*, *P.sibirica*, *P.mioterma* ve *P.olearia* ile METR^T suşu karşılaştırılmıştır. Her birinin 16S rRNA gen dizi analizi yapılmış ve bunun sonucunda bu suşun % 97,6'dan fazla *Petrotoga* türlerine benzediği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak sonrasında yapmış oldukları DNA-DNA hibridizasyon çalışması sonucunda bu benzerliğin %70' den daha az seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Moleküler çalışmalarda böyle bir örneklede karşılaşılmıştır (Miranda 2004).

Yapmış olduğumuz çalışmada fenotipik özellikler, 16S rRNA PCR sonucu, BOX sonucu ve 16S bölgesi klonlanması sonucunda gen bank'dan gelen sekans analizleri birbirini desteklemiştir. Bunun sonucunda üç bakteri suşunun *Brevibacillus brevis*, altı bakteri suşunun *Geobacillus pallidus*, birinin *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* ve yine birinin *Brevibacillus borstelensis* olduğu sonucuna varılmıştır.

İzole edilen bu bakteriler endüstri ve biyoteknolojide oldukça büyük öneme sahip olup, bu izolatlardan elde edilecek enzimler, daha farklı araştırmalarda ve pek çok enzim çalışmalarında kullanılabilir. Endüstriyel açıdan öneme sahip enzimleri taşıyan termofilik bakterilerin bilime kazandırılması, dünya literatüründeki bakteri koleksiyonuna yeni türler eklemesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Analizleri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aguilar, A., 1996. Ekstremophile Research in The European Union: from Fundemantal Aspects to İndustrial Expectations. FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Aira, S.K. and Kilal, K. and İmanata, A., 1983. Cloning and Expression of Thermostable Alfa-Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1059-1065.
- Aktopraklıgil, D., 2003. Gen Klonlaması. Moleküler Biyoloji ve Yönlendirilmiş Mutageniz Temel Bilgiler ve Deneysel Uygulamalar, Ed: S.Mandacı ve S.Aygün. Gebze TÜBİTAK, Koceli, 34-46
- Aktümsek, A. ve Konuk, M., 2002. Canlılar Bilimi. Nobel Yayın Dağıtım, No: 386, 225s.
- Alp, A., 2003. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 11-12 Haziran, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, s388-390.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59(1), 143–169.
- Amend, J.P. and Shock, E.L., 2001. Energetics of Overall Metabolic Reactions of Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea and Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 25, 175-243.
- Aravalli, R.N. and She, Q. and Garrette, R.A., 1998. Archaea and The New Age of Microorganisms. Tree, 13(5), 190-199.
- Arda, M., 1994. Biyoteknoloji; Bazı Temel İlkeleri. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Arı, Ş., 1999. DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi(BİYOGEN), İstanbul, 57-68.
- Babich, H. and Stotzky, G., 1987. Adv. Appl. Microbiol., 23, 55-117.
- Balows, A. and Truper H.G, and Dworkin, M. and Harder, W. and Schleiger, K.H. 1991. The Procaryotes, Vol 1, 75-76, 84-85
- Banerje, U.C. and Sani, R.K. and Azmi, W. and Soni, R., 1999. Thermostable Alkaline-protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as A Laundry Detergent Additive. Process Bio Chemistry, 35, 213-219.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Başbülbul, G., 2002. Aydın Yöresi jeotermal sularındaki Termofilik Bakterilerin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Beldüz, A.O. and Dulger, S. and Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium. Int. J. Syst.Evol. Microbiology, 53, 1315-1320.
- Blanc, M. and Marilley, L. and Beffa, T. and Aragno, M., 1997. Rapid Identification of Heterotrophic, Thermophilic, Spore Forming Bacteria Isolated from Hot Composts. International Journal of Systematic Bacteriology, 1246-1248.

- Blochl, E. and Rachel, R. and Burggraf, S. and Hafenbradl, D. and Jannasch, H.W. and Stetter, K.O., 1997. *Pyrolobus fumarii*, Gen. and sp. Nov, Represents A Novel Group of Archaea Extending The Upper Temperature Limit for Life to 113°C. *Extremophiles*, 1, 14-21.
- Bohannon, B.J.M. and Hughes, J., 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current Opinion in Microbiology*, 6:282–287.
- Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., Salzano, G., 2008. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 80, 1238–1248.
- Borup, B. 2001. Cysteme Biosynthesis and Sulfur Fixation in the Archaea. A Thesis in Chemistry. The Graduate School Department of Chemistry. Pennsylvania State University, USA.
- Brock, T.D., 1967. Life at High Temperatures. *Science*, 158, 1012-1019
- Brock, T.D., 1985. Life at High Temperatures. *Science*, 230, 132-138
- Brock, T.D., 1986. *Thermophiles*. A Willey-Interscience Publication, Ed: T.D.Brock. NewYork, 1-336.
- Brock, T.D., 1986. *Thermophiles; General, Molecular and Applied Microbiology*, NewYork.
- Brock, T.D., 1978. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer- Verlag, New York.
- Brock, T.D. and Madigan, M.T., 1988. *Biology of Microorganisms*, 5th ed. Prentice Hall, NewJersey.
- Campbell, C.D., Grayston, S.J. and Hirst, D.J., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30, 33-41.
- Chelius, M.K. and Moore J.C., 2004. Molecular Phylogenetic Analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21, 123–134.
- Chen, M.Y. and Lin, G.H. and Lin, Y.T. and Tsay, S.S., 2002. *Meiothermustaiwanensis* sp. nov, A Novel Filamentous, Thermophilic Species Isolated in Taiwan. *IJSEM*, 52, 1647-1654.
- Chung, A.P. and Rainey, F. and Nobre, M.F. and Burghart, J. and Da Costa, M.S., 1997. *Meiothermus cerbereus* sp. nov., New Slightly Thermophilic Species with High Level of 3-hydroxy Fatt Acids. *IJSB*, 47, 1225-1230.
- Coenye, T. and Gevers, D. and Van de Peer, Y. and Vandamme, P. and Swings, J., 2005. Towards a Prokaryotic Genomic Taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 147-167.
- Covarrubias, L. and Boliver, F., 1982. Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multipurpose Cloning Vehicles. VI. Plasmid pBR329, A New Derivative of pB328 Lacking The 428 Base Pair Inserted Duplication. *Gene*, 17, 79-89.
- Cowan, D.A., 1992. *Biotechnology of the Archaea*. *Tibtech*, 10, 315-323.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanelbol ve Diyaradin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dworkin, M.(Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.(Editors), 2006. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- Edward, Clive., 1990. *Microbiology of Extrem Environment*. Vision Type Setting, 216 p, Manchester.
- Ekşi, A., 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği, 127 p, Ankara.

- Ercan, S., 2005. Sıcak du kaynaklarından bakteri türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Farrand, S.G. and Jones, C.W. and Linton, J.D. and Stephenson, J., 1983. The effect of temperature and pH on The Growth Efficiency of The Thermoacidophilic Bacterium *Bacillus Acidocaldarius*. *Arch. Microbiol*, 135, 276-283.
- Fattah, A. and Yasser, R. and Gaballa, A., 2006. Identification and over expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki In *Escherichia coli*. *Microbial Research*, 1-8.
- Fuchs, T. and Huber, H. and Terner, K. and Stetter, K.O., 1995. *Metallosphaera prunae* sp. nov., a Novel Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archeum, Isolated from A Uranium Mine in Germany. *System. Appl Microbiol*, 18, 560-566.
- Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, *Nuc. Acids Res.*, 12, 5837-5852.
- Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., 1993. Roots of Bacterial Sistematics. In *Handbook of New Bacterial Sistematics*, Ed: M.Goodfellow and A.G.O'Donell. Academic Pres, London, 3-56.
- Goyal, A., 2006. DNA Fingerprinting The New Sherlock Holmes. *Harvard Science Review*, 14-17.
- Goto, K. and Fujita, R. and Kato, Y. and Asahara, M. and Yokota A., 2004. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 52, 419-427.
- Greene, A. C., Patel, B. K. C., Sheehy, ve A. J., 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Manganese- and Iron-reducing Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47, 505-509.
- Griffiths, JF. and Miller, HJ. and Suzuki, DT. and Lewatin, RC. and Gelbart WM., 2002. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th. W.H. Freeman Company, New York, 365-364
- Gugliandolo, C. and Maugeri, T. L. and Caccamo, D. and Stackebrandt, E., 2003. *Bacillus aerolius* sp.nov. A Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy). *Systematik and Applied Microbiology*, 26, 172-176.
- Guillorit-Rondeau, C., Malandrin, L. and Samson, R., 1996. Identification of two serological flagellar types (H1 and H2) in *Pseudomonas syringae* pathovars. *Eur J Plant Pathol.*, 102, 99 104.
- Gupta, R.S., 1998. Protei Phlogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1435-1491.
- Güler, S., 2003. Bazı Ekstrem Termofil Anerobik Bakteri İzolatlarının Toplam Protein Profillerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisan Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Güzel, A.İ. and Özcan, N. and Kasap, H., 2000. Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin PCR Amplifikasyonu ile *Escherichia coli*'de Klonlanması ve Ekspresyonu. *Turk J Vet Aim Sci*, 26, 133-138.
- Haghighat, S. and Akhavan, A. and Mazaheri, M. and Pasdar, H., 2008. Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 5 (2), 385-390.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. and De Vos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of*

- Microbiological Methods, 26(3), 247-259.
- Hasanekoğlu, İ. ve Yeşilyurt, S., 2002. Mikrobiyoloji. Erzurum.
- Hiol, A. and Jonzo, M.D. and Rugani, N. and Druet, D. and Sadra, L. and Comeau, E.C., 2000. Purification and Characterization of An Extra-cellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain Isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421- 430.
- Hjorleifsdottir, S., 2002. Diversity of Thermostable DNA Enzymes. Icelandic Hot Springs, Ed: D.Halldorssonar. Department of Biotechnology Lund University, Sweden, 2-6.
- Holt, J.G. and Krteg, N.R. and Sneath, P.H.A. and Staley, J.T. and William, S.T., 1993. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, 98.
- Huber, D. and Trincone, A. and Burggraf, S. and König, H. and Rachel, R. and Rockinger, I. and Fricke, H. and Stetter, K.O., 1992. *Aquifex pyrophilus* Gen. Nov. Sp.Nov, Represents A Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-oxidizing Bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 15, 340-351.
- Huber, R. and Eder, W. and Heldwein, S. and Wanner, G. and Huber, H. and Rachel, R. and Stetter K.O., 1998. *Thermocrinis ruber* gen nov., sp. nov., A Pink Filament Forming Bacterium Isolated from Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, (Oct.), 3576-3583.
- Huber, R. and Kristjanson, K. and Steter, K.O., 1987. *Ptyobaculum* Gen. Nov., a New Genus of Neutrophilic, Rod Shaped Archaeobacteria from Continental Solfataras Growing Optimally at 100°C. *Arch Microbiol*, 149, 95-101.
- Hulton, C.S., Higgins, C.F., Sharp, P.M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5(4), 825-834.
- Hugenholtz, P. and Pitulle, C. and Hersberger, K. and Pace, N.R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity in A Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 180, 366-376.
- In't Veld, G. and Driessen, A.J.M. and Konings, W.N., 1993. Bacterial Solute Transport Proteins in Their Lipid Environment. *FEMS Microbiology*, 12, 293-314.
- Jawad, A., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M., 1998. Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 165, 357-362.
- Kane, M.D., Poulsen, L.K. and Stahl, D.A., 1993. Monitoring the Enrichment and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria by Using Oligonucleotide Hybridization Probes Designed from Environmentally Derived 16S rRNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 682-686.
- Kashefi, K. and Lovley, D.R., 2000. Reduction of Fe(III), Mn (IV), and Toxic Metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1050-1056.
- Kıran, Ö. ve Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12- 19.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., 1990. Methods in Phytopathology. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Klug, W.S. and Cummings M.R., 2002. Genetik Kavramlar, 6th ed. Palme Yayıncılık, 700 p, Ankara..
- Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR., 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.*, 5(4), 408-418.

- Koskinen, P.E.P. and Beck, S.R. and Orlygsson, J. and Puhakka, J.A., 2008. Etanol and Hydrogen Production by Two Thermophilic, Anaerobik Bacteria Isolated From Icelandic Geothermal Areas. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4).
- Kristjasson, J.K., 1989. Thermophilic Organisms As Sources of Thermostable Enzymes. *Tibtech*, 7, 349-353.
- Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1992. Thermophilic bacteria. In: Kristjansson, JK (ed). *Thermophilic bacteria*. London, CRC Press, Inc., Boca Raton. pp 1-18.
- Kristjansson, J.K., Hreggvidsson, G.O., Grant, W.D., 2000. Taxonomy of extremophiles. In: Priest FG, Goodfellow M (eds) *Applied Microbiol Systematics*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, pp. 231-291.
- Krizova, J., Spanova, A., Rittich, B., 2006. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 36–44.
- Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Itoh, T., 2005. *Thermus kawarayensis* sp. nov., a new member of the genus *Thermus*, isolated from Japanese hot springs. *Extremophiles*, 9(1), 81-84.
- Kuhn, H.J. and Cometta, S. and Fiechter, A., 1980. Effects of Growth Temperature on Maximal Specific Growth Rate, Yield, Maintenance and Death Rate in Glucose, Limited Continuous Culture of the Thermophilic *Bacillus caldovenax*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech*, 10, 303-315.
- Kuşcuoğlu, U., 1992. Characterization and Genetical Analysis of *Thermus* Isolates from Kızılcahamam. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Lane, D.J., 1991. 16S / 23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Ed: E.Stackebrandt and M.Goodfellow. John Wiley & Sons, New York, 115-175.
- Lawongsa, P., Boonkerd, N., Wongkaew, S., O’Gara, F., Teaumroong, N., 2008. Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 24, 1877–1884.
- Lee, K.Y. and Wahl, R. and Barbu, E., 1956. Contenu en Bases Purique et Pyrimidiques des Acides Deoxyribonucleiques des Bacteries. *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 212-224.
- Lee, J.S., Chun, C.O., Hector, M., Kim, S.B., Kim, H.J., Park, B.K., Joo, Y.J., Lee, H.J., Park, C.S., Ahn, J.S., Park, Y.H., Mheen, T.I., 1997. Identification of *Leuconostoc* strains isolated from kimchi using carbon-source utilization patterns. *The Journal of Microbiology*, 35(1), 10-14.
- Logan, N.A., Forsyth, G., Lebbe, L., Goris, J., Heyndrickx, M., Balcaen, A., Verhelst, A., Falsen, E., Ljungh, A., Hansson, H.B. and De Vos, P., 2002. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 953–966.

- Louws, F.J. and Cuppels, D.A., 2001. Appendix A; Molecular Techniques. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed., Ed: N.W. Schaad, J.B. Jones, and W. Chun. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA, 321-333.
- Louws, F.J. and Rademaker, J.L.W. and De Bruijn, F.J., 1999. The Three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37, 81-125.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. ve Schleifer, K.-H., 1998. Bacterial Phylogeny Based on Comparative Sequence Analysis, *Electrophoresis*, 19, 554-568.
- Lupski, J.R., Weinstock, G.M., 1992, Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes, *J. Bacteriol.*, 174, 4525-4529.
- Madigan, M.T. and Mairs, B.L., 1997. Extremophiles. *Sci Am*, 276, 82-87.
- Madigan, M.T. and Martinco, J.M. and Parker, J., 2000. Prokaryotic diversity the Archaea. *Brock Biology of Microorganisms*, 546-571.
- Manceau, C., A. Horvais, 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Analysis of rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 498-505.
- Manfio, G.P., 1995. Toward Minimal Standards for the Description of *Streptomyces* species. Ph.D. Thesis University of Newcastle upon Tyne, England, U.K.
- Manier, E. and PoHeichtner, G. and Boeck, B. and Schmelz R. and Benz, R., 2001. Identification of the Outer Membrane Porin of *Thermophilus thermophilus* HBi the Channel-Forming Complex Has an Unusually High Molecular Mass and an Extremely Large Single-Channel Conductance. *Journal of Bacteriology*, 183 (2), 800-803
- Martenisson, V.T. and Birrien, J.L. and Raguene, G. and Da Costa, M. and Prieur, D. Isolation and characterisation of *Thermus thermophilus* Gt1211 from deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles*, 3, 247-251 (2004).
- Martin, A.P., 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3673-3682
- Mayr, E., 1998. Two empires or three?. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 9720-9723.
- Michaud, L., Di Cello, F., Brilli, M., Fani, R., Lo Giudice, A., Bruni, V., 2004.
- Mkandawire, A.B.C., Mabagala, R.B., Guzman, P., Gepts, P., Gilbertson, R.L., 2004. Genetic Diversity and Pathogenetic Variation of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *Phaseoil* var. *Fuscans*) Suggests Pathogen Coevolution with the Common Bean.
- Michaud, L., Di Cello, F., Brilli, M., Fani, R., Lo Giudice, A., Bruni, V., 2004. Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiology Letters*, 230, 63-71.
- MicroLog System, 2004. MicroLog[®] System, Release 4.2 User Guide. Biolog, Inc. Trust Way Hayward, CA 94545 U.S.A.
- Miller, S. A., T. R. Joaquim, 1993. Diagnostic techniques for plant pathogens, *Biotechnology in Plant Disease Control*, p321-339.
- Miquel, P., 1888. Monographie d'un Bacille Vivant Au-Dela de 70°C. *Ann Micrographic*, 1, 3.
- Miranda-Telo, E., Fardeau, M., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J.L., Garcia, J.L. ve Ollivier, B., 2004. *Petrogoga mexicana* sp. nov., A Novel Thermophilic, Anaerobic And Xylanolytic Bacterium Isolated from an Oil-Producing Well in the Gulf of Mexico, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 169-174.

- Miteva, V., Pobell, S.S., Mitev, V., 1999. Random and Repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. Journal of Applied Microbiology, 86, 928-936.
- Mohammed, M.E. and Al-Dourays, M. and Hamzah, R.Y. and Fuchs, G. 2006. Isolation and characterization of indigenous thermophilic Bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. International Biodeterioration Biodegradation. 58, 213-223.
- Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P.L., 1998. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains. Res Microbiol., 149(10), 711-722.
- Mora, R.R. and Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 25, 39-67.
- Mulligan, R.C. and Howard, B.H. and Berg, P., 1979. Synthesis of Rabbit -globin in Cultured Monkey Kidney Cells Following Transfection with A SV40 -Globin Recombinant Genome. Nature, 277, 108-114.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 73, 127-141.
- Narayanasamy, P., 1997. Plant pathogen detection and disease diagnosis. p331.
- Nazina, T.N., Lebedeva, E.V., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Grigoryan, A.A., Sokolova, D.Sh., Lysenko, A.M and Osipov, G.A., 2004. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54 (6), 2019-2024.
- Nazina, T.N., Sokolova, D.Sh., Grigoryan, A.A., Shestakova, N.M., Mikhailova, E.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Lysenko, A.M., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., 2005. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. Syst Appl Microbiol. 28(1), 43-53.
- Nguimbi, E. and Li, Y. and Gao, B. and Li, Z. and Wang, B. and Wu, Z. and Yan, B. and Qu, Y. and Gao, P., 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic Myxobacteria ve Differentiation of Closely Related Strain. System. Appl. Microbiology, 26, 262- 268.
- Qiu, G-z., Wan, M-x., Qian, L., Huang, Z-y., Liu, K., Liu, X-d., Shi, W-y. and Yang, Y., 2008. Archaeal diversity in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China. Journal of Basic Microbiology, 48, 401–409.
- Pace, N.R., 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and The Biosphere. Science, 276, 734-738.
- Palleroni, N.J., 1993. Structure of Bacterial Genome. Handbook of New Bacterial Systematics, Ed: M. Goodfellow, A.G. O'Donnell. Academic Press Ltd, London, 270-276.
- Pask-Hughes, R.A., and Williams, R.A.D., 1977. Yellow-pigmented strains of *Thermus* spp. from Icelandic hot springs. Journal of General Microbiology, 102, 375-383.
- Pramanik, A., Gaur, R., Sehgal, M. and Johri, B.N., 2003. Oligophilic bacterial diversity of Leh soils and its characterization employing ARDRA. Current Science, 84(12), 1550-1555.
- Pedersen, K., 2000. Exploration of Deep Intraterrestrial Microbial Life: Current Perspectives, FEMS Microbiol. Lett., 185, 9–16.

- Rahman, T.J., Marchant, R. and Banat, I.M., 2003. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 209-213.
- Rademaker, J. L. W., Louws F.J., de Bruijn, F. J., 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.4.3, 1-27.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R., 2001. The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiology reviews*, 25, 39-67.
- Rusznayak, A., Vladar, P., Szabo, G., Marialigeti, K., Borsodi, A.K., 2008. Phylogenetic and metabolic bacterial diversity of *Phragmites australis* periphyton communities in two Hungarian soda ponds. *Extremophiles*, 12, 763-773.
- Sambrook, J. and Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sara, M. and Sleytr, U.B., 2000. Centre for Ultrastructure Research and Ludwig Boltzmann Institute for Molecular Nanotechnology. University of Agricultural Science, Vienna.
- Satarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89(1), 78-90.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji*, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Schena, M., 2000. *Microarray Biochip Technology*. USA, p279.
- Schlegel, H.G., 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. Sixth Edition pp. 587.
- Schaffer, C., Franch, W.L., Scheberl, A., Komsa, P., McDermott, T.R and Messner, P., 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2361-2368.
- Seurinck, S., Verstraete, W., and Siciliano, S., 2003. The use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region-PCR and repetitive extragenic palindromic-PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify non-point fecal sources. *Appl Environ Microbiol.*, 69, 4942-4950.
- Sharples, G.J. and Lloyd R.G., 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosome. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6503-6508.
- Skirnisdottir, S., 2000. Phylogenetic Characterization of Microbial Mats and Isolation of *Thermus* spp. and Sulfur-oxidizing Bacteria. *Icelandic Hot Springs*, Ed: D.Halldorssonar. Department of Biotechnology Lund University, Sweden, 3-6.
- Singh, B.K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, J.M., Paterson, E. and Millard, P., 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, 57, 72-82.
- Smith, N.C., Hennessy, J., Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 739-748.

- Sow, N.M. and Dauphin, R.D. and Roblain, D. and Guiro, A.T. and Thonart, P., 2005. Polyphasic Identification of A New Thermotolerant Species of Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Faeces. *African Journal of Biotechnology*, 4, 409-421.
- Stackebrandt, E. and Swiderski, J., 2002. *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Oxford, Blackwell Science Ltd, Canada, USA.
- Stead, D.E., Hennessy, J., Wilson, J., 1998. Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 17-25.
- Stetter, K.O., 1986. Thermophiles. *General Molecular and Applied Microbiology*, Ed: T.D. Brock. 39-74.
- Stetter, K.O., 1999. Extremophiles and Their Adaptation to Hot Environments. *FEBS Letters*, 452, 22-25.
- Summit, M., Peacock, A., Ringelberg, D., White, D.C., Baross, J.A., 2000. Phospholipid fatty acid-derived microbial biomass and community dynamics in hot, hydrothermally influenced sediments from Middle Valley, Juan De Fuca Ridge. In Zierenberg, R.A., Fouquet, Y., Miller, D.J., Normark, W.R. (Eds.), *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 169, 1-19.
- Tachibana, Y. and Kuramura, A. and Shirasaka, N. and Suzuki, Y. and Yamamoto, T. and Fujiwara, S. and Takagi, M. and Imanaka, T., 1999. Purification and Characterization of an Extremely Thermostable Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from a Newly Isolated Hyperthermophilic Archaeon a *Thermococcus* sp. *AEM*, 65, 1991-1997.
- Takeuchi, T. and Sawada, H. and Tanaka, F. and Matsuda, I., 1996. Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab Based on 16S rRNA Sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 46, 476-479.
- Tamaoka, J., 1994. Determination of DNA Base Composition. *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, Ed: M. Goodfellow, A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons, Chichester, 150-170.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979. An Amilaz Producing *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 49 (4), 1901-1907.
- Temiz, A., 1996. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Hatipo lu Yay nevi, Ankara.
- Tenreiro, S. and Nobre, M.F. and Da Costa, M.S., 1995. *Thermus silvanus* sp. nov., and *T. chliarophilus* sp. nov., two new species related to *Thermus ruber* but with lower growth temperature, *IJSB*, 45, 633-639.
- Tolner, B., Poolman, B., and Konings, W.N., 1997. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A/3, 423-428.
- Tonever, F.C. and Arbeit, R. D. and Goering, R.V. and Mickelsen, P.A. and Murray, B.E. and Persing, D.H. and Swaminathan, B., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiology*, 33, 2233-2239.
- Tortora, J. and Gerard, R.B. and Case, C.L., 1995. *Microbiology: An Introduction*, 5th ed.. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Vandamme, P. and Pot, B. and Gillis, M. and De Vos, P. and Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiology Reviews*, 60, 407-438.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K., 1992. Rapid identification of

- bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiology Letters, 93(3), 227-233.
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., De Vos, P., Claeys, G. and Verschraegen, G., 1995. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. Journal of Clinical Microbiology, 33(1), 11-15.
- Versalovic, J., Koeuth, T and Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl. Acids Res., 19, 6823-6831
- Vogt, G. and Woell, S. and Argose, P., 1997. Protein Thermal Stability: Hidrogen Bonds and Ion Pairs. J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Watson, J.D. and Girman, M. and Witkowski, J. and Zollar, M., 1992. Recombonant DNA, 2nd ed. Scientific American Books. Distributed by W.H. Freeman and Company, No: 99-233 p, New York.
- Welch, S.G. and Al-Awad-hi, S. and Williams, R.A.D. (1998). Isoschizomers of the restriction endonuclease *TaqI* (T/CGA) requiring different metal ion concentrations and having a range of thermal stabilities from *Thermus* species from different continents, Microbiology, 144, 167-175.
- Wharton, D.A., 2002. Life at the Limits: Organisms in Extreme Environments, Port Chester, N.Y., Cambridge University Press, USA, 157 s.
- Williams, D.M. and Embley, T.M., 1996. Annual Reviews of Ecology and Sistematic. Usa, 27, 569-595.
- Williams, R.A.D. and Da Costa, M.S., 1994. The Genus *Thermus* and Related Microorganisms. Prokaryotes, Ed:A.Ballows, H.G.Turuper, M.Dworkin, W.Harder and K.H.Shiefer. Springer, Verlag, New York, 3745-3750.
- Woese, C.R. and Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya. Poc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4576-4579.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. Microbiol Rev, 51, 271-321.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogeneuc tree. PNAS, 97 (15), 8392-8396.
- Yang, J. and Shih, I. and Tezeng, Y. and Wang, S., 1999. Production and Profication of Proteaz from A *Bacillus supilis* That Can De-proteinize Curustacean Wastes. Enzyme and Microbial Technology, 26, 406-413.
- Yıldız, N., Bircan, H., 1991. Araştırma ve Deneme metotları . Atatürk Üniversitesi Yay. No:697, Ziraat Fak. Yay. No:305, Ders Kitaplar Serisi No:57. Erzurum.
- Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H., Yokota, Y., Nakajima, K., Hoshino, T., 2004. *Anoxybacillus vainovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. Int J Syst. Evol. Microbiol., 54(4),1239-1242.
- Yother, 2001. Bacterial Structure, Classification, And Physrology.CMB II Lecturehnnical I (yaymlanmamij ders notlan)
- Yüceler, F.S., 2000. Extracellular Proteaz Activity of Thermophilic Bactereia İsolated from Turkish Soils and Hotsprings. Yüksek Lisans Tezi, Middle East Technical University, Ankara.

Zhou, H., 2002. Toward The Physical Basis of Thermophilic Proteins: Linking of Enriched Polar Interactions and Reduced Heat Capacity of Unfolding. *Biophysical Journal*, 83, 3126-3133.

8.EKLER

EK 1: FJ417405 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1  gagtttgatc atggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg
61  gaccgaaggg agcttgctcc tttagggttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggcaac
121 ctgccctgca gactgggata acttcgggaa accggagcta ataccggata acaccgaaaa
181 ccgcatgggt ttcggttgaa aggtggcatt agctgtcact gcaggatggg cccgcggcgc
241 attagctagt tggtagggtt acggctcacc aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg
301 gtgaccggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggg agcagtaggg
361 aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagcgaa gaaggtcttc
421 ggatcgtaaa gctctgttgt caggggaagaa caagtaccgt tcgaacaggg cggtagcctt
481 acggtacctg acgaggaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg
541 tggcaagcgt tgtccggaat tggcgtaaag cgcgcgcagg cggttcctta agtctgatgt
601 gaaatctcgc ggctcaaccg cgagcggcca ttggaaactg gggaacttga gtgcaggaga
661 ggggagcgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccagtgg
721 cgaaggcggc tctctggccc tgtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcgaaca
781 ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgagt gctaagtgtt agagggtatc
841 caccctttag tgctgcagca aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac ggccgcaagg
901 ctgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg
961 aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcccctg acaaccctag agatagggcg
1021 ttccccttcc ggggacaggg tgacagggtg tgcatgggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag
1081 atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgacct tagttgccag cattcagttg
1141 ggcaactctaa ggtgactgcc ggctaaaagt cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat
1201 catgcccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg gtggtacaaa gggcagcgaa
1261 accgcgaggt ggagcgaatc ccaaaaaacc actctcagtt cggattgcag gctgcaactc
1321 gcctgcatga agccggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc
1381 ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacac

```

EK 2 : FJ417407 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1 gagtttgatc atggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg
61 gaccgaaggg agcttgctcc tttaggttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggcaac
121 ctgccctgca gactgggata acttcgggaa accggagcta ataccggata acaccgaaaa
181 ccgcatgggtt ttcggttgaa aggcggcttt tagctgtcac tgcaggatgg gcccgcgcg
241 cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag
301 ggtgaccggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagcga agaaggtctt
421 cggatcgtaa agctctgttg tcagggaaga acaagtaccg ttcgaacagg gcggtacctt
481 gacggtacct gacgaggaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag
541 gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggcggtt ccttaagtct
601 gatgtgaaat ctgcgcgctc aaccgcgagc ggccattgga aactggggga acttgagtgc
661 aggagagggg agcgggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac
721 cagtggcgaa ggcggctctc tggcctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc
781 gaacaggatt agataccctg gtagtcacgc cgtaaaccgat gagtgctaag tgtagaggg
841 tatccaccct ttagtgctgc agcaaacgca ttaagcactc cgctgggga gtacggccgc
901 aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa
961 ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc cctgacaacc ctagagatag
1021 ggcgttcccc tttcggggac agggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctc
1081 tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg acctagttg ccagcattca
1141 gttggggact ctaagggtgac tgccggctaa aagtcggagg aggggtggga tgacgtcaaa
1201 tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atgggtggta caaagggcag
1261 cgaaaccgcg aggtggagcg aatcccaaaa aaccactctc agttcggatt gcaggctgca
1321 actgcctgc atgaagccgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cgggtgaatac
1381 gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca cac

```

EK 3: FJ417401 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1 gagtttgatc atgggtcagg acgaacgctg gcggcggtgcc taatacatgc aagtcgagcg
61 gaccgaaggg agcttgctcc tttaggttag cggcgggacgg gtgagtaaca cgtgggcaac
121 ctgccctgca gactgggata acttcgggaa accggagcta ataccggata acaccgaaaa
181 ccgcatgggtt ttcggttgaa aggcggcttt tagctgtcac tgcaggatgg gcccgcggcg
241 cattagctag ttggtgaggt aacgggtcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag
301 ggtgaccggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagcga agaaggtctt
421 cggatcgtaa agctctgttg tcagggaaga acaagtaccg ttcgaacagg gcggtacctt
481 gacggtacct gacgaggaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag
541 gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagcgcg gcagggcgtt ccttaagtct
601 gatgtgaaat ctgcgggctc aaccgcgagc ggccattgga aactggggaa cttgagtgcg
661 ggagagggga gcggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc
721 agtggcgagg gcggtctctt ggcctgtaac tgacgctgag gcgcgaaagc gtggggagcg
781 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgtctaa tgtagagggg
841 tatccaccct ttagtgctgc agcaaacgca ttaagcactc cgctggggga gtacggccgc
901 aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttta
961 ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc cctgacaacc ctagagatag
1021 ggcgttcccc tttcggggac aggggtgacg gtggtgcatg gttgtcgtca gtcgtgtcgc
1081 tgagatgttg ggttaagtcc tgcaacgagc gcaacccttg acctagttg ccagcattca
1141 gttggggact ctaaggtgac tgccgggctaa aagtcggagg aaggtgggga tgacgtcaaa
1201 tcatcatgcc cttatgacc tgggctacac acgtgctaca atgggtggta caaagggcag
1261 cgaaaccgcg aggtggagcg aatcccaaaa aaccactctc agttcggatt gcaggtgcga
1321 actgcctgc atgaagccgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cgggtgaatac
1381 gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca cac

```

EK 4: FJ417403 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1  agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
61  ggaccgacgg gagcttgctc ccttaggtca gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa
121 cctgcctgta agactgggat aactcggga aaccggggct aataccgat gcttgattga
181 accgcatggt tcaatcataa aagggtggct ttagctacca cttacagatg gaccgcggc
241 gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatgcgtagc cgacctgaga
301 gggatgatcg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag
361 ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgatgagt atgaaggttt
421 tcggatcgta aaactctgtt gttagggaag aacaagtacc gttcgaatag ggcggtacct
481 tgacgggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta
541 ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggg ttcttaagtc
601 tgatgtgaaa gccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggga acttgagtgc
661 agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac
721 cagtggcgaa ggcgactctc tgggtctgta ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc
781 gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg
841 gtttccgccc tttagtgtcg cagcaaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggctc
901 caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaa gcggtggagc atgtggttta
961 attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata
1021 gggcttcccc ttcgggggca gagtgcacag tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcggtcgt
1081 gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc cagcattcag
1141 ttgggcactc taagggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat
1201 catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tgggcagaac aaagggcagc
1261 gaagccgcga ggctaagcca atcccacaaa tctgttctca gttcgggatc cagtctgcaa
1321 ccgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg
1381 ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac ac

```

EK 5: FJ417402 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1  agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcggtgc ctaatacatg caagtcgagc
61  ggacagaagg gagcttgctc ccggatgtta gcggcgggacg ggtgagtaac acgtgggtaa
121 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggagct aataccggat agttccttga
181 accgcatggt tcaaggatga aagacggttt cggctgtcac ttacagatgg acccgcggcg
241 cattagctag ttggtggggt aatggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag
301 ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt
421 cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgcga gagtaactgc tcgcaccttg
481 acggtacctt accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg
541 tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagggcctc caggcggttt cttaagtctg
601 atgtgaaagc ccccggtcca accggggagg gtcattggaa actgggaaac ttgagtgcag
661 aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacacca
721 gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgaaagcg tggggagcga
781 acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttagggggg
841 ttccgcccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacggtcgca
901 agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat
961 tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaaccc tagagatagg
1021 gctttccctt cggggacaga gtgacagggt gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga
1081 gatgttgggt taagtccgcg aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca gcatttagtt
1141 gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca
1201 tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gacagaacaa agggctgcga
1261 gaccgcaagg tttagccaat ccataaatc tgttctcagt tcggatcgca gtctgcaact
1321 cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat ccgggatcag catgccgcgg tgaatacgtt
1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac

```

EK 6: FJ417406 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1 agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
61 gagtcccttc gggggctagc ggcggacggg tgagtaacac gtaggcaacc tgcccgtaag
121 ctcgggataa catggggaaa ctcatgctaa taccggatag ggtcttctct cgcattgagag
181 gagacggaaa ggtggcgcaa gctaccactt acggatgggc ctgcggcgca ttagctagt
241 ggtggggtaa cggcctacca aggcgacgat gcgtagccga cctgagaggg tgaccggcca
301 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggga gcagtaggga atttccaca
361 atggacgaaa gtctgatgga gcaacgcgc gtgaacgatg aaggctctcg gattgtaaag
421 ttctgttgtc agagacgaac aagtaccgtt cgaacagggc ggtacctga cggtaacctga
481 cgagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtagggt ggcaagcggt
541 gtccggaatt attgggcgta aagcgcgcgc aggcggctat gtaagtctgg tgttaaagcc
601 cggggctcaa ccccggttcg catcggaac tgtgtagctt gagtgcagaa gaggaaagcg
661 gtattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg
721 gctttctggt ctgtaactga cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat
781 accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctagggtg tgggggtttc aataccctca
841 gtgccgcagc taacgcaata agcaactccg ctggggagta cgctcgcaag agtgaaactc
901 aaaggaattg acggggggcc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc
961 gaagaacctt accaggtctt gacatcccg tgaccgtcct agagatagggt cttcccttcg
1021 ggcagcgggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttggttga
1081 agtcccgcaa cgagcgcaac cttatcttt agttgccagc attcagttgg gcactctaga
1141 gagactgccg tcgacaagac ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta
1201 tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggc tggtaaacg ggaagctagc tcgcgagagt
1261 atgccaatct cttaaaacca gtctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa
1321 gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacggtcc cgggccttgt
1381 acacaccgcc cgtcacac

```

EK 7: FJ417404 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

```

1  agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
61  ggggggttttc gaaccctagc ggcggacggg tgagtaacac gtaggcaacc tgcctctcag
121 accgggataa catagggaaa cttatgctaa taccggatag gtttttggat cgcatgatct
181 gaaaaggaaa gatggcggtt gctatcactg ggagatgggc ctgcggcgca ttagctagtt
241 ggtggggtaa cggcctacca aggcgacgat gcgtagccga cctgagaggg tgaccggcca
301 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga attttccaca
361 atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgaacgatg aaggctcttcg gattgtaaag
421 ttctgttgtc agggacgaat aagtatcggt cgaacagggc ggtaccttga cggtaacctga
481 cgagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcggt
541 gtccggaatt attgggcgta aagcgcgcgc aggcggctat gtaagtctgg tgttaaagcc
601 cggggctcaa ccccggttcg catcggaac tgtgtagctt gagtgcagaa gaggaaagcg
661 gtattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg
721 gctttctggt ctgtaactga cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat
781 accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaggtgt tgggggtttc aataccctca
841 gtgccgcagc taacgcaata agcactccgc ctggggagta cgctcgcaag agtgaaactc
901 aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcacgt ggtttaattc gaagcaacgc
961 gaagaacctt accaggtctt gacatcccgc tgaccgctct ggagacagag cttcccttcg
1021 gggcagcggg gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttggttta
1081 agtcccgcga cgagcgcaac cttatcttt agttgccagc attcagttgg gcactctaga
1141 gagactgccg tcgacaagac ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatacgc atgcccctta
1201 tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggt tgggtacaac ggatgctacc tcgcgagagg
1261 acgccaatct cttaaaacca atctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa
1321 gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcgggtg aatacgttcc cgggccttgt
1381 acacaccgcc cgtcacac

```

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Elazığ ilinde doğdu. İlkokulu Manisa’da, orta ve lise öğrenimini ise Van’da tamamladı. 2002 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden biyolog olarak mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Şubat 2006’da Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nde araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen aynı üniversitenin Eğitim Fakültesi’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.