

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN BOR
TOLERANSLARININ SDS-PAGE PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BURSA KESTELEK BOR MADEN
YATAKLARI VE ÇEVRESİNDEN BOR TOLERANSI
YÜKSEK BAKTERİLERİN İZOLASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAMAZAN KARAKAYA

MAYIS 2012

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN BOR
TOLERANSLARININ SDS-PAGE PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BURSA KESTELEK BOR MADEN
YATAKLARI VE ÇEVRESİNDEN BOR TOLERANSI
YÜKSEK BAKTERİLERİN İZOLASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAMAZAN KARAKAYA

MAYIS 2012

MUĞLA

MUGLA ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

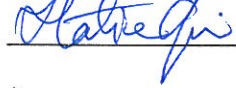
RAMAZAN KARAKAYA tarafından hazırlanan **BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN BOR TOLERANSLARININ, SDS-PAGE PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE BURSA-KESTELEK BOR MADEN YATAKLARI VE ÇEVRESİNDEN BOR TOLERANSI YÜKSEK BAKTERİLERİN İZOLASYONU** başlıklı tezinin, 07/05/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (**Jüri Başkanı**)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL (**Danışman**)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN (**Üye**)

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi,
Çanakkale

İmza:

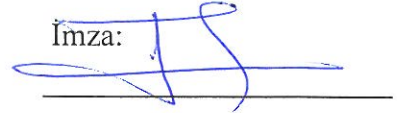


ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Aysel UĞUR

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı, Muğla Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı Muğla Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 07/05/2012

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin Muğla BAP projesi ve Tübitak 107T796 alışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.


Ramazan KARAKAYA

07/05/2012

ÖZET

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNİN BOR TOLERANSLARININ, SDS-PAGE PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE BURSA-KESTELEK BOR MADEN YATAKLARI VE ÇEVRESİNDEN BOR TOLERANSI YÜKSEK BAKTERİLERİN İZOLASYONU

Ramazan KARAKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Mayıs 2012, 140 sayfa

Ülkemiz, dünya Bor rezervlerinin % 72'sine sahiptir ve her geçen gün Bor'un önemi gittikçe artmaktadır. Bor elementi bir yarı metal olup, maden, kimya, tarım, ilaç sektörü dâhil birçok alanda kullanılmaktadır. Bunların yanında, göreceli olarak az çalışma yapılmış olmasına rağmen, Bor'un biyolojik olarak da çok öneme sahip olduğu görülmektedir. Bor'un faydalı özelliklerinin yanında belli bir eşik seviyesinin üzerinde zararlı olma durumu da söz konusudur. Bor'un biyolojik öneminin detaylı olarak anlaşılması için yeni moleküler biyoloji yaklaşımları ve model organizmalar kullanılmalıdır. Bu açıdan bakteriler, birçok nedenden dolayı ideal adaylardır. Bor'un bakterilerle olan ilişkisi konusunda yapılan çalışmalar göreceli olarak yetersizdir. Bu yüzden, bu tez çalışmasında, öncelikle türleri bilinen çeşitli bakterilerin Bor toleransları belirlenmiştir. Test edilen 37 farklı mikroorganizma türünde, Borik asit toleransları büyük çoğunlukla 25 mM- 75 mM arasında değişiklik göstermiştir. Sadece iki bakteride tolerans değeri 100 mM borik asit olarak tespit edilmiştir. Bu değer üzerinde hiçbir mikroorganizma üreme göstermemiştir. Dolayısıyla bakteri dünyasında Bor tolerans eşik değeri 100 mM borik asit olarak önerilmiştir. Ayrıca, Bor etkisinin anlaşılabilmesi için, seçilen bakterilerin (n = 18) farklı Bor konsantrasyonlarında geliştirilmesinden elde edilen hücrelerden, protein ekstraktları elde edilmiş ve bunlar üzerinde 1D SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiştir. Bazı durumlarda Bor konsantrasyonuna bağlı ortaya çıkan protein bantları gözlemlenmiştir. Borun sıvı besi yerinde bakteri üremesi üzerine etkisini göstermek amacıyla, 22 farklı türün büyüme eğrileri belirlenmiştir. Ayrıca, Bor toleransı yüksek bakteri izolatları elde edebilmek amacıyla, Bursa Kestelek'te bulunan Bor madeni ve çevresinden, Bor'ca zengin toprak örnekleri toplanmış ve Bor'a tolerans gösteren bakteriler izole edilmiştir. Bu izolatların Bor tolerans değerleri 150-300 mM borik asit arasında değişmektedir. Seçilen Bor toleransı

yüksek 10 adet izolatın, 16SrRNA gen dizisi belirlenerek, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zhihengliuella* ve *Exiguobacterium* genuslarına ait türler açığa çıkarılmıştır. Bor toleransı yüksek çıkan bazı izolatların, artan Bor konsantrasyonuna bağlı olarak, sıvı besi yerinde büyüme eğrileri belirlenmiş ve bu ortamda da Bor tolerans seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, hem türü bilinen bakteriler üzerinde Bor tolerans ve protein profil belirleme deneyleri yapılmış, hem de Bor toleransı yüksek olan yeni bakteri izolatları elde edilmiştir. Bu çalışma, Bor-bakteri ilişkisinin anlaşılabilmesi adına önemli bir boşluğu doldurarak, gelecekteki çalışmalarda kullanılacak veriler üretmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bor, Bakteri, İzolasyon, Tolerans, Protein profil

ABSTRACT

SOME BACTERIAL SPECIES BORON TOLERANCE, SDS-PAGE PROFILES AND BURSA-KESTELEK FROM BORON MINERAL DEPOSITS AND THE ISOLATION OF BACTERIA WITH HIGH TOLERANCE

Ramazan KARAKAYA

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bekir ÇÖL

May 2012, 140 pages

Our country shares 72% of the world Boron reserves and the significance of this element (Boron) has increased with each passing day. Boron is a semi-metal that is used in numerous areas including mining, chemistry, agriculture and pharmacology. In addition, despite the lack of sufficient studies, it is seen that Boron is also important in biology. Besides its beneficial effects, this element is harmful when present above a threshold level. In order to understand the biological importance of Boron in detail, modern molecular biology approaches and model organisms should be employed. The bacteria, in that regard, are the ideal candidates. The scope and number of the studies addressing the Boron-bacteria relationship are relatively insufficient. Thus, in this thesis, firstly the boron tolerances of known bacteria species were determined. Among the 37 different microorganism species tested, Boric acid tolerances have been mostly found within the range of 25 mM- 75 mM. Only for the two of the bacteria, was the tolerance detected to be 100 mM. No microorganisms were able to grow above this level. Consequently, the value of 100 mM boric acid is presented here as the threshold level for Boron tolerance in the bacteria world. Also, in order to elucidate the Boron effect further, the protein extracts were prepared from the cell pellets obtained from the selected bacteria (n = 18) grown with varying concentrations of Boron and SDS-PAGE analyzes were performed. Protein bands were observed in some cases as a function of Boron concentration. To show the effect of Boron on the growth of bacteria in liquid medium, the growth curves of 22 different species were determined. Also, with the goal of obtaining bacteria with high Boron tolerance, the soil samples containing relatively higher levels of boron were collected and from which Boron tolerant bacteria were isolated. The Boron tolerance levels of the bacteria isolates were within the range of 150-300 mM boric acid. 16SrRNA gene sequences of the 10 Boron tolerant isolates selected were determined and the species belonging to *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zhihengliuella* and *Exiguobacterium* genus were revealed.

The growth curves of some of the isolates with higher levels of tolerance were determined in liquid culture as a function of increasing Boron concentration and it was shown as well that Boron tolerance levels are high in such conditions. As a result of this study, the experiments dealing with the determination of Boron tolerance of known bacteria species and the analysis of protein profiles were conducted in addition to obtaining highly Boron tolerant novel bacteria isolates. This study, in conclusion, provides much needed information that will likely fill an important gap in the field in order to be able to understand the boron-bacteria relationship and can certainly be used in future studies.

Key Words: Boron, Bacteria, Isolation, Tolerance, Protein profile

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez danışmanlığımı üstlenen, tez konusunun belirlenmesinde ve tezin deneysel aşamalarında her türlü desteği veren aynı zamanda lisans eğitimim süresince de desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e; mikrobiyolojik çalışmalarda katkı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Nurettin ŞAHİN'e, deneysel aşamalarda laboratuvar alt yapısının kullanılmasında yardımcı olan ve çalışmalarımda fikirleriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ'e teşekkürü borç bilirim.

Deneysel aşamadaki desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarım Nihan AKGÜÇ ÇÖL'e, Didem YÖZDEMİR'e, Aslı TANRISEVEN'e, Mehlika ALPER'e ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarım ile birlikte arkadaşlarım İsmail ŞEN'e ve Çağdaş DAĞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme ve manevi destekleriyle tüm arkadaşlarıma hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kaynak Özeleri.....	3
1.1.1. Bor ve bitkiler.....	4
1.1.2. Bor ve insan sağlığı	5
1.1.3. Bor ve hayvanlar.....	7
1.1.4. Bor ve bakteriler	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
2.1. Bazı Mikroorganizma Türlerinin Bor Toleranslarının, Büyüme Eğrilerinin ve SDS-PAGE Profillerinin Belirlenmesi.....	9
2.1.1. Bazı mikroorganizmaların Bor toleranslarının belirlenmesi	10
2.1.1.1. Bazı mikroorganizmaların plate-plaka yöntemi	10
2.1.1.2. Bazı mikroorganizmaların tüp dilisyon yöntemi.....	11
2.1.1.3. Bazı mikroorganizmaların Bor tolerans nokta testi	11
2.1.2. Bazı bakterilerin büyüme eğrisi çalışmaları	11
2.1.3. Bazı bakterilerin SDS-PAGE ve Native-PAGE çalışmaları.....	12
2.1.3.1. Protein konsantrasyonu tayini	12
2.2. Bursa İlindeki Bor Madeni ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu	13
2.2.1. Örneklem	13
2.2.2. İzolatların Bor toleranslarının belirlenmesi	13
2.2.3. İzolatlardan DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	14
2.2.3.1. DNA izolasyonu	14
2.2.3.2. PCR yöntemiyle 16SrRNA geninin çoğaltılması.....	15
2.2.3.3. 16SrRNA gen sekans analizi çalışmaları.....	15
2.2.3.4. Biyoinformatik analiz.....	16

2.3.4. Bazı izolatların büyüme eğrileri	16
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	18
3.1. Bazı Mikroorganizma Türlerinin Bor toleranslarının, Büyüme Eğrilerinin ve SDS-PAGE Profillerinin Belirlenmesi İle İlgili Sonuçlar	18
3.1.1. Bazı mikroorganizmaların Bor toleranslarının saptanması	18
3.1.1.1. <i>Plate -plaka yöntemi</i>	18
3.1.1.2. <i>Tüp dilüsyon yöntemi</i>	21
3.1.1.3. <i>Bor tolerans nokta testi</i>	29
3.1.2. Farklı Bor (borik asit) konsantrasyonlarında test mikroorganizmalarının büyüme eğrilerinin saptanması	33
3.1.3. Bor'un bakteri büyümesi üzerine inhibisyon etkisinin matematiksel olarak ifade edilmesi ve karşılaştırılması	42
3.1.3.1. <i>Micrococcus luteus bakterisinin Bor'a bağlı büyüme hızlarının belirlenmesi</i>	47
3.1.3.2. <i>Escherichia coli, Bacillus firmus, B. lichoniformis, Streptomyces albus, Herminimonas arsenicoxydans ve Cupriavidus metallidurans türlerinin Bor'a Bağlı büyüme hızlarının değerlendirilmesi</i>	50
3.1.3.3. <i>Bazı mikroorganizmaların borik asit içeren TSB besi yerlerinde üreme hızlarının değerlendirilmesi</i>	52
3.1.3.4. <i>Bazı Methylobacterium türlerinin borik asit içeren MSM besiyerlerinde üreme hızlarının değerlendirilmesi</i>	55
3.1.3. Farklı Bor/Borik asit konsantrasyonlarını içeren besiyeri ortamlarında verilen mikroorganizmaların SDS-PAGE protein profillerinin çıkarılması	56
3.2. Bursa İlindeki Bor Madeni ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu	68
3.2.1. Bursa'da ki Kestelek Bor madeninden örnekleme	68
3.2.2. İzolatların Bor toleranslarının saptanması	69
3.2.2.1. <i>Katı besiyeri üzerinde izolatların Bor toleransını belirleme deneyleri</i>	69
3.2.3. Bor toleransı yüksek çıkan izolatların moleküler karakterizasyonu	72
3.2.3.1. <i>İzolatlardan DNA izolasyonu ve PCR sonuçları</i>	72
3.2.3.2. <i>16SrRNA gen sekans sonuçlarının biyoinformatik analizi</i>	74

3.2.3. Bor toleransı yüksek çıkan bazı izolatlarda büyüme eğrisi çalışmaları.....	81
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	86
4.1. Borik Asitin Türleri Bilinen Mikroorganizma Türlerinin Gelişimleri Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar.....	86
4.1.1. Bor tolerans sonuçları.....	86
4.1.2. Farklı Bor (borik asit) konsantrasyonlarında test mikroorganizmalarının büyüme eğrilerinin saptanması ile ilgili sonuçlar.....	87
4.1.2.1. <i>Test edilen mikroorganizma türlerinin Bor tarafından inhibisyonunun ikiye çoğalma süreleri olarak ifade edilmesi</i>	87
4.1.3. Bazı bakterilerin farklı Bor konsantrasyonlarında SDS-PAGE protein profillerinin çıkarılması ile ilgili sonuçlar	89
4.2. Bursa İlindeki Bor Madeni Ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu	90
4.2.1. İzolatların Bor toleransının belirlenmesi ile ilgili sonuçlar	90
4.2.2. İzolatların 16SrRNA sekans analizi ve değerlendirilmesi.....	90
4.2.3. Bazı izolatların büyüme eğrilerinin değerlendirilmesi.....	92
KAYNAKLAR	94
EKLER.....	99
Ek A. BUK İzolatlarının 16SrRNA Geninin Nükleotid Dizileri	99
Ek B. BUK İzolatlarının Benzerlik Gösterdikleri En Yakın Türler.....	111
Ek C. BUK İzolatları Ve Benzer Türler İle MEGA4 Programı Kullanılarak Filogenetik Gösterdikleri En Yakın Türler	116
Ek D. SDS-PAGE Solüsyonları.....	117
Ek E. Besiyerleri	120
Ek F. Solüsyonlar.....	122
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bu çalışmada çeşitli deneylerde kullanılan mikroorganizma türleri.....	10
Çizelge 3.1. Plate-plaka yöntemi ile elde edilen sonuçları	20
Çizelge 3.2. Tüp dilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçları	22
Çizelge 3.3. Bazı mikroorganizmaların Bor toleransları	31
Çizelge 3.4. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma türleri ve borik asit konsantrasyonları	35
Çizelge 3.5. İkiye çoğalma sürelerinin hesaplanması	49
Çizelge 3.6. İkiye çoğalma sürelerinin matematiksel ifadesi.....	49
Çizelge 3.7. <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> ve <i>Cupriavidus metallidurans</i> farklı borik asit konsantrasyonları içeren MSM besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi).....	51
Çizelge 3.8. Bazı bakterilerin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 10, 20 ve 30 mM) içeren TSB besi yerlerinde üreme hızları (1/ikiye çoğalma süresi).....	53
Çizelge 3.9. Bazı bakterilerin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 25, 50 ve 75 mM) içeren TSB besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)...	54
Çizelge 3.10. Bazı <i>Methylobacterium</i> türlerinin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 10, 20 ve 30 mM) içeren MSM besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)	55
Çizelge 3.11. Bazı izolatların Bor toleransları	71
Çizelge 3.12. Bazı BUK izolatların BlastN analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ...	74
Çizelge 3.13. Bazı BUK izolatlarının 16SrRNA gen sekansı sonuçlarının BlastN analizi sonuçları.....	75
Çizelge 3.14. Bu çalışmada kullanılan izolatların en yakın tip türleri ve borik asit konsantrasyonları.....	81
Çizelge 4.1. Çeşitli bakteri türlerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında logaritmik fazda (OD _{0,15} 'ten OD _{0,30} a) ikiye katlanma süreleri (saat)	88
Çizelge 4.2. Çeşitli bakteri türlerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında logaritmik fazda (OD 0,15'ten OD 0,30 a) ikiye katlanma süreleri (saat)	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Petri-Plaka yöntemi ile Bor'un bazı bakterilerin gelişimi üzerine etkisinin tespiti..	19
Şekil 3.2. <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarıdaki yüzde inhibisyon değerleri..	23
Şekil 3.3. <i>Yersinia ruckerii</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Klebsiella</i> sp. ve <i>Streptococcus</i> sp. türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarıdaki yüzde inhibisyon değerleri..	24
Şekil3.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> ve <i>Staphylococcus arlettae</i> türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarıdaki yüzde inhibisyon değerleri..	25
Şekil 3.5. <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus camosus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ve <i>Staphylococcus lugdunensis</i> türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarıdaki yüzde inhibisyon değerleri..	26
Şekil 3.6. Bazı bakterilerin Bor (borik asit) tarafından inhibisyonu.	27
Şekil 3.7. Bazı <i>Staphylococcus</i> türlerinin Bor (borik asit) tarafından inhibisyonu. ..	28
Şekil 3.8. Bor tolerans nokta testine bir örnek..	29
Şekil 3.9. Türü bilinen bazı mikroorganizmaların Bor tolerans nokta test sonuçları...	30
Şekil 3.10. <i>Serratia</i> sp. (a) ve <i>Vibrio angillarum</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.	36
Şekil 3.11. <i>Pseudomonas tolasii</i> (a) ve <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	37
Şekil 3.12. <i>Pseudomonas auriginosa</i> (a) ve <i>Cupriavidus oxaliticus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	38
Şekil 3.13. <i>Xanthobacter agilis</i> (a) ve <i>Azospirillum lipoferum</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	39
Şekil 3.14. <i>Cupriavidus necator</i> (a) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	40
Şekil 3.15. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (a) ve <i>Escherichia coli</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	41
Şekil 3.16. <i>Methylobacterium suomiense</i> (a) ve <i>Methylobacterium fujisawanse</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	42
Şekil 3.17. <i>Methylobacterium thiocyanatum</i> (a) ve <i>Micrococcus luteus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	43

Şekil 3.18. <i>Herminimonas arsenicoxydans</i> (a) ve <i>Bacillus firmus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	44
Şekil 3.19. <i>Bacillus licheniformis</i> (a) ve <i>Bacillus subtilis</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	45
Şekil 3.20. <i>Cupriavidus metallidurans</i> (a) ve <i>Streptomyces albus</i> (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri..	46
Şekil 3.21. <i>Micrococcus luteus</i> bakterisinin Borik asite bağlı büyüme eğrisi	48
Şekil 3.22. <i>Micrococcus luteus</i> bakterisi için logaritmik fazda büyüme formüllerinin tespiti.....	48
Şekil 3.23. <i>Micrococcus luteus</i> bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarında büyüme hızlarının gösterilmesi..	50
Şekil 3.24. MSM besiyerinde büyüme hızının Borik asit tarafından düşürülmesi....	52
Şekil 3.25. Çeşitli mikroorganizmaların 0, 10, 20 ve 30 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde gelişme hızları..	53
Şekil 3.26. Çeşitli mikroorganizmaların 0, 25, 50 ve 75 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde gelişme hızları.	54
Şekil 3.27. Bazı <i>Methylobacterium</i> türlerinde 0, 10, 20 ve 30 mM borik asit içeren MSM besi yerlerinde gelişme hızları..	55
Şekil 3.28. <i>E. coli</i> bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarındaki SDS-PAGE profilleri.	57
Şekil 3.29. <i>E. coli</i> bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarında ifade edilen bir protein bandının görülmesi.....	58
Şekil 3.30. <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri..	59
Şekil 3.31. <i>Serratia</i> sp. ve <i>Lactococcus garviae</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri..	60
Şekil 3.32. <i>Cupriavidus metallidurans</i> , <i>C. necator</i> ve <i>C. oxalaticus</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri.....	61
Şekil 3.33. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>P. tolaasii</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri..	62
Şekil 3.34. <i>Aeromonas hydrophila</i> ve <i>Streptomyces albus</i> mikroorganizmalarının farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri..	63
Şekil 3.35. <i>Methylobacterium thiocyanatum</i> , <i>M. suomiense</i> ve <i>Vibrio anguillarum</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri.....	64
Şekil 3.36. <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Xanthobacter agilis</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri.....	65

Şekil 3.37. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'de farklı ifade edilen bir protein bandının tespit edilmesi.	66
Şekil 3.38. <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'dan elde edilen ekstraktların Native-PAGE analizi. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir.....	67
Şekil 3.39. Bursa Kestelek Bor madeni ve çevresinden örnekleme alanları	68
Şekil 3.40. Nokta ekim Bor tolerans testleri sonuçlarından bazı örnekler.....	70
Şekil 3.41. 16SrDNA sekans analizi yapılan izolatlardan DNA izolasyon sonuçları.	72
Şekil 3.42. BUK izolatlarının PCR sonuçları. 16SrRNA geninin amplifikasyonu ürünleri %0.8 agaroz jele 8 µl yüklenmiştir.....	73
Şekil 3.43. <i>Bacillus</i> türleri ile 2 adet izolatın (BUK632Y ve BUK22a) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi.....	76
Şekil 3.44. <i>Exiguobacterium</i> türleri ile BUK50b izolatının 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi.	77
Şekil 3.45. <i>Pseudomonas</i> türleri ile 3 adet izolatın (BUK69b, BUK1ax ve BUK2ax) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi.....	78
Şekil 3.46. <i>Zhihengliuella</i> türleri ile 2 adet izolatın (BUK64b ve BUK23c) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi.....	79
Şekil 3.47. İzolatların kendi içerisinde (BUK22a, BUK632Y, BUK50b, BUK64b, BUK23c, BUK69b, BUK2ax ve BUK1ax) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi.....	80
Şekil 3.48. BUK2ax (a) ve BUK632Y (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	82
Şekil 3.49. BUK64b (a) ve BUK50a-1 (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	83
Şekil 3.50. BUK1ax (a) ve BUK22a (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	84
Şekil 3.51. BUK69b izolatının (a) ve <i>E. coli</i> (b) bakterisinin artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri.....	85

KISALTMALAR DİZİNİ

B	Bor
BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MSMA	Medium H3P DSMZ
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
O D	Okuma değeri
PBS	Fosfat Buffer Saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-Edta
Tris	Tris-hidroksimetil-aminometan
TSB	Triptik Soy Broth
TSBA	Triptik Soy Broth Agar
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Bor minerallerine dünyanın pek çok yerinde rastlanmaktadır. Dünyadaki bilinen Bor rezervlerinin yaklaşık % 72'si de Türkiye'de bulunmaktadır. Her ne kadar rezervlerimiz ile şu anda en baştaysak da, işlenmiş Bor ürünleri ya da farklı sektörlerde Bor ile ilgili teknolojik ve bilimsel yaklaşımlarda dünyadaki en son gelişmeleri arkadan izliyoruz. Öyleyse hedefimizin de, Bor ile araştırmaları hem her sektöre yaymak hem de bilimsel açıdan yeni verilere ulaşmak olmalıdır.

Bor mineralleri ve ürünleri yaklaşık 400 farklı alanda kullanılmaktadır. Bunlar arasında cam, seramik, deterjan, ilaç ve kimya sanayi, tarım, metalürji, enerji depolama, arabalar, su arıtma, pigment ve kurutucu olarak, nükleer uygulamalar gibi alanlar öne çıkmaktadır. Dolayısıyla Bor hem ekonomik, hem de çevre açısından çok önemlidir. Bunun yanında, Bor elementinin canlılar açısından önemi ve rol aldığı biyolojik sistemler de üzerinde durulması gereken konulardandır.

Bor'un faydalı özelliklerinin yanında belli bir eşik seviyesinin üzerinde zararlı olma durumu da söz konusudur. Bor toleransı ve gereksinimi çeşitli organizmalar arasında farklılık gösterir. Bitkiler için mikro besin elementi olan Bor'un eksikliğinde veya fazlalığında dezavantaj oluşmaktadır. Bakterilerde ise Bor gereksinimi ile ilgili yapılan çalışmalarda öncelikle; bazı Cyanobacteria türleri için Bor'un esansiyel olduğu rapor edilmiştir (Mateo vd., 1986). Bor'un Azotobacter'de nitrojen fiksasyonunu arttırıcı etkisi üzerinde durmuştur (Anderson G. R, 1961). Yapılan bir çalışmada ise Bor içeren bir molekül izole edilmiş ve bu molekülün bakteride quorum sensing'de (haberleşmede) görevli olduğunu saptamışlardır (Chen vd., 2002). Bunun yanı sıra önemli antibiyotik üreticisi Streptomisetler tarafından üretilen boromycin (Kohno vd., 1996) , tartrolon A ve B (Irschik vd., 1995) adları verilen antibiyotiklerin Bor içerdiği tespit edilmiştir.

Literatüre de baktığımızda, Bor elementinin mikroorganizmadaki etkisi üzerine olan çalışmalar sınırlıdır. Bu yüzden Bor'un bakterilerdeki biyolojik işlevi,

mikrobiyolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmalıdır. Bu araştırmaların yapılması içinde en uygun model organizmanın ya da organizmaların bulunması oldukça önemlidir. Bunun içinde model organizma seçiminde türleri bilinen mikroorganizma grubu ile Bor'lu ortamda yaşayabilen yeni tür bakterilerin tespiti ve bu bakterilerin moleküler mekanizmalarının (hangi protein, gen vs.) Bor ile ilişkisinin olduğunun tayini, yapılacak birçok çalışmada son derece gerekli ve önemli bir role sahip olacaktır. Bu çalışmaları gerçekleştirebilmek için çeşitli bakteri türlerinin Bor'a cevabı araştırılarak, bu bakterilerin sahip oldukları proteinler belirlenmelidir. Bu tezde de bu sorunlara çözüm olabilecek model organizmaların seçilmesi ve bulunması hedeflenmiştir.

İlk olarak bazı mikroorganizma türlerinin Bor'a olan gereksinim ve direncinin saptanması amaçlanmıştır. Bu yüzden öncelikle bu bakterilerin Bor toleransları belirlenmiştir. Bor toleransları belirlendikten sonra bazı bakteri türlerinde de büyüme eğrileri yapılmıştır. Bora bağlı büyüme eğrilerine bakılarak bakterilerin büyüme hızları belirlenmiştir. Daha sonra bazı bakteri hücreleri O D 1'e kadar yetiştirilerek ifade etmiş olduğu toplam protein profilleri değerlendirilmiştir. Toplam protein profilleride SDS-PAGE ile saptanmıştır.

Bu tezin model organizma seçimi için bir başka yaklaşımı da, çeşitli Bor bileşikleri içeren Bursa-Kestelek Bor madeni ve çevresinden Bor toleransı yüksek bakteriler izole ederek bunlardan Bor toleransı yüksek çıkan izolatların moleküler yönden karakterize edilmesidir. Bor'lu toprak ve su ortamlarından toplanan örneklerden izole edilen bakterilerin bazılarının Bor tolerans seviyeleri test edilerek, Bor toleransı yüksek çıkan bazı izolatlarda da 16SrDNA sekansı tespit edilmiştir. Bu verilere bakılarak biyoinformatik analizlerle bakteri türlerinin diğer bakteri türleriyle olan akrabalık derecesi ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Son olarak, Bor toleransı yüksek çıkan bazı izolatlarda da Bor'a bağlı olarak büyüme eğrileri belirlenmiştir.

1.1. Kaynak Özetleri

Bor elementi (B) simgesiyle gösterilip, atom ağırlığı 10,81, atom numarası 5, kütle numaraları 10 ve 11 olan iki kararlı izotoptan oluşan metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir. Genellikle doğada tek başına değil, başka elementlerle bileşikler halinde bulunur. Tabiatta yaklaşık olarak 230 çeşit Bor minerali vardır. Oksijenle bağ yapmaya yatkın olması sebebiyle pek çok değişik Bor-oksijen bileşimi bulunmaktadır. Bor-oksijen bileşiklerinin genel adı borat olarak bilinir (Col ve Col, 2003).

Bor, yeryüzünde toprak, kayalar ve suda yaygın olarak bulunan bir elementtir. Toprağın Bor içeriği genelde ortalama 10–20 ppm olmakla birlikte ABD'nin batı bölgeleri ve Akdeniz'den Kazakistan'a kadar uzanan yörede yüksek konsantrasyonlar da bulunur. Deniz suyunda 0.5-9.6 ppm, tatlı sularda ise 0.01 - 1.5 ppm aralığındadır. Yüksek konsantrasyon da ve ekonomik boyutlardaki bor yatakları, Bor'un oksijen ile bağlanmış bileşikler olarak daha çok dünyada Amerika, Türkiye, Arjantin, Şili, Çin ve Rusya'da bulunmaktadır. Bor rezervinin yaklaşık olarak dörtte üçü de Türkiye'de bulunmaktadır. Türkiye'deki bilinen Bor yatakları özellikle Eskişehir-Kırka, Balıkesir-Bigadiç, Bursa-Kestelek ve Kütahya-Emet'te bulunmaktadır. En önemli ham Bor ürünleri ise; kolemanit, tinkal ve üleksit'tir. Ayrıca; borik asit, perboratlar, pentahidratlar gibi rafine bor ürünleri de üretilip, satılmaktadır. Türkiye'de önemli tinkal yatakları Kırka'da ve önemli kolemanit yatakları ise Emet ve Bigadiç civarında bulunmaktadır. Üleksit ise Bigadiç'te üretilmektedir (Boren, Bor Araştırma Enstitüsü; www.boren.gov.tr).

Bor dünyada, nükleer sanayiden, uzay araçlarına, gübre sanayinden, ilaç sanayine, kimya sanayinden, otomobil sanayine kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının, hem çevreye hem de ekonomiye katkısı vardır. Bor' un çevre ve ekonomiye katkısının yanı sıra canlılar üzerine olan etkisi de oldukça fazladır.

Bor'un bitki, insan ve hayvan metabolizması üzerine hem olumlu hem de olumsuz etkileri mevcuttur. Bu etkiler Bor eksikliği veya fazlalığı durumunda farklılık arz etmektedir.

1.1.1. Bor ve bitkiler

Bor'un bitkiler için gerekli bir element olduğu ilk kez 1923 yılında belirlenmiştir (Warington, 1923). Bor bitkilerin gelişebilmesi için mutlak gerekli mikro besin elementlerinden birisidir. Bitkilerde noksanlık veya toksisiteye neden olan toprak Bor seviyeleri arasında çok az bir fark vardır. Bu nedenle bitkilerde Bor noksanlığı ve toksisite belirtileri diğer mikro besin elementlerine göre daha yaygın olarak görülmektedir. Bor'un elverişliliği farklı toprak ve iklim faktörleri tarafından etkilenir. Bitkilere bor elverişliliğini etkileyen başlıca toprak faktörleri; pH, tuz içeriği, organik madde, kireç, tekstür ve değişebilir katyonlardır (Keren ve Bingham 1985; Rahmatullah vd., 1989).

Bor topraklarda değişik formlarda bulunmaktadır ve birkaç kategoriye ayrılmıştır. Bununla birlikte toprak Bor'unun fraksiyonu ve her bir fraksiyonun bitkiye elverişliliği ayrıntılarıyla incelenmemiştir (Jin vd., 1987; Hou vd., 1996). Bor'un bitkiler tarafından alımını etkileyen en önemli toprak özelliği toprak pH'sıdır. Toprağın gereğinden fazla kireçlenmesi ve pH'sındaki artış bitkilerde Bor alımını azaltmaktadır (Bartlett ve Picarelli, 1973; Bennett ve Mathias, 1973). Bor'un bitkiler için optimum ve toksik düzeyleri arasındaki fark oldukça düşük olduğundan bitkilerin Bor toksitesi ve etkinliğini ayarlamak oldukça güçtür. Bu nedenle bitkilerde noksanlık ve toksite belirtileri en yaygın görülen mikro elementlerin başında Bor gelmektedir (Keren ve Bingham, 1985; Goldberg, 1997). Bor bitkilerde, hücre duvarının oluşması ve yapısında, şeker sentezinde, karbonhidrat ve RNA metabolizmasında, solunumda, Indol asetik asit (IAA) metabolizmasında, biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli ve belirgin özelliklere sahiptir (Parr ve Loughman 1983, Lukaszewski ve Blevins, 1996, Camacho vd., 2008). Bitki birincil hücre duvarı yapısında yer alan Rhamnogalakturnan (RG-II) kompleksinin yapısında apioz şekeri bulunmaktadır ve bor bu apioz şekerindeki furanoid halkasına bağlanır (Reid vd., 2004 ; Yermiyahu vd., 2008). Bor, şeker alkol bileşikleri olan manitol ve sorbitol gibi ile güçlü kompleksler oluşturma kapasitesine sahiptir (Hu vd., 1997) .

Çeşitli bitki türlerindeki Bor alımın farklılığı hücre membranı geçirgenliğindeki farklılıklardan, kök içinde ve kök dışında Bor kompleksinin oluşum miktarı ve Bor

kompleksi oluşumunu belirleyen organik bileşiklerin miktarından ve şu an tanımlanamayan bazı mekanizmalardan kaynaklandığı belirtilmiştir (Rezanka ve Sigler, 2008 ; Hu vd., 1997). Bitkilerin Bor alımının, borik asit formunda pasif absorpsiyon yoluyla olduğunu ve bitkiler tarafından alınan Bor'un, hücre duvarlarında ve sitoplazma içerisinde çok hızlı bir şekilde Bor kompleksi oluşturduğunu, aşırı miktardaki Bor'un hücre içinde artarak toksik etkiye neden olduğu bilinmektedir (Hu vd., 1997).

Bor'un bitkiler tarafından alımın mekanizması tam olarak bilinmese de hem aktif hem de pasif taşınmayı destekler nitelikte kanıtlar bildirilmektedir (Benkovic vd., 2005) . Bitkilerde bulunan Bor1 ve Bor4 membran efflux proteinleri ile Bor'u dışarı pompalayarak bitki için zararlı konsantrasyonundan kurtulma stratejisi bilinmektedir (Miwa vd., 2006). Bitkiler için gerekli tüm elementler içinde B, eksiklik belirtilerine neden olan düzeyi ile toksik etki yapan düzeyi birbirine çok yakın olma özelliğindeki tek elementtir (Taban, 2000). Biyotik ve abiyotik stres koşullarına bağlı olarak bitkilerde ortaya çıkan "oksidatif stresin B eksikliği ve fazlalığı durumlarında da ortaya çıktığı bildirilmektedir (Cakmak ve Romheld, 1997).

1.1.2. Bor ve insan sağlığı

Bor'un vücutta % 90-95 kadarı birikmeden üre ile dışarı atılmaktadır. Yani vücutta pek tutulmamaktadır. Yalnızca, kemik, tırnak ve kıllarla karaciğer ve dalak gibi organlarda biraz birikmektedir (Sayli, 2000). Bor'un toksik etkisinin çok düşük olup akut etkisinin de 2-5 g borik asit doğrudan alınırda ortaya çıktığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre de Bor'un kronik etkisinin ise sadece protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını arttırdığı gözlenmiştir (Moseman, 1994). Bor'un toksik etkisi yetişkinlerde baş ağrısı, kusma, ishal, heyecan veya depresyon çocuklarda ise daha çok havale, koma gibi beyin zarı tahribi etkileri şeklinde görülmektedir. Parmak uçlarında görülen pembe renk, bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik görüşlerdir (Mc Kee ve Wolf, 1963). Bazı kaynaklarda Bor tozlarıyla temas eden işçilerin sperm sayısında düşüklük, cinsel hayatlarında gerileme olduğu iddia edilmiştir. Ancak ülkemizde ve dünyada yapılan

pek çok araştırmada Bor'un kısırlığa yol açmadığı sonucuna varılmıştır (Sayli, 2000).

Borun insan vücudu için çok yararlı etkileri olduğu da tespit edilmiştir. Bor'un kalsiyum ve D vitamini olmak üzere vücut minerallerinin düzenlenmesinde rol oynadığı, kalsiyum ve magnezyumun azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, kalsiyum ve magnezyum eksikliğinden kaynaklanan stresi önlemek için günde 1 mg Bor'un insan vücuduna yararlı olduğu görülmüştür (Who, 1998). Bor mineralinin kalsiyum ve D vitaminin aktivasyonun yanında, kemik dokusunun korunması ve çözünmüş tuzların uzaklaştırılmasını önlenmesinde, bağışıklık ve hormonal sistemin güçlendirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca Bor minerali, kalsiyum ve D vitamini eksikliğinden kaynaklanan osteoporoz riskini önlediği, vitamin D ve steroid hormonunun aktif şekline dönüşmesine yardımcı olduğu saptanmıştır (Devirian ve Volpe, 2003; Naghii ve Samman, 1993; Gaby, 1999).

Bor'un beyin kanserlerinin tedavisinde kanserli hücrelerinin seçilerek imha edilmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Bor bileşikleriyle yapılan kanser çalışmalarında prostat kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve lösemi hücreleri kullanılmıştır (Barranco ve Eckhert, 2004; Barranco vd., 2009; Scorei vd., 2008). Bor, uygulanan bölgede sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması nedeniyle tercih nedeni olmaktadır. Özellikle Bor kullanılarak yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinde mitoz miktarında azalma tespit edilmiştir. Mitoz miktarı azalması tümör büyüklüğünde de gerilemeye neden olduğu görülmüştür. Ayrıca çocukların öğrenme yetenek ve okul becerilerinin artmasına katkıda bulunduğu, sportif performans ve atletik yapının gelişmesi için tablet şeklinde Bor alındığı bilinmektedir.

1.1.3. Bor ve hayvanlar

Bor'un hayvanlara etkisini incelemek maksadıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar borun hayvanlar üzerindeki etkisinin bor miktarı ve temas süresine bağlı olduğunu göstermiştir. Hayvanlar için öldürücü doz hayvan türüne

göre 1.2-3.45 g/kg arasında değişmektedir. 2500 g/l konsantrasyonun büyümeyi önlediği için zararlı olduğu gözlenmiştir.

Farelerin, tavşanların ve sıçanların borik asiti ağızdan alması durumunda düşük toksite gözlenmektedir. Göz ve deride tahriş çözeltinin alkaliliğine bağlıdır (Nielsen vd., 1987). Ağız yoluyla kg vücut ağırlığına 3-4 g gibi pek yüksek dozlar sıçanlarda kısa sürede depresyon ve titremeler yaratmakta ve hayvanı ölüme götürmektedir. Ayrıca farelerde ishal, köpeklerde kusma gibi belirtilerde gözlenmektedir (Mastromatteo ve Sullivan, 1994).

Balıklar üzerine etkisi düşük toksite olarak bilinmektedir. Bazı larva, karınca ve hamam böceklerin öldürülmesinde Bor uzun süreden beri insektisit olarak kullanılmaktadır. Balıkların daha yüksek konsantrasyonları tolere edebileceği, örneğin 5000 mg/l borun alabalıkta sadece derinin koyulaşmasına neden olduğu veya küçük tatlı su balıklarında hiçbir etki yapmadığı gözlenmiştir. Deniz balıklarının 20 °C' de 6 saat süreyle damıtık suda 18 g/l- 19g/l veya sert suda 19-19,5 g/l Bor iyonu ile teması öldürücü doz olarak tespit edilmiştir. İneğe 40 gün boyunca 16-20 g/gün borik asit verilmesi durumunda herhangi bir etkinin olmadığı görülmüştür (Epa, 1986).

1.1.4. Bor ve bakteriler

Bakteri ve Bor ilişkisi açısından en önemli bulgu Hisarcık/ Kütahya topraklarından izole edilip ilk kez adlandırılan *Bacillus boronophilus*'tur (Ahmed vd., 2007c). Bu bakteri Bor olmadan yaşayamamakta ve 450 mM borik asit konsantrasyonuna kadar tolerans göstermektedir. Bor'a direnç seviyelerinin tespitinde bitkiler arasında bir genetik varyasyon saptanmıştır (Moody, 1988). Bundan dolayı, mikroorganizmaların da Bor'a dirençliliklerinde bir çeşitliliğin görülmesini beklemek doğaldır ve bu çeşitliliğin hangi gen ve DNA bölgelerinden kaynaklandığını bulmak uzun vadede mümkün olabilecektir. Bakterilerde bu genomik bölgelerin tespiti bitkilere göre daha çok mümkündür. Ancak bunların yapılabilmesi için bilim dünyasına Bor toleransı yüksek olan bakterilerin sunulması gerekmektedir. İşte bu tezde, bazı mikroorganizmalarda Bor tolerans seviyesinin bulunması ve Bor'a bağlı bakterilerin

büyüme hızlarının belirlenmesi ile Bursa-Kestelek madeni ve çevresinden yüksek miktarda Bor'a tolerans gösteren bakterilerin izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu yapılarak Bor konusundaki bilimsel çalışmalara yardımcı olunacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bazı Mikroorganizma Türlerinin Bor Toleranslarının, Büyüme Eğrilerinin ve SDS-PAGE Profillerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, 37 farklı türe ait mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bor toleranslarının belirlenmesi, büyüme eğrisi çalışmaları ve SDS-PAGE çalışmaların da kullanılan bu mikroorganizmalar Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Öncelikle farklı mikroorganizma türlerinin üç farklı yöntemle Bor toleransları belirlenmiştir. Bor toleransı belirlenen mikroorganizmaların büyüme eğrisi belirlenmiştir. SDS-PAGE çalışmaları için ise hücreler O D 1'e kadar yetiştirilip farklı Bor konsantrasyonlarındaki toplam protein farklılıkları araştırılmıştır.

Çizelge 2.1. Bu çalışmada çeşitli deneylerde kullanılan mikroorganizma türleri

Mikroorganizma türleri	
• <i>Aeromonas hydrophila</i>	• <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
• <i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1061T	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212
• <i>Bacillus firmus</i> CECT 14T	• <i>Pseudomonas tolasii</i> NCPPB 2192T
• <i>Bacillus licheniformis</i> CECT 491	• <i>Serratia</i> sp.
• <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	• <i>Staphylococcus arlettae</i> B-14764
• <i>Candida albicans</i> ATCC 10239	• <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P
• <i>Candida utilis</i> CCTM L 991	• <i>Staphylococcus carnosus</i> B-14760
• <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34T	• <i>Staphylococcus cohnii subsp. cohnii</i> B-14756
• <i>Cupriavidus necator</i>	• <i>Staphylococcus epidermis</i> B-14768
• <i>Cupriavidus oxaliticus</i> DSM 1105T	• <i>Staphylococcus gallinarum</i> B-14763
• <i>Escherichia coli</i> K12	• <i>Staphylococcus ludunensis</i> B-14774
• <i>Klebsiella pneumoniae</i>	• <i>Staphylococcus simulans</i> B-14753
• <i>Klebsiella</i> sp.	• <i>Streptococcus iniae</i>
• <i>Lactococcus garviae</i>	• <i>Streptococcus</i> sp.-a
• <i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686T	• <i>Streptomyces albus</i> CIP 104432T
• <i>Methylobacterium suomiense</i> NCIMB 13778T	• <i>Vibrio anguillarum</i>
• <i>Methylobacterium thiocynatum</i> DSM 11490T	• <i>Xanthobacter agilis</i> NEU 2015T
• <i>Microbacterium</i> sp.	• <i>Yersinia ruckerii</i>
• <i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375	

2.1.1. Bazı mikroorganizmaların Bor toleranslarının belirlenmesi

2.1.1.1. Bazı mikroorganizmaların plate-plaka yöntemi

Bu çalışmada farklı borik asit konsantrasyonları içeren 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 ve 350 mM borik asit içeren müller hington agar besi yeri pH=7 olacak şekilde hazırlanmıştır. Besiyerlerine öze ile yayma yöntemiyle bakteriler

ekilmiş, 30 °C’de 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakterilerin üremesi, var (+) veya yok (–) şeklinde ifade edilmiştir.

2.1.1.2. Bazı mikroorganizmaların tüp dilüsyon yöntemi

Katı besi yerinde üremiş olan mikroorganizma kolonisi, öze ile kazınarak, 5 ml PBS (fosfat buffer saline) içinde süspanse hale getirilmiştir. Mikroorganizmaların inokülasyonu sırasında tüplerdeki yoğunluğun eşit olmasına dikkat edilerek Mc Farland 3 yoğunluğuna getirilmiştir. Buradan alınan 5 µl bakteri süspansiyonu, farklı Bor konsantrasyonu içeren 0, 12,5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mM borik asit içeren 5 ml isosensitest broth (Oxoid CM0473) besi yerine pH 7 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Mikroorganizmaların üreme durumları, 48 saat 30 °C inkübasyona bırakılmıştır ve belli periyotlarla (günde 5–6 kez) vortekslenerek karıştırılan süspansiyonlarda yer alan üreme değerleri, spektrofotometrede O D 600’de ölçülerek, kaydedilmiştir.

2.1.1.3. Bazı mikroorganizmaların Bor tolerans nokta testi

Test edilen mikroorganizmalarının genellikle TSBA (triptik soy broth agar) veya uygun besi yerine tek koloni ekimi yapılmıştır, saflıkları kontrol edilen mikroorganizmalar, soğuk 5 ml PBS içinde Mc Farland 3 yoğunluğunda süspanse edilmiştir. Her bir mikroorganizma süspansiyonundan 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 olmak üzere dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyondan 6 µl alınarak mikroorganizmaların 0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM borik asit içeren TSBA besi yerlerine “nokta” inokulasyonlar yapılmıştır. 30 °C’de 72 saat sonra gelişimleri fotoğraflanmış ve gözlemler not edilmiştir.

2.1.2. Bazı bakterilerin büyüme eğrisi çalışmaları

Bakterilerin -20 °C’ de saklanan gliserol stoklarından TSBA veya MSMA (Medium H3P DSMZ) katı besi yerine tek koloni ekimi yapılarak, saflıkları kontrol edilmiştir. Bakteri hücreleri soğuk 5ml PBS içinde McFarland 3 yoğunluğunda süspanse edilmiştir. Bakterilerin Bor tolerans değerlerine bakılarak 4 farklı borik asit

konsantrasyonu içeren TSB besi yeri, isosensitest veya MSM besi yerlerine inokulasyonlar yapılmıştır. 30 °C 150 rpm’de çalkalamalı inkübatore (ZHWHY-211B, GFL veya Stuart) konulup, belirli zaman aralıklarında (UVmini–1240) spektrofotometrede O D 600 nm’de değerler ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

2.1.3. Bazı bakterilerin SDS-PAGE ve Native-PAGE çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan bazılarının Bor tolerans değerlerine bakılarak 4 farklı borik asit konsantrasyonu içeren genellikle TSB veya MSM besi yeri hazırlanmıştır. Hücreler O D 600 nm’de 1.0 olacak şekilde yetiştirilmiştir. Daha sonra 5000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmış ve üst faz (besi yeri) dökülmüştür. Üst faz döküldükten sonra pelletler bir sonraki çalışmada kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır. Falcon tüplerine konulan örnekler pelletlerin hacmine göre 500 µl, 750 µl veya 1000 µl 10 mM Tris-Cl eklenmiştir. Önce örnekler 20 saniye sonikasyon uygulanmıştır. Buradaki amaç hücre topluluklarının ayrıştırılarak yüzeyin arttırılmasıdır. Ön sonikasyon işleminden sonra lizozim eklenmiştir (10 mg/ml stok solüsyonundan, 1 mg/ml son konsantrasyon olacak şekilde). Lizozim reaksiyonu için örnekler buz üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra, %45-50’lik güçte ayarlanan sonikasyon cihazında, 5 kez, 20’şer saniye sonikasyon yapılmıştır (HD2200 Bandelin sonikatör). Sonikasyondan sonra, 5 dk. 5000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra örnekler Ependorf tüplerin içinde, 5 dk. 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Supernatant saklanmıştır. Her bir supernatanttaki total protein miktarı Bradford metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Örneklerin içerdikleri protein miktarlarına göre poliakrilamid jelin kuyularına eşit miktarda (30-40 µg) protein yüklenmiştir. Poliakrilamid jel 150V–180 V’da Atto (Japan), Thermo veya Biorad marka elektroforezde yürütülmüş, protein profilleri gözlenmiştir.

2.1.3.1. Protein konsantrasyon tayini

Protein konsantrasyon tayini Bradford metodu ile yapılmıştır (Bradford, 1976). Protein konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda elde edilen değerler ile hesaplanmıştır. Öncelikle spektrofotometre bradford assay boyası ile sıfırlanmıştır. Ölçüm küvetlerine hazırlanan protein ekstraktlarından 10 µl alınmış ve

1990 µl bradford boyasından eklenmiştir. Bu örnekler 45 dk oda koşullarında bekletilmiş ve absorbans ölçümleri alınmıştır. Standart konsantrasyon eğrisi farklı miktarlarda BSA (bovine serum albumin) içeren örneklerin ölçülmesiyle elde edilmiştir. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu, konsantrasyonları bilinen örneklerin (BSA ile ölçülen) verdiği absorbans değerleriyle karşılaştırılarak bulunmuştur. Bulunan bu değerlerden faydalanılarak eşit miktarda proteinin jele yüklenmesi amaçlanmıştır.

2.2. Bursa İlindeki Bor Madeni ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu

2.2.1. Örnekleme

Örnekleme alanı olarak Tübitak 107T796'nolu proje kapsamında Bursa-Kestelek Bor madenine ziyaretler gerçekleştirilerek Bor açısından zengin olan toprak ve su örnekleri toplanmıştır. Bursa iline bağlı Mustafa Kemal ilçesinde yer alan Kestelek köyündeki maden ve çevresinden örnekler alınmıştır (BUK örnekleri). Ayrıca madenin yanından küçük bir çay geçmektedir. Çayın altında bulunan Camandar köyü başta olmak üzere, birçok lokasyondan örnekler alınmıştır. Toprak örnekleri için; toprağın üst kısmı 1-2 cm uzaklaştırılmış ve 10 cm derinliğinde bir çukur açılmış, çukurun yüzeyinden yukarıdan aşağıya doğru kazıma yöntemi ile 100 gr civarında örnek alınmış ve poşetlere koyulmuştur. Her bir örnek etiketlenip laboratuara getirilerek +4 °C' de saklanmıştır. Su örnekleri ise 50ml'lik steril falkon tüpler içerisine alınmış ve +4 °C' de saklanmıştır. Örneklerin ve daha sonra elde edilecek izolatların isimlendirilmesi Bursa Kestelek bölgesinin harfleri kullanılarak BUK şeklinde yapılmıştır. Örneklerin izolasyonu "Balıkesir-Bigadiç Bor maden yatakları ve çevresinden Bor toleransı yüksek bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu" adlı yüksek lisans tezinde anlatıldığı gibi yapılmıştır (Tanrıseven, 2011).

2.2.2. İzolatların Bor toleranslarının belirlenmesi

İzolatların Bor toleransını belirlemek için, stoktan TSBA (triptik soy broth agar) besi yerine tek koloni ekimi yapılmıştır. 48 saat sonra gelişen koloniler saflık

kontrolünden sonra 5 ml PBS içerisinde çözölmüş ve Mc Farland 3 (O D 600 nm =0,05) yoğunluğuna getirilmiştir. Bu bakteri solösyonundan 250 µl alınarak 250 µl PBS yer alan endorf içine eklenmiştir. Daha sonra bu karışımın içinden yine 250 µl alınmış ve 250 µl PBS içine koyulmuştur. Bu şekilde steril ortamda seri dilösyonlar la 1/2, 1/4, 1/8, ve 1/16 'lık bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Daha sonra her bir endorf, 5 farklı dilösyondan (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16) alınmış ve 6 µl, 7 petrideki besi yerlerine (0, 50, 75, 100, 150, 200, 300 mM borik asit) ekilmiş ve bakteri izolatının büyümesi takip edilmiştir. Spesifik Bor konsantrasyonu bakteri için toksik olmaya başlayınca bakteri gelişmemiştir. Büyümeler 30°C'de 72 saat izlenmiş ve değeriendirilmiştir. 4-5 gün inkübatörde bırakılan petrilereki besi yerlerinde üreme olup olmadığı + veya – (var veya yok) şeklinde tabloya yazılarak, bakterilerin Bor toleransları tespit edilmiştir. Son olarak bakteri gelişimleri fotoğraflanmış ve gözlemler not edilmiştir.

2.3.3. İzolatlardan DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

2.3.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu; klasik fenol-kloroform metoduna (Sambrook vd., 2006) optimizasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'sı izole edilecek bakteriler stoklarından alınarak, TSBA besi yerine tek koloni ekimi yapılmıştır. Saf oldukları göz ve mikroskop ile kontrol edilen kolonilerden öze yardımıyla bir loop alınarak endorf tüp içinde 50 µl su ile çözölmüştür. 13.300 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelletler elde edilmiş ve süpernatantlar dökölmüştür. Pelletlerin üzerine 567 µl TE (Ph 8) eklenmiş ve pipetaj yapılarak pelletlerin çözölmesi sağlanmıştır. 10mg/ml hazırlanmış lizozim çözeltisinden 142 µl eklenerek tüpler alt üst edilmiş ve 37°C 'de 15 dk inkübe edilmiştir. %10'luk SDS çözeltisinden 30 µl ve 20 mg/ml Proteinaz K çözeltisinden 3 µl eklenip karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 5M NaCl 'den 100 µl ve 80 µl CTAB/NaCl'den eklenip 65°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Eşit hacimde kloroform: izoamil alkol (24:1) eklenip ters yüz edilmiş ve kısa süreli vortekslenmiştir. 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol (25: 24:1) eklenip 10000rpm'de 5 dk santrifüj

edilmiştir. Daha sonra fenol aşaması tekrarlanmıştır. Üst faz alınıp 600µl izoprapanol eklenmiş ve DNA çökene dek alt üst edilmiştir. -20°C’de yaklaşık 30 dk bekletilmiş ve 15000 rpm’ de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve DNA pelletlerine 80 µl %70’lik etanol eklenmiştir. Oda koşulunda 14000 rpm’de santrifüj edilerek DNA yıkanmıştır. Tüpler ters çevrilerek oda koşulunda kurutulmuş ve alkolün uzaklaşması sağlanmıştır. Pellet üzerine 50µl TE eklenerek 56°C’de yarım saat inkübe edilmiştir. 10mg/ml RNase ‘dan 5µl eklenerek 37°C de 45 dk inkübe edilerek RNA’lar uzaklaştırılmıştır. DNA izolasyon işleminin sonucunu görebilmek için %0,8’lik agaroz jele 3 µl yüklenerek sonuçlar gözlemlenmiştir.

2.3.3.2. PCR yöntemiyle 16SrRNA geninin çoğaltılması

16SrRNA geni, her bir BUK izolatından elde edilen genomik DNA’dan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGAC TT -3') evrensel primerler kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltılmıştır (Sambrook vd., 2006). 2 µl kalıp DNA, 5 µl 10X Taq buffer, 6 µl MgCl₂ (10mM) , 1 µl dNTP (10mM) , 2 µl 1492R reverse primer (10pmol), 2 µl 27F forward primeri (10pmol), 0,5 µl Taq DNA polimeraz karışımına ddH₂O ile 50 µl reaksiyon oluşturulmuştur. Çoğalma işlemi 0,2 ml tüplede eppendorf marka PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon dereceleri ve süreleri ise; ilk denatürasyon basamağı 95°C’de 1 dk. bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 95°C’de 1 dk. denatürasyon, 54°C’de 1 dk. bağlanma, 72°C’de 1 dk uzama şeklinde son olarak bir kez 72°C ‘de 10 dk uzama basamağıyla, 4°C’de bekletilecek şekilde programlanan PCR termal cykler (‘eppendorf Netheler-Hinz GmbH 22331-Hamburg’) koyulmuştur. Böylece istenilen bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir (Katsivela vd., 1999).

Elde edilen PCR ürünlerinden 8 µl alınarak 2 µl 6X DNA loading dye kullanarak toplamda 10 µl, % 0.8’lik hazırlanan agaroz jelde elektroforez yapılmış ve PCR ürünleri Etidyum bromür ile boyanıp görüntülenmiştir.

2.3.3.3. 16SrRNA geni sekans analizi çalışmaları

Her bir BUK izolatından üçer adet PCR reaksiyon agaroz jelde koşulmuş ve tam olarak istenilen bölgenin pürifikasyonu için agaroz jelden PCR ürünleri steril jilet yardımıyla kesilmiştir. DNA'nın saflaştırılması için Gene JET Gel Extraction Kit (Fermantas) kullanılmıştır. Elde edilen örnekler 1 µl olmak üzere %0,8'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez gerçekleştirilmiştir. Böylece bantların temiz şekilde istenilen büyüklükte olduğu kontrol edilmiştir. Bu tüplerden 20 µl alınarak DNA dizi analizi yapan şirkete (Macrogen, Korea) gönderilmiştir.

2.3.3.4. Biyoinformatik analiz

16SrRNA geni sekans sonuçları; BioEdit biyoinformatik yazılım paketleriyle analiz edilmiştir. Öncelikle gelen sonuçlardaki $QV \geq 20$ değerleri dikkate alınarak sekans kalitesi değerlendirilmiştir. Ayrıca gelen sekanslar Bioedit programıyla açılarak okunan dizilerin piklerine bakılarak da sekans kalitesi hakkında fikir edinilmiştir. Piklerin karışmış olması sekans kalitesinin düşük olduğunu ve okumanın hatalı olduğunu göstermektedir. İki farklı primer ile elde edilen okumalar Bioedit programının contig analizi (CAP) ile birleştirilmiş ve tüm 16SrRNA gen sekans dizisi elde edilmiştir. Hizalanan (align edilen) nükleotid sekans sonuçları BlastN programı kullanılarak GenBank nükleotid verileri ile karşılaştırılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Filogenetik analizler Clustal W ve Neighbour-joining metodu kullanılarak MEGA-4 paket programı ile yapılmıştır (Tamura vd., 2007).

2.3.4. Bazı izolatların büyüme eğrileri

Seçilen bazı izolatların 0 mM borik asit içeren TSBA besi yerine tek koloni ekimi yapılmıştır. 30°C'de inkübasyona bırakılmış olan petrilerden 24 saat sonunda tek kolonilerinden alınarak cam tüplerde hazırlanan 50 mM TSB besi yerine kürdan ile ekilmiştir. 30°C'de çalkalanan tüpler 24 saat sonunda belirli yoğunlukta üremişlerdir.

Ayrıca 6 adet Bor konsantrasyonu (0-50-100-150-200-300 mM borik asit) içeren 50 ml erdenler hazırlanmıştır. Bu erdenlerin her bir konsantrasyonuna tüplerdeki bakteri kültürlerinden belirli miktarlarda inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyonların miktarlarını belirlemek için, tüplerdeki bakteri kültürlerinden 200 µl alınmış ve 1800 µl besi yeri ile birlikte (1/10 dilüsyon) spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) O D 600 değerleri ölçülmüştür. Başlangıç O D değerleri 0,05 olması belirlendiğinden inokülasyonu miktarı burada çıkan değerlere göre hesaplanmıştır. İnokülasyonu yapılan erdenler 30°C de çalkalamalı inkübatöre koyulmuştur. İlk 2 saat ölçüm alınmamış ve sonra her saatte bir ölçümler alınarak büyüme eğrileri değerleri belirlenmiştir. Bu değerlerden Microsoft Excel programıyla tablo oluşturulmuş ve grafikler çizilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

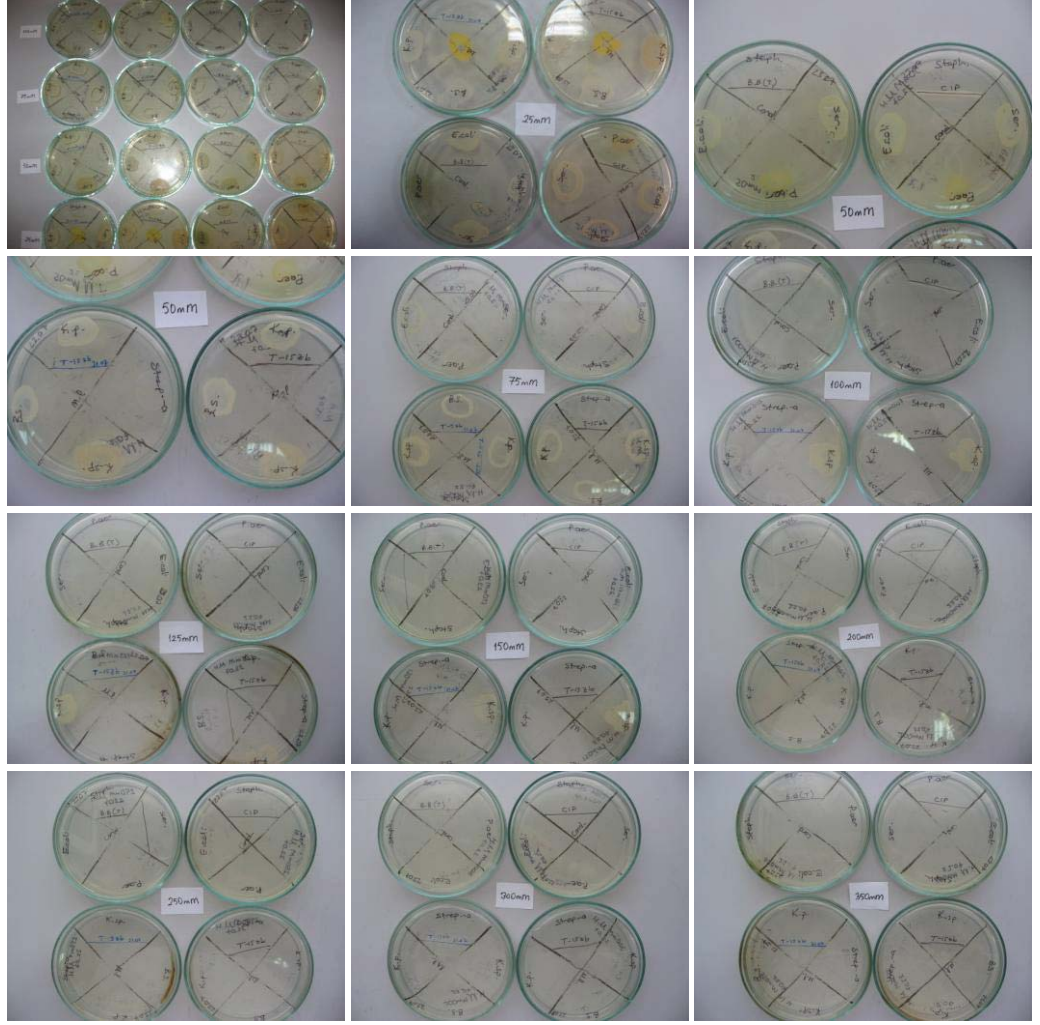
3.1. Bazı Mikroorganizma Türlerinin Bor Toleranslarının, Büyüme Eğrilerinin ve SDS-PAGE Profillerinin Belirlenmesi İle İlgili Sonuçlar

3.1.1. Bazı bilinen mikroorganizmaların Bor toleranslarının saptanması

Bu çalışmada seçilen bazı mikroorganizma türlerinin, borik asit formundaki Bor'a tolerans seviyeleri saptanmıştır. 3 farklı yaklaşım kullanılmıştır. Bunlar, “plate-plaka yöntemi”, “tüp dilüsyon yöntemi” ve “Bor tolerans nokta testi” olarak adlandırılmıştır.

3.1.1.1. Plate-plaka yöntemi

Burada farklı borik asit konsantrasyonları (0-350 mM borik asit) içeren katı besi yerlerine öze ile yayma yöntemiyle bakteriler ekilmiş ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1.). 48 ve 72 saat sonra bakteri üremesi, var (+) veya yok (–) şeklinde ifade edilmiştir (Çizelge 3.1). Bu yöntemle 16 farklı mikroorganizma türü denenmiştir. Bu türlerin büyük çoğunluğunun 25-75 mM borik asit konsantrasyonuna direnç gösterdiği görülmüştür. Burada iki türün 100 mM borik aside direnç gösterdiği bulunmuştur. *Klebsiella sp.* türü ise 150 mM borik aside direnç göstermiştir.



Şekil 3.1. Petri-Plaka yöntemi ile Bor'un bazı bakterilerin gelişimi üzerine etkisinin tespiti. Bu çalışmada, 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 ve 350 mM borik asit içeren müller hington agar besi yeri kullanılmıştır. Besi yerlerinin pH'sı 7.0 civarında ayarlanmıştır. Besi yerleri arasındaki fark sadece Bor (borik asit) konsantrasyonudur. Bor içermeyen besi yerinde 2 gün geliştirilen bakteriler, yukarıdaki besi yerlerine öze ile çizgi ekim ile yayılarak ekilmiştir. Daha sonra gelişme olup olmadığı 2-3 gün izlenerek fotoğraflar çekilmiş ve üreme kaydedilmiştir.

Çizelge 3.1. Plate-plaka yöntemi ile elde edilen sonuçları

Mikroorganizma adı	Borik asit konsantrasyonu (mM)									
	25	50	75	100	125	150	200	250	300	350
1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	az	-	-	-	-	-	-
2. <i>Candida albicans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>Escherichia coli</i> ATCC11230	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5. <i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6. <i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8. <i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. <i>Staphylococcus arlettae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11. <i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> B-14756	+	+	+	az	az	çok az	-	-	-	-
12. <i>Staphylococcus epidermidis</i> B-14768	+	Az	Az	az	-	-	-	-	-	-
13. <i>Staphylococcus gallinarum</i> B-14763	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14. <i>Staphylococcus lugdunensis</i> B-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. <i>Staphylococcus simulans</i> B-14753	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16. <i>Streptococcus sp.-a</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*Burada + bakteri üremesi var, - bakteri üremesi yok, az veya çok az bakteri üremesinin üremesinin az olduğunu göstermektedir.

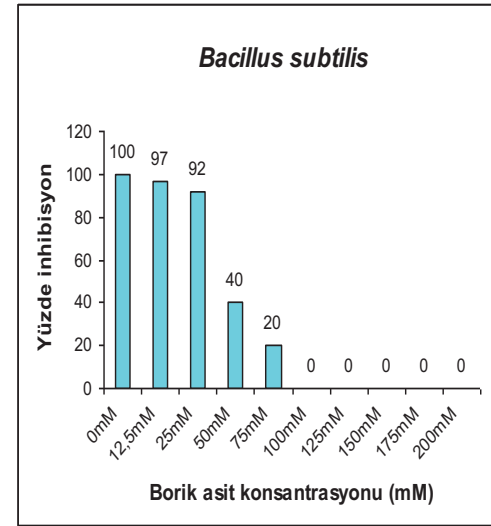
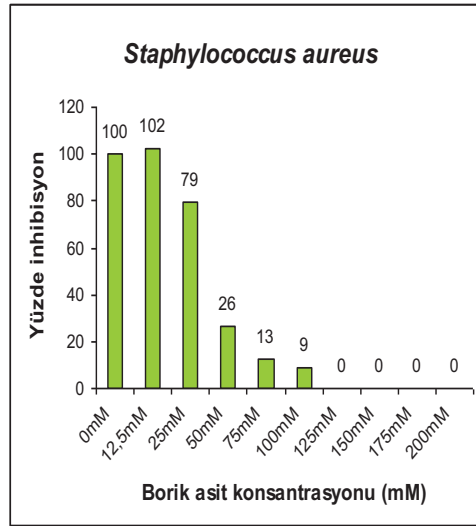
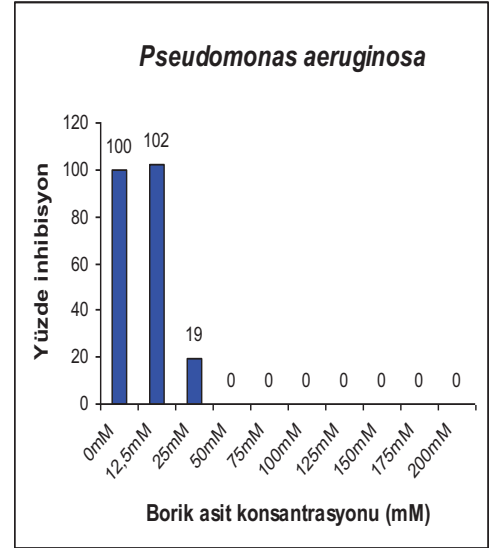
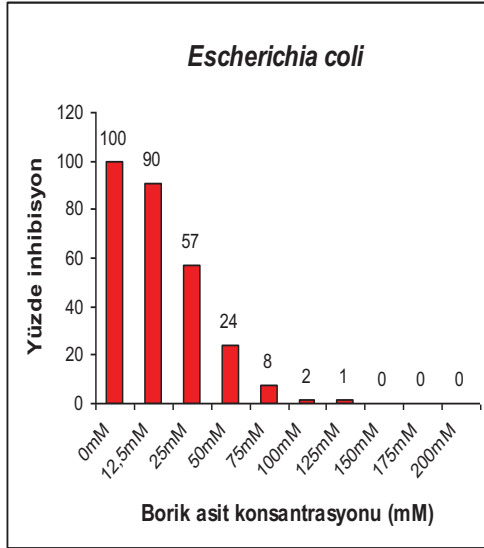
3.1.1.2. Tüp dilüsyon yöntemi

Bu yöntemle göre katı besi yerinde geliştirilmiş olan mikroorganizma kolonisi, özeyi dolduracak şekilde alınarak, 5 ml PBS (fosfat buffer saline) içinde süspanse edilmiştir. inokülasyonu sırasında tüplerdeki bulanıklığın eşit olmasına dikkat edilerek, hemen hemen eşit bakteri hücresinin alınması sağlanmıştır. Buradan alınan 5 µl bakteri süspansiyonu, farklı Bor konsantrasyonu içeren 5 ml sıvı besi yerine inoküle edilmiştir. Burada sıvı besi yeri olarak isosensitest broth (Oxoid CM0473) besi yeri kullanılmıştır. 48 saat 30 °C inkübasyonda bırakılan ve belli periyotlarla (günde 5-6 kez) vortekslenerek karıştırılan süspansiyonlarda yer alan üreme değerleri, spektrofotometrede O D 600'de ölçülmek suretiyle, kaydedilmiştir (Çizelge 3.2.). Ayrıca mikroorganizmanın 0 mM borik asitte gösterdiği O D değeri % 100 büyüme olarak alınıp, borik asitin arttırılmasına bağlı gözlemlenen inhibisyon (yüzde inhibisyon) grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 3.2.-3.5.). Tüp dilüsyon yöntemi ile elde edilen veriler Şekil 3.6. ve 3.7.'de gösterilmiştir. Burada onsekiz mikroorganizma türü denenmiştir ve bu türlerin büyük çoğunluğunun 25-75 mM borik asit konsantrasyonuna direnç gösterdiği bulunmuştur. Bir istisna hariç (*Klebsiella pneumoniae*-hastane izolatu) çalışılan diğer bakterilerin Bor toleransları 50-75mM (borik asit) civarındadır Şekil 3.6. 100 mM borik asit konsantrasyonu üzerindeki değerlerde bakteri üremesi durmuştur. Ayrıca 100 mM ve üzeri borik asit içeren besi yerlerinde *Staphylococcus* üremesi gözlemlenmemiştir. 50 mM ve 75 mM borik asitte O D değerleri çok az görülmüştür Şekil 3.7.

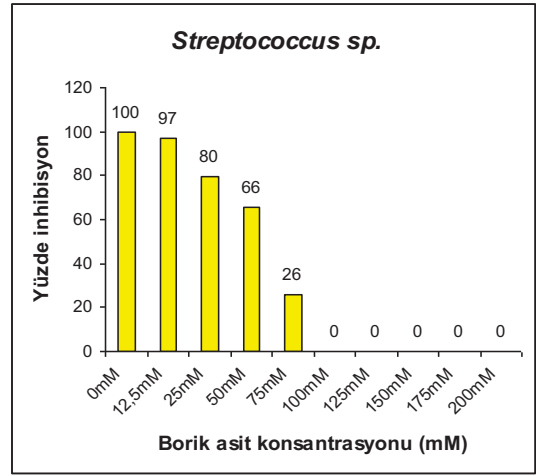
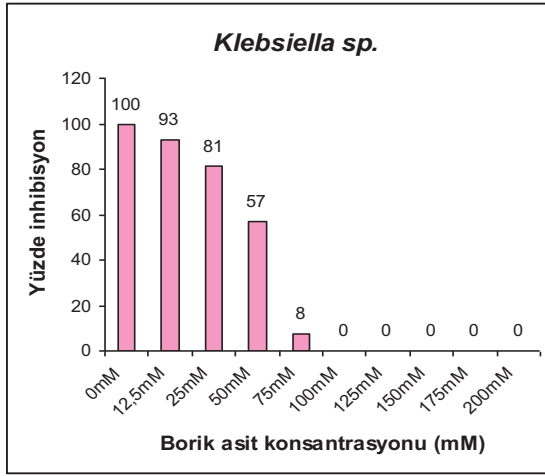
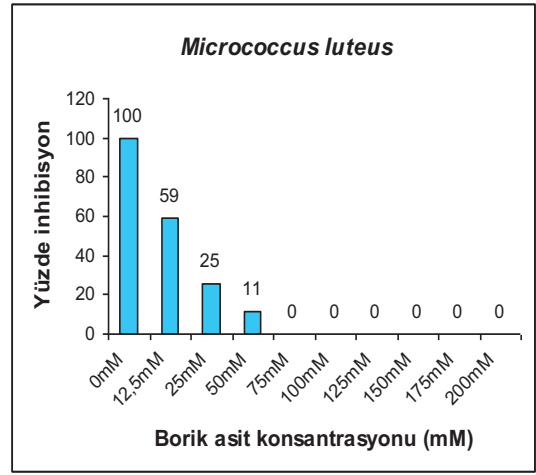
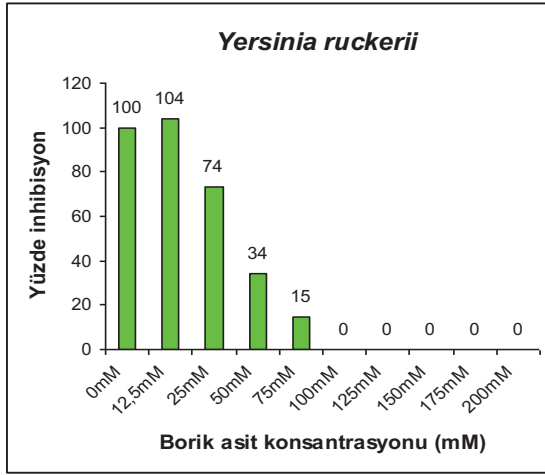
Çizelge 3.2. Tüp dilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçları

Mikroorganizma adı	Borik asit konsantrasyonu (mM)									
	0	12,5	25	50	75	100	125	150	175	200
1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,4	0,4	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2. <i>Escherichia coli</i> ATCC11230	1,3	1,2	0,7	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,1	1,0	0,8	0,7	0,5	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0
4. <i>Klebsiella sp.</i>	1,0	0,9	0,8	0,6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5. <i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375	0,7	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	1,2	1,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7. <i>Serratia marcescens</i>	1,1	1,1	0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
8. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	0,9	0,9	0,7	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
9. <i>Staphylococcus arlettae</i> B-14764	0,8	0,8	0,4	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10. <i>Staphylococcus carnosus</i> B-14760	0,8	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11. <i>Staphylococcus cohnii subsp.cohnii</i> B-14756	0,4	0,6	0,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12. <i>Staphylococcus epidermidis</i> B-	1,0	0,8	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13. <i>Staphylococcus gallinarum</i> B-	0,9	0,9	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14. <i>Staphylococcus lugdunensis</i> B-14774	0,6	0,5	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15. <i>Staphylococcus simulans</i> B-14753	0,9	0,7	0,6	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16. <i>Streptococcus sp.-a</i>	0,5	0,5	0,4	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17. <i>Streptomyces albus</i> CIP ATCC 104432	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
18. <i>Yersinia ruckerii</i>	0,4	0,4	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

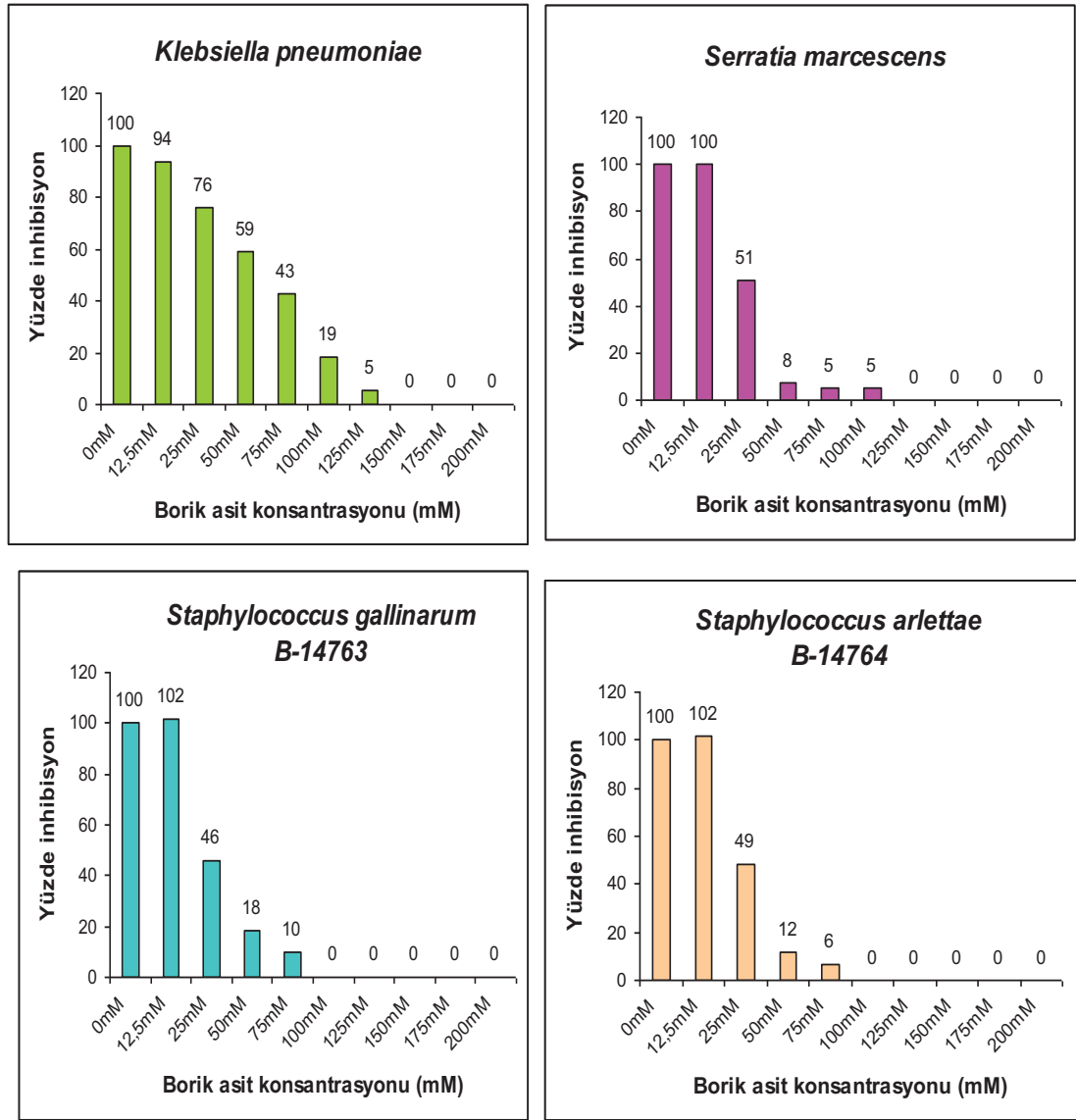
*Çizelge içerisindeki rakamlar O D 600'de ölçülen üreme değerlerini göstermektedir.



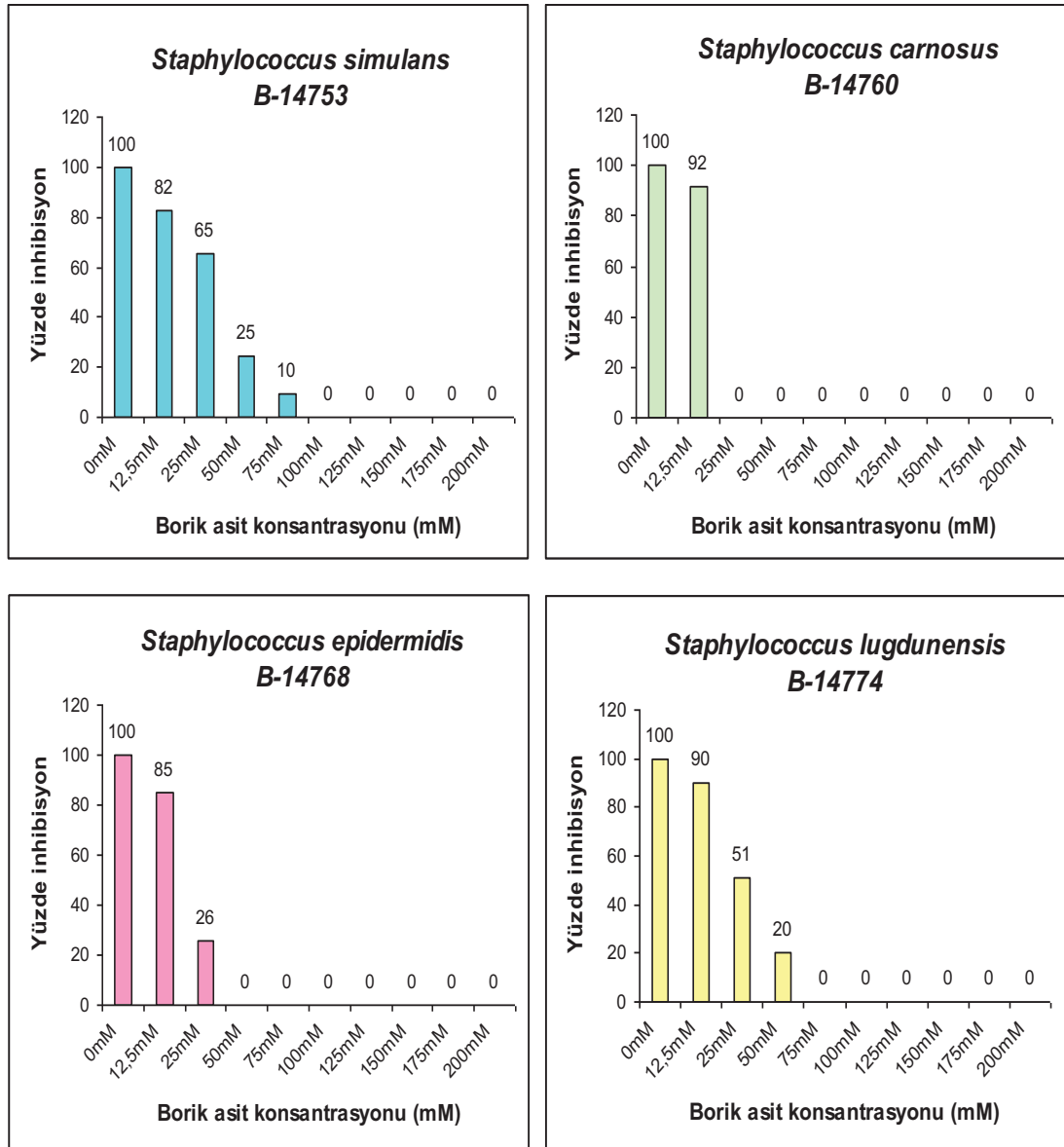
Şekil 3.2. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarındaki yüzde inhibisyon değerleri. Tüp dilüsyon yöntemi ile O D 600 değerleri elde edilmiştir. 0 mM borik asit içeren besi yerinden elde edilen O D 600 değeri 100 (yüz) olarak normalize edilerek, diğer borik asit konsantrasyonlarındaki O D değerleri de buna göre ayarlanmış ve bakteri büyümesi üzerine Bor etkisi yüzde inhibisyon olarak gösterilmiştir.



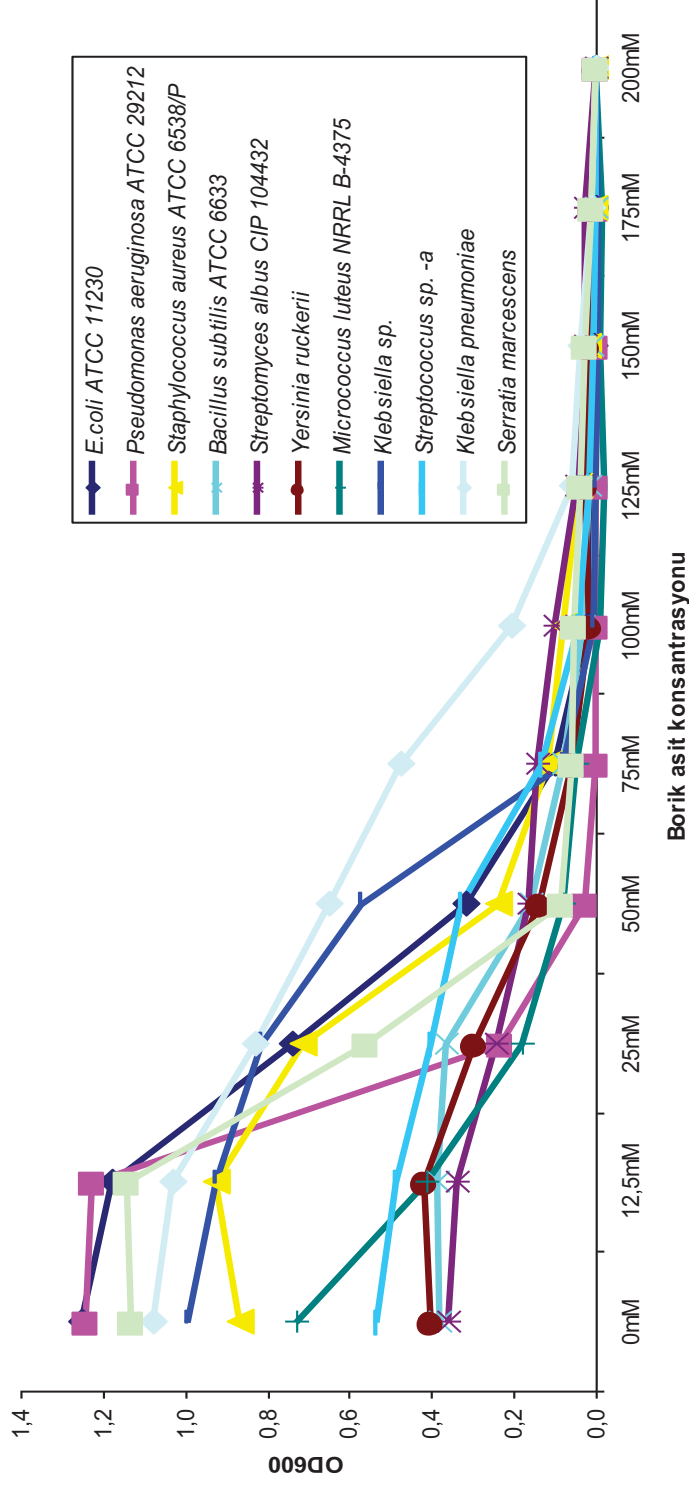
Şekil 3.3. *Yersinia ruckerii*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella sp.* ve *Streptococcus sp.* türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarındaki yüzde inhibisyon değerleri. Tüp dilüsyon yöntemi ile O D 600 değerleri elde edilmiştir. 0 mM borik asit içeren besi yerinden elde edilen O D 600 değeri 100 (yüz) olarak normalize edilerek, diğer borik asit konsantrasyonlarındaki O D değerleri de buna göre ayarlanmış ve bakteri büyümesi üzerine Bor etkisi yüzde inhibisyon olarak gösterilmiştir.



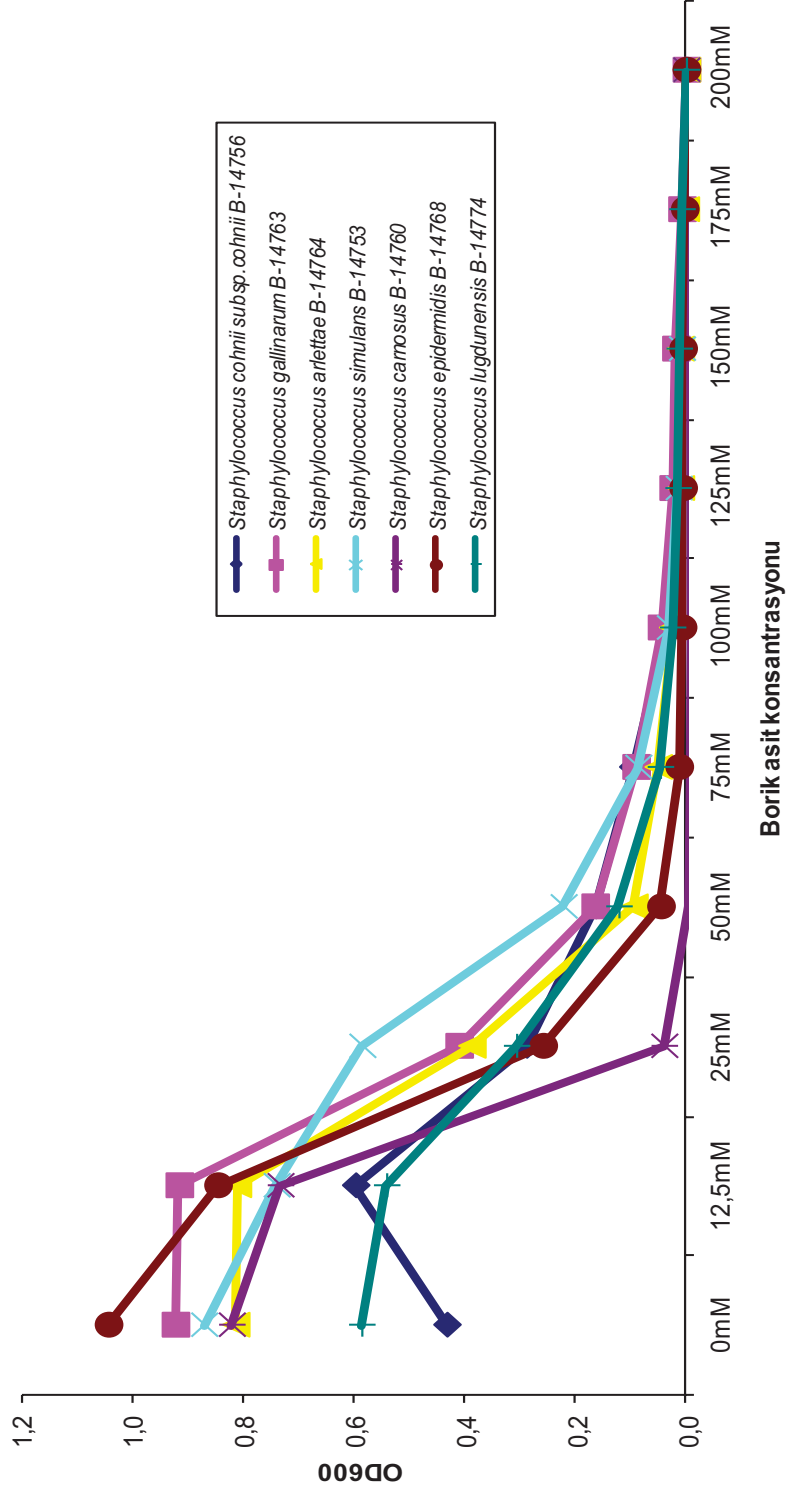
Şekil 3.4. *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus gallinarum* ve *Staphylococcus arlettae* türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarındaki yüzde inhibisyon değerleri. Tüp dilüsyon yöntemi ile O D 600 değerleri elde edilmiştir. 0 mM borik asit içeren besi yerinden elde edilen O D 600 değeri 100 (yüz) olarak normalize edilerek, diğer borik asit konsantrasyonlarındaki O D değerleri de buna göre ayarlanmış ve bakteri büyümesi üzerine Bor etkisi yüzde inhibisyon olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5. *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus lugdunensis* türlerinin çeşitli borik asit konsantrasyonlarındaki yüzde inhibisyon değerleri. Tüp dilüsyon yöntemi ile O D 600 değerleri elde edilmiştir. 0 mM borik asit içeren besi yerinden elde edilen O D 600 değeri 100 (yüz) olarak normalize edilerek, diğer borik asit konsantrasyonlarındaki O D değerleri de buna göre ayarlanmış ve bakteri büyümesi üzerine Bor etkisi yüzde inhibisyon olarak gösterilmiştir.



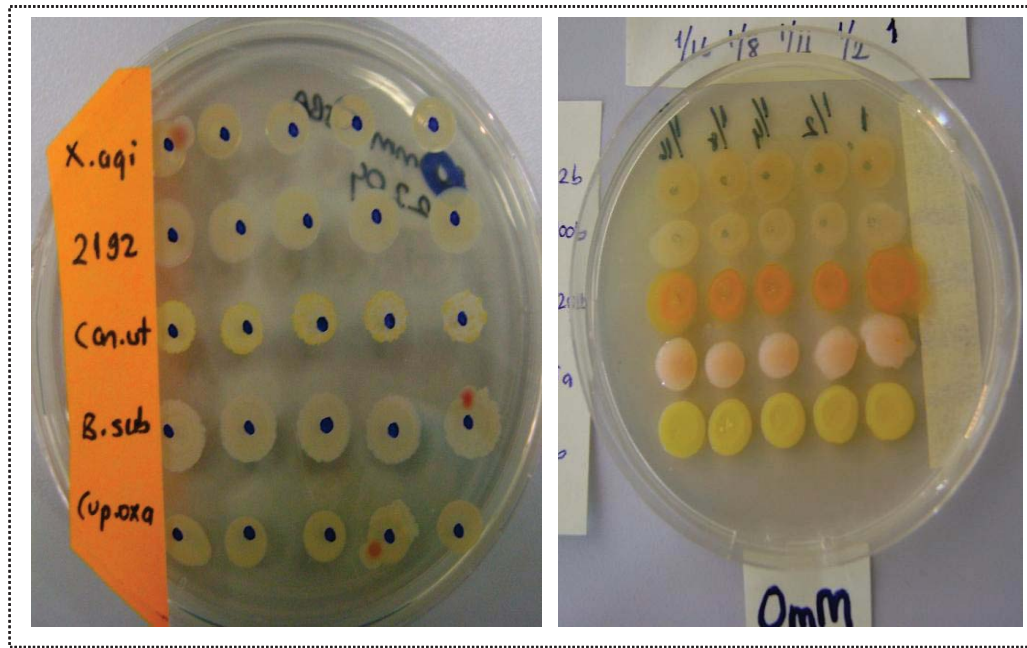
Şekil 3.6. Bazı bakterilerin Bor (borik asit) tarafından inhibisyonu. Tüp dilüsyon yöntemi ile elde edilen değerler grafikte gösterilmiştir.



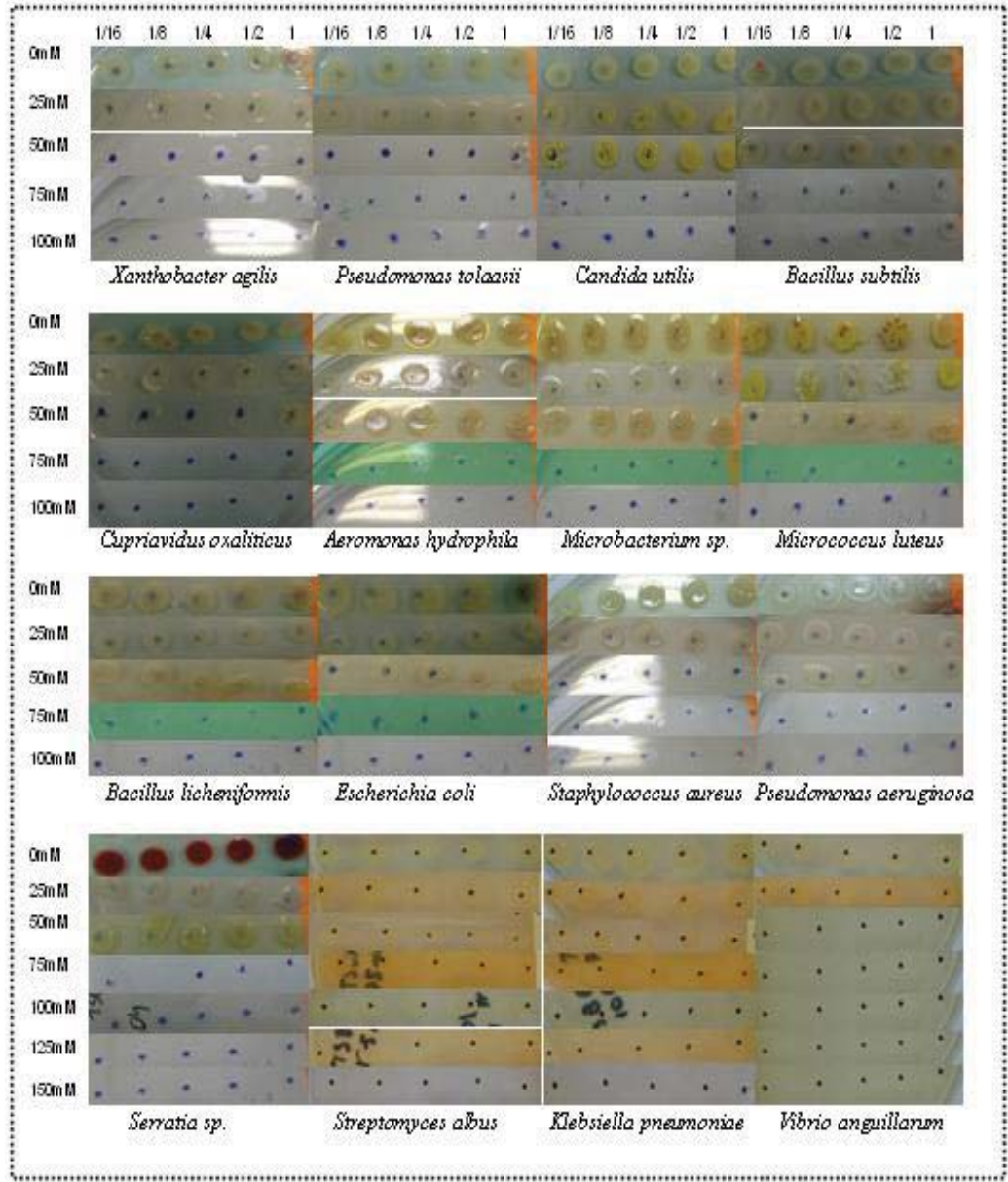
Şekil 3.7. Bazı *Staphylococcus* türlerinin Bor (borik asit) tarafından inhibisyonu.

3.1.1.3. Bor tolerans nokta testi

Bu yaklaşımda 6 µl'lik bakteri süspansiyonu, çeşitli Bor konsantrasyonu içeren besi yerlerine nokta şeklinde inoküle edilerek bakteri üremesi gözlemlenmiştir (Şekil 3.8.). Önce, mikroorganizma türlerinin TSBA besi yerlerine tek koloni ekimi yapılmıştır. Saflıkları kontrol edilen mikroorganizmalar, soğuk PBS içinde Mc Farland 3 yoğunluğunda süspanse edilmiştir. Her bir mikroorganizma süspansiyonundan 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 olmak üzere dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlar dan 6'şar µl alınarak 0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM borik asit içeren TSBA besi yerlerine ekimler yapılmıştır. 30 °C'de 72 saat sonra gelişimleri fotoğraflanmış ve sonuçlar not edilmiştir. (Şekil 3.9.'da mikroorganizmaların bazılarının Bor toleransları gösterilmiştir. Çizelge 3.3.'te mikroorganizmanın test edilen borik asit konsantrasyonlarda ki üreme durumları özetlenmiştir).



Şekil 3.8. Bor tolerans nokta testine bir örnek. Bazı türü bilinen bakterilerle (soldaki resim) ve yeni izolatlarla (sağdaki resim) yapılan rutin Bor tolerans testlerinden örnek olarak, birer petri gösterilmiştir. 0 ile 300 mM arasında değişen borik asit konsantrasyonuna sahip besi yerlerine, Mc Farland 3'e ayarlanan bakteri yoğunluğundan başlayarak 5 farklı dölüsyondan nokta ekimler (6 µl) yapılmıştır. Sağdaki şekilde olduğu gibi bakteri adı ve dölüsyonlar (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16) işaretilenmiş ve 48-72 saat sonra üremeler kaydedilmiştir ve fotoğraflar çekilmiştir.



Şekil 3.9. Türü bilinen bazı mikroorganizmaların Bor tolerans nokta test sonuçları. Deneyler Şekil 3.8.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Her bir petride genellikle 5 mikroorganizmanın analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bilgisayar ortamında, her bir bakteri için farklı konsantrasyondaki üreme resimleri birleştirilerek yukarıdaki şekil oluşturulmuştur. Üreme durumları gözle değerlendirilerek Çizelge 3.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Bazı mikroorganizmaların Bor toleransları

	0	25	50	75	100	125	150
Bakteri adı	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
	(0 ppm)	(270 ppm)	(540 ppm)	(710 ppm)	(1081 ppm)	(1350 ppm)	(1620 ppm)
1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
2. <i>Bacillus firmus</i>	*****	*****	*****	*****	*****	-	-
3. <i>Bacillus licheniformis</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
4. <i>Bacillus subtilis</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ --	-	-
5. <i>Cupriavidus oxaliticus</i>	*****	*****	^----	-	-	-	-
6. <i>E. coli</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-	-	-
7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^	-	-
8. <i>Microbacterium sp.</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
9. <i>Micrococcus luteus</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-	-	-	-
10. <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-	-	-	-
12. <i>Pseudomonas tolaasii</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
13. <i>Serratia sp.</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
14. <i>Staphylococcus aureus</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
15. <i>Streptomyces albus</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^----
16. <i>Vibrio anguillarum</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
17. <i>Xanthobacter agilis</i>	*****	*****	-	-	-	-	-

*0 mM-0 ppm, 25 mM-270 ppm, 50 mM-540 ppm, 75 mM-710 ppm, 100 mM-1081 ppm, 125 mM-1350 ppm, 150 mM-1620 ppm şeklindedir. Yıldız işaretleri bakteri üremesini göstermektedir, yarım yıldızlar zayıf üremeyi temsil etmektedir. 5 yıldız sağdan sola 1/16-1/8-1/4-1/2-1/1 (Mc Farland 3) dilüsyonlar da üremeyi göstermektedir.

Çizelge 3.3. ^(devam)

	0	25	50	75	100	125	150
Bakteri adı	Mm	mM	mM	mM	mM	mM	mM
	(0 ppm)	(270 ppm)	(540 ppm)	(710 ppm)	(1081 ppm)	(1350 ppm)	(1620 ppm)
18. <i>Azospirillum lipoferum</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
19. <i>Candida albicans</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
20. <i>Candida utilis</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
21. <i>Cupriavidus metallidurans</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-
22. <i>Cupriavidus necator</i>	*****	^ ^ ^ ^ ^	-	-	-	-	-
23. <i>Lactococcus garviae</i>	*****	*****	*****	*****	-	-	-
24. <i>Methylobacterium fujisawaense</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
25. <i>Methylobacterium suomiense</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
26. <i>Methylobacterium thiocynatum</i>	*****	*****	-	-	-	-	-
27. <i>Streptococcus iniae</i>	*****	*****	*****	*****	-	-	-
28. <i>Yersinia ruckerii</i>	*****	*****	*****	-	-	-	-

* Yıldız işaretleri bakteri üremesini göstermektedir, yarım yıldızlar zayıf üremeyi temsil etmektedir. 5 yıldız sağdan sola 1/16-1/8-1/4-1/2-1/1 (Macfarlant 3) dilüsyonlar da üremeyi göstermektedir.

Bor tolerans değerleri milimolar borik asit, yüzde borik asit veya ppm Bor (sadece B) olarak verilebilmektedir (Çizelge 3.3.). Örneğin, literatürde bitkiler için ppm B kullanılmaktadır. Bazı bakteri yayınlarında yüzde tolerans değerleri olarak sunulmuştur. Bu yüzden mM borik asit değerleri ppm B değerlerine çevrilmiştir. Buna göre; mikroorganizmanın test edilen Bor konsantrasyonlardaki ürediği en son konsantrasyon (ppm) göz önüne alınırsa değerler şu şekildedir: *Micrococcus luteus* NRRL B-4375 (540 ppm), *Escherichia coli* K12 (710 ppm), *Bacillus firmus* CECT 14T (1081 ppm), *Bacillus licheniformis* CECT 491 (710 ppm), *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192T (270 ppm), *Aeromonas hydrophila* (710 ppm), *Cupriavidus oxaliticus* DSM 1105T (540 ppm), *Serratia sp.* (540ppm), *Vibrio anguillarum* (270 ppm), *Xanthobacter agilis* NEU 2015T (270 ppm), *Methylobacterium thiocynatum* DSM

11490T (270 ppm), *Methylobacterium fujisawaense* DSM 5686T (270 ppm), *Methylobacterium suomiense* NCIMB 13778T (270 ppm), *Klebsiella pneumoniae* (1081 ppm), *Micrococcus lysodeikticus* (270ppm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 (540ppm) , *Microbacterium sp.* (NSI4) (540 ppm), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538/P (270 ppm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1081 ppm), *Streptomyces albus* CIP 104432T (1620 ppm), *Candida utilis* CCTM La 991 (540 ppm) *Candida albicans* ATCC 10239 (540 ppm), *Yersinia ruckerii* (540 ppm) *Streptococcus iniae* (710 ppm), *Cupriavidus metallidurans* CH34T (540 ppm), *Lactococcus garviae* (710 ppm) ve *Azospirillum lipoferum* DSM 1061T (540 ppm), *Cupriavidus necator* H20 (270 ppm).

3.1.2. Farklı Bor (borik asit) konsantrasyonlarında test mikroorganizmalarının büyüme eğrilerinin saptanması

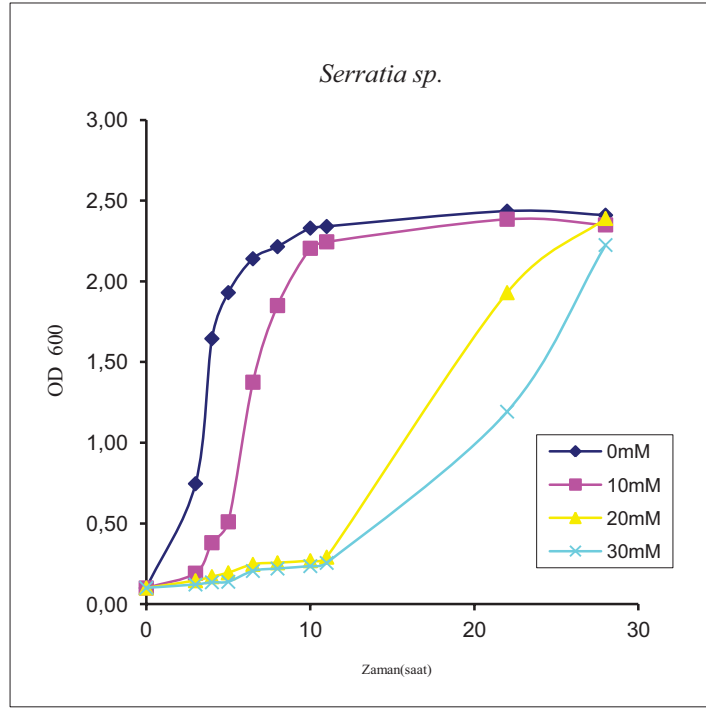
Bu çalışmada artan Bor (borik asit) konsantrasyonuna bağlı olarak bazı bakterilerin büyüme eğrileri saptanmıştır. Burada amaç Bor'un mikroorganizma üremesini ne derecede inhibe (veya aktive) ettiğini belirlemek olmuştur. Çalışılan mikroorganizma türlerinin hepsinde artan Bor'a bağlı olarak, büyümenin yavaşladığı görülmüştür. Ancak bu yavaşlamanın derecesi ve kullanılan Bor konsantrasyonu mikroorganizma türleri arasında değişkenlik göstermiştir. Bu bölümde bununla ilgili elde edilen grafikler sunulmuştur (Şekil 3.10.-3.20.).

Çalışmada değişik besi yerleri kullanılmış olup, bunu nedeni, *Methylobacterium* türleri gibi bazı bakterilerin spesifik besi yerine ihtiyaç duymalarıdır. İsosensitest besiyeri *Bacillus firmus* (CECT 14^T), *Bacillus licheniformis* (CECT 491) mikroorganizmaları için kullanılmıştır. MSM besi yeri ise *Herminiimonas arsenicoxydans* (ULPAs1^T), *Cupriavidus metallidurans* CH34^T, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Methylobacterium thiocynatum* DSM 11490T, *Methylobacterium fujisawaense* DSM 5686T, *Methylobacterium suomiense* NCIMB 13778T için kullanılmıştır. Daha çok tercih edilen TSB besiyeri ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Serratia sp.*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192T, *Micrococcus lysodeikticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Cupriavidus oxaliticus* DSM 1105T, *Xanthobacter agilis* NEU 2015T, *Azospirillum lipoferum* DSM 1061T,

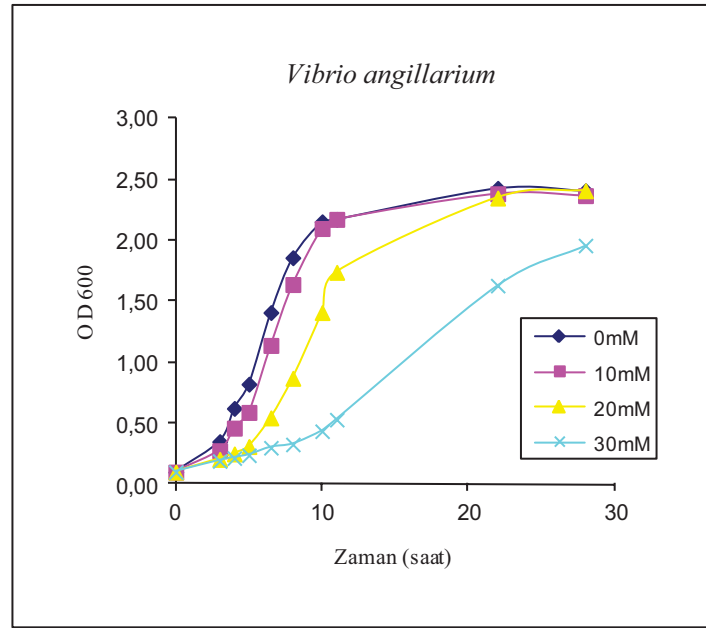
Cupriavidus necator, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538/P, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* K12, *Streptomyces albus* (CIP) bakterileri için kullanılmıştır. Borik asit eklenmesi nedeniyle değişen besi yeri pH'sı 1N NaOH ile bütün denemelerde pH 7.2 civarında sabitlenmiştir. Yani besi yerleri arasındaki tek fark içerdikleri Bor konsantrasyonlarının farklı olmasıdır.Çalışmada, genellikle test edilen mikroorganizma türünün Bor tolerans değeri göz önüne alınmıştır. En son ürettiği borik asit konsantrasyonunda başlamak üzere, geriye doğru toplam 4 farklı bor konsantrasyonu seçilmiştir. Bazı durumlarda daha fazla konsantrasyon seçilmiştir. Çizelge 3.4.'te kullanılan mikroorganizma türleri ve test edilen borik asit konsantrasyonları görülmektedir.Denemelerde kullanılan *Bacillus subtilis*, *Streptomyces albus*, *Bacillus firmus*, *E.coli* K12, *Klebsiella* sp., *Bacillus licheniformis* ve *Cupriavidus metallidurans* 50-75 mM aralığında değişen konsantrasyonlardaki borik asit konsantrasyonlarında gelişim göstermişlerdir. Bu grup mikroorganizmaların logaritmik fazı tamamlamaları için ise 12 saat kadar bir inkübasyon süresi gerekmiştir. Diğer grupta yer alan *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Serratia* sp., *Pseudomonas tolaasii*, *Methylobacterium thiocyanatum* gibi 30 mM gibi daha düşük bir Bor konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Borik asitin büyüme üzerindeki etkisine bağlı olarak bu grup test mikroorganizmalarının logaritmik fazı tamamlamaları için gereken süre 25 saate kadar uzamıştır.

Çizelge 3.4. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma türleri ve borik asit konsantrasyonları

Mikroorganizma türü	Kullanılan Borik Asit (mM)
<i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1061T	0, 10, 20, 30
<i>Bacillus firmus</i>	0, 25, 50, 100, 200
<i>Bacillus licheniformis</i>	0, 25, 50, 100, 200
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0, 20, 40, 60
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	0, 20, 40, 60
<i>Cupriavidus necator</i>	0, 10, 20, 30
<i>Cupriavidus oxaliticus</i> DSM 1105T	0, 10, 20, 30
<i>Escherichia coli</i>	0, 25, 50, 75
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	0, 20, 40, 60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0, 25, 50, 75
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686T	0, 10, 20, 30
<i>Methylobacterium suomiense</i> NCIMB 13778T	0, 10, 20, 30
<i>Methylobacterium thiocynatum</i> DSM 11490T	0, 10, 20, 30
<i>Micrococcus luteus</i>	0, 10, 20, 30
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0, 10, 20, 30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	0, 10, 20, 30
<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB 2192T	0, 10, 20, 30
<i>Serratia sp.</i>	0, 10, 20, 30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	0, 10, 20, 30
<i>Streptomyces albus</i>	0, 25, 50, 75
<i>Vibrio anguillarum</i>	0, 10, 20, 30
<i>Xanthobacter agilis</i> NEU 2015T	0, 10, 20, 30

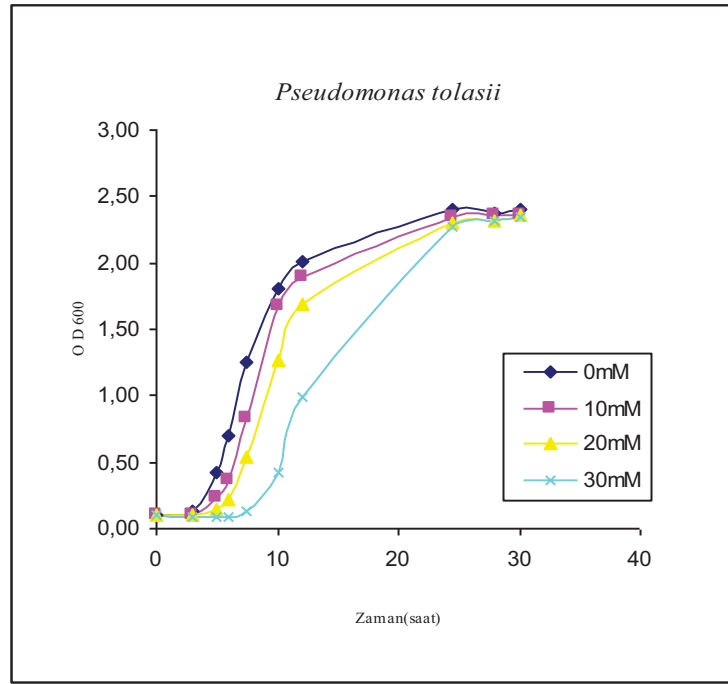


(a)

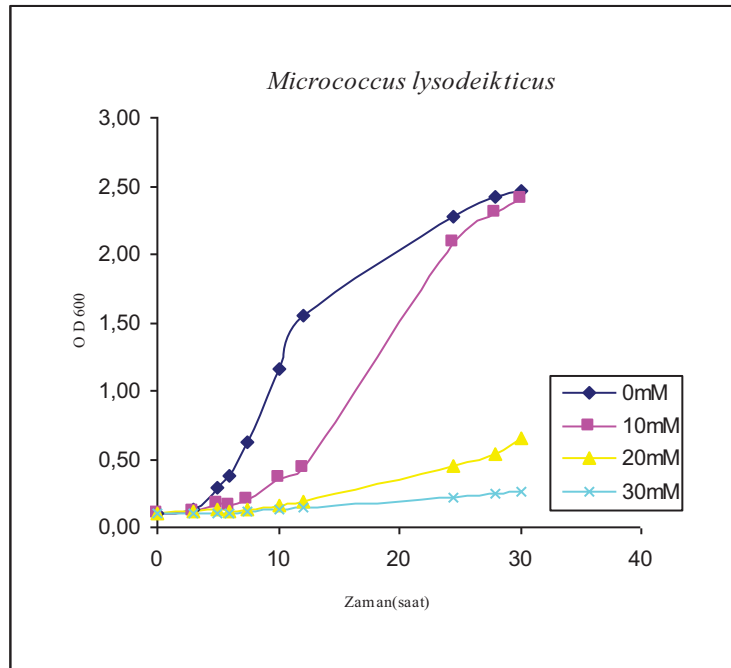


(b)

Şekil 3.10. *Serratia sp.* (a) ve *Vibrio angillarum* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) TSB besiyeri kullanılmıştır.

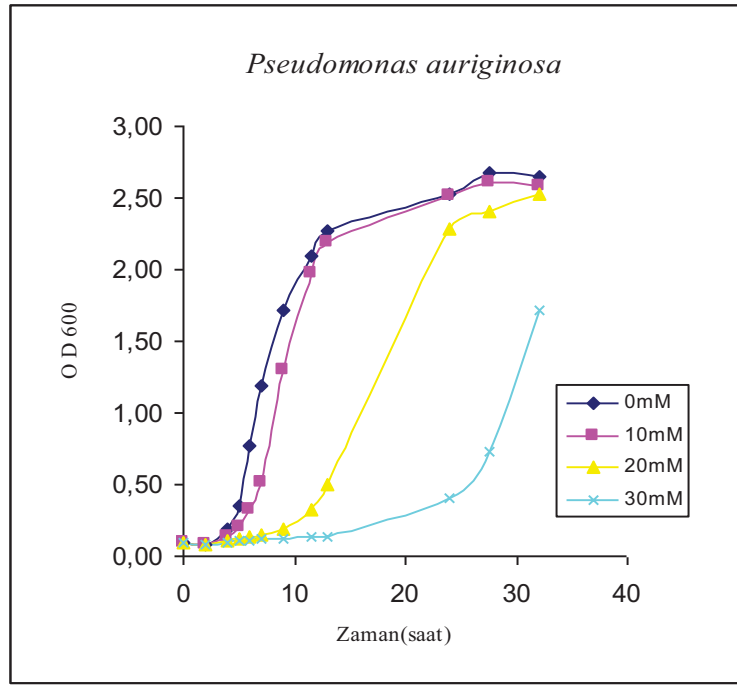


(a)

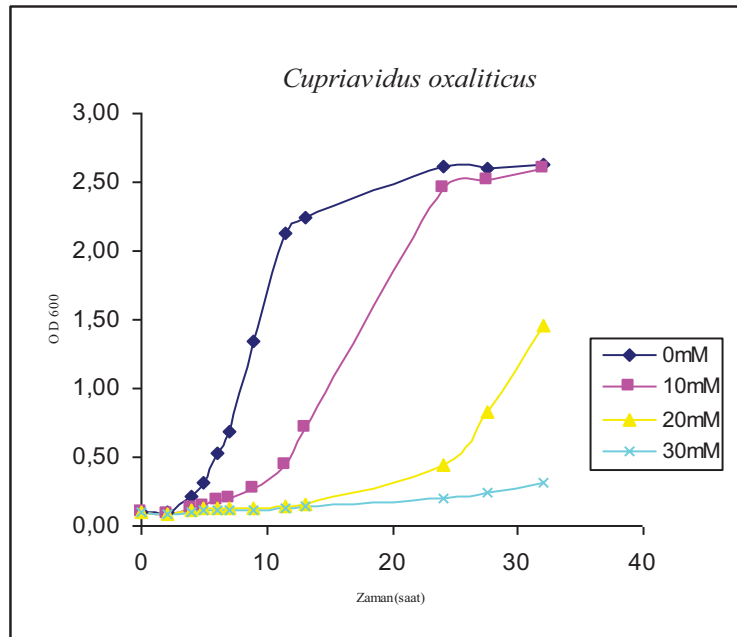


(b)

Şekil 3.11. *Pseudomonas tolasii* (a) ve *Micrococcus lysodeikticus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) TSB besiyeri kullanılmıştır.

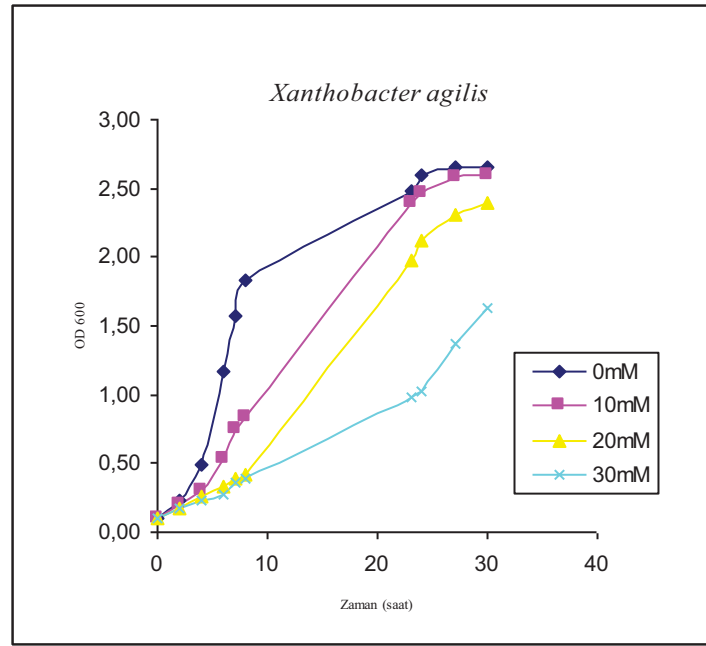


(a)

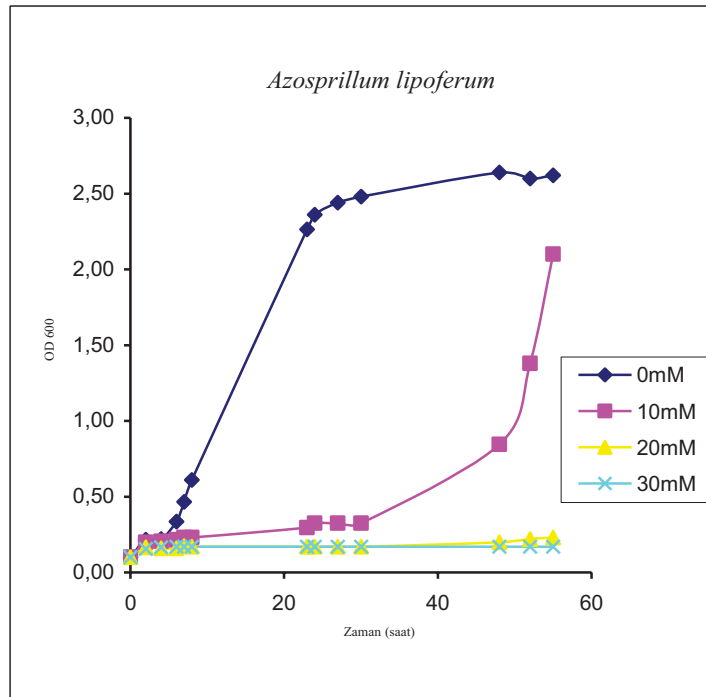


(b)

Şekil 3.12. *Pseudomonas auriginosa* (a) ve *Cupriavidus oxaliticus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) TSB besiyeri kullanılmıştır.

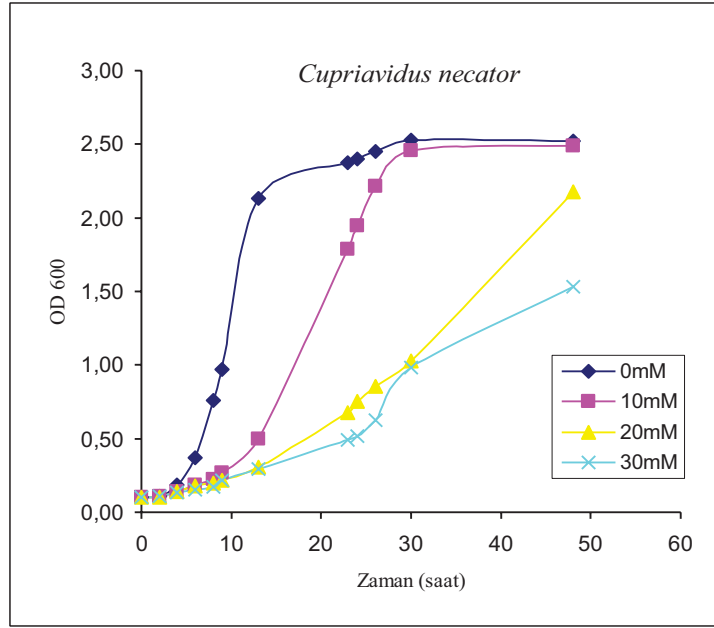


(a)

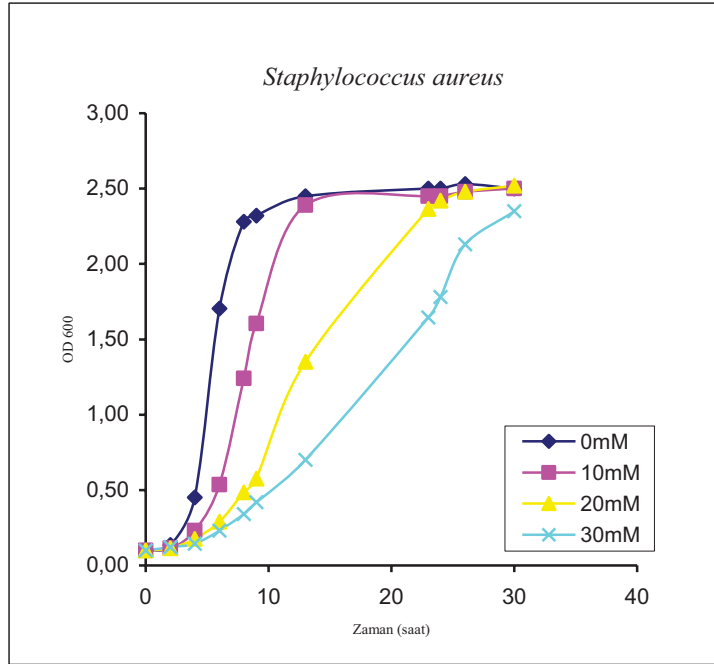


(b)

Şekil 3.13. *Xanthobacter agilis* (a) ve *Azospirillum lipoferum* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) TSB besi yeri kullanılmıştır.

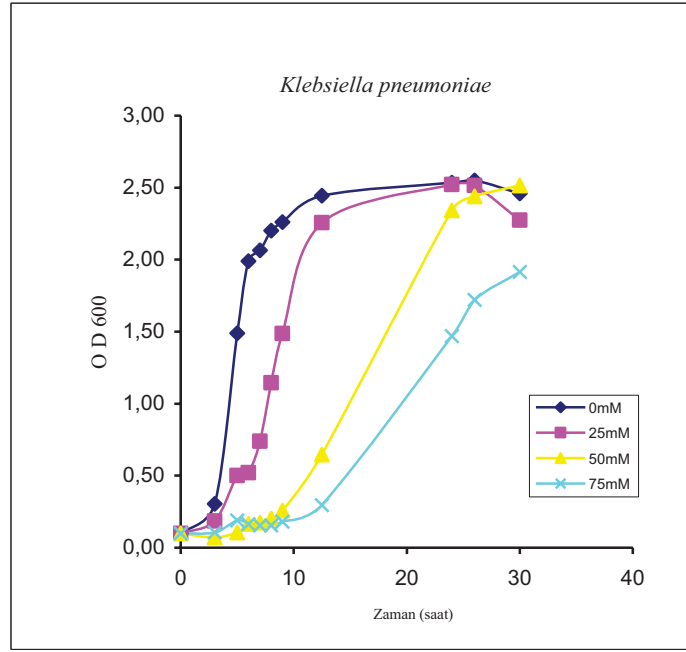


(a)

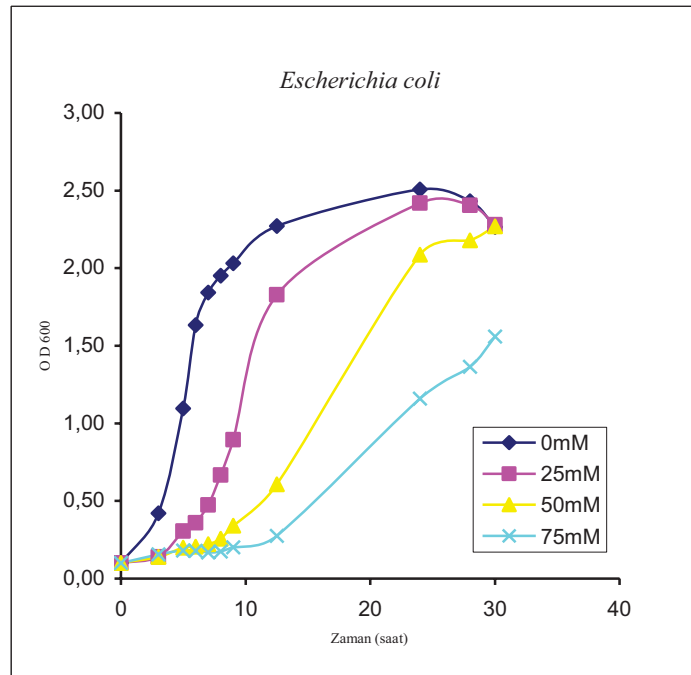


(b)

Şekil 3.14. *Cupriavidus necator* (a) ve *Staphylococcus aureus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) TSB besi yeri kullanılmıştır.

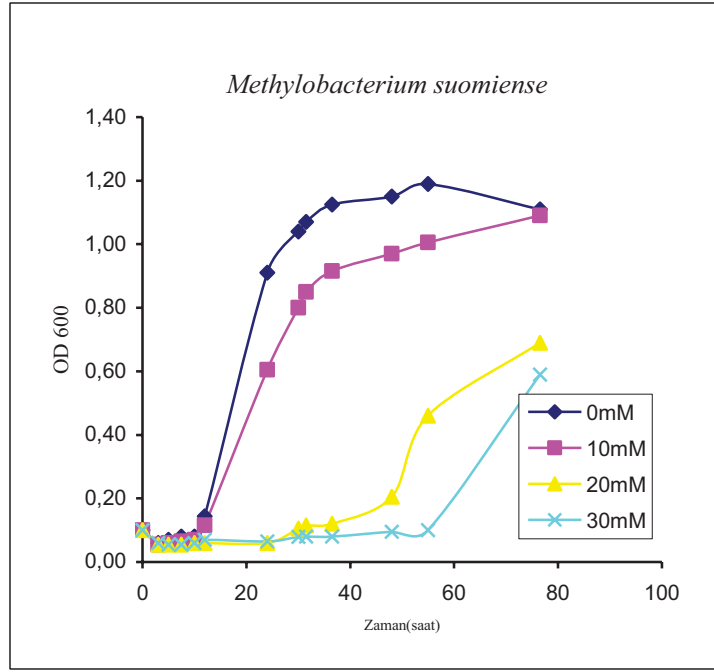


(a)

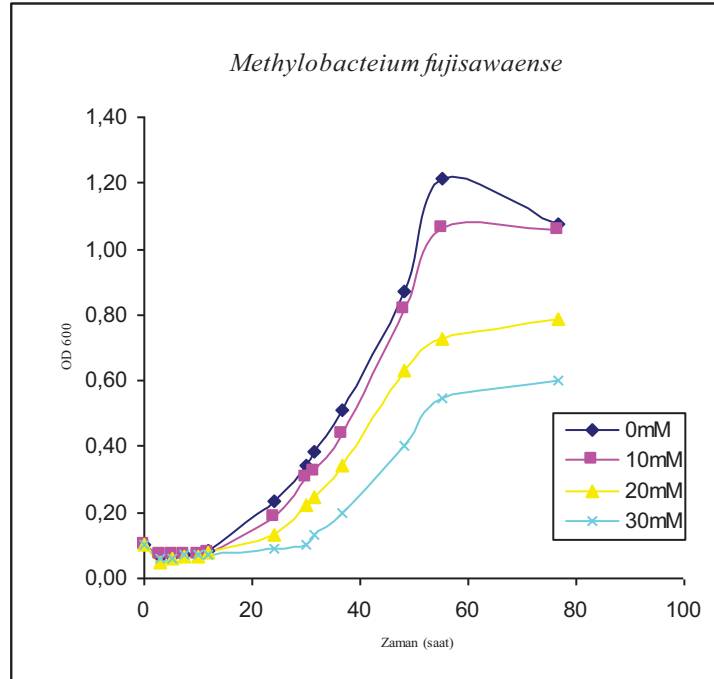


(b)

Şekil 3.15. *Klebsiella pneumoniae* (a) ve *Escherichia coli* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 25, 50 ve 75) TSB besi yeri kullanılmıştır.

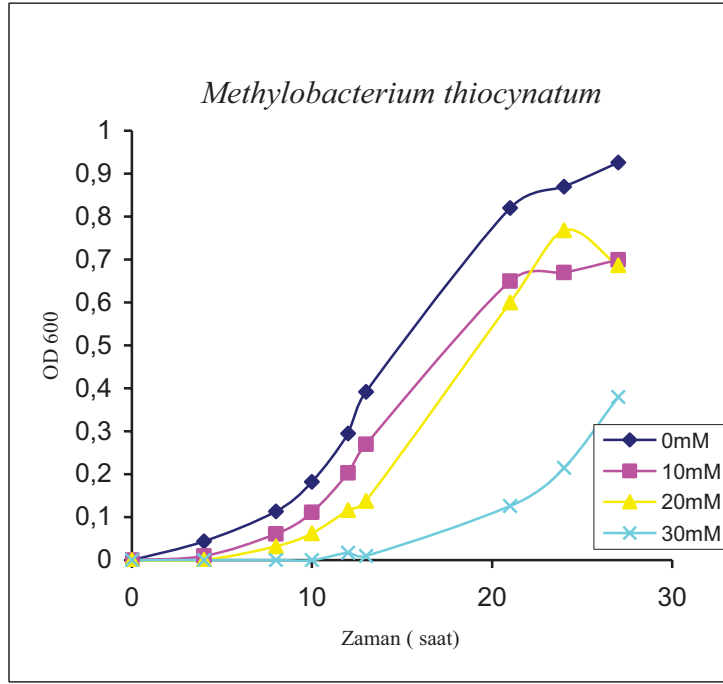


(a)

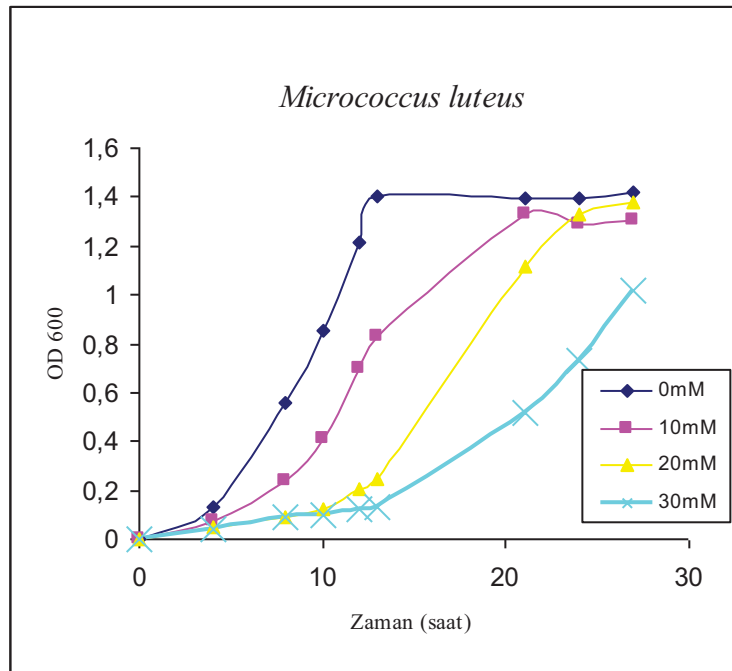


(b)

Şekil 3.16. *Methylobacterium suomiense* (a) ve *Methylobacterium fujisawaense* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) MSM besi yeri kullanılmıştır.

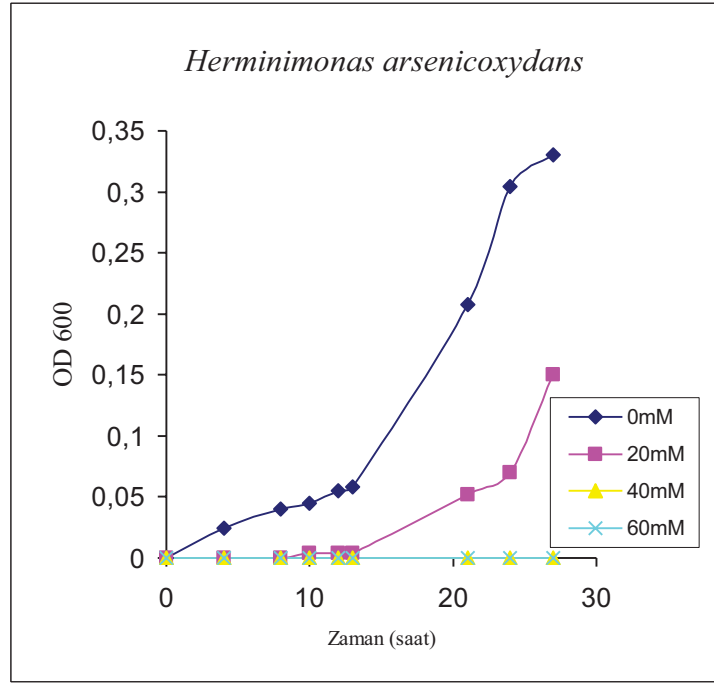


(a)

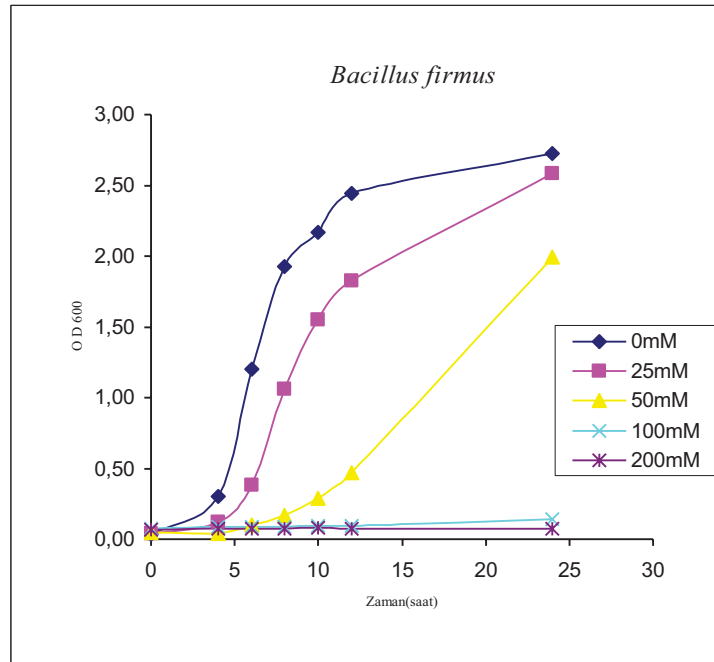


(b)

Şekil 3.17. *Methylobacterium thiocyanatum* (a) ve *Micrococcus luteus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 10, 20 ve 30) MSM besiyeri kullanılmıştır.

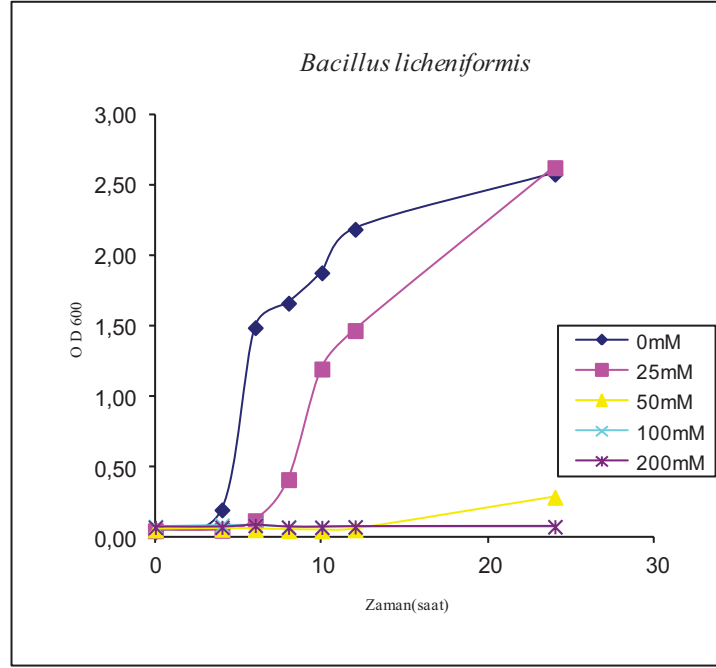


(a)

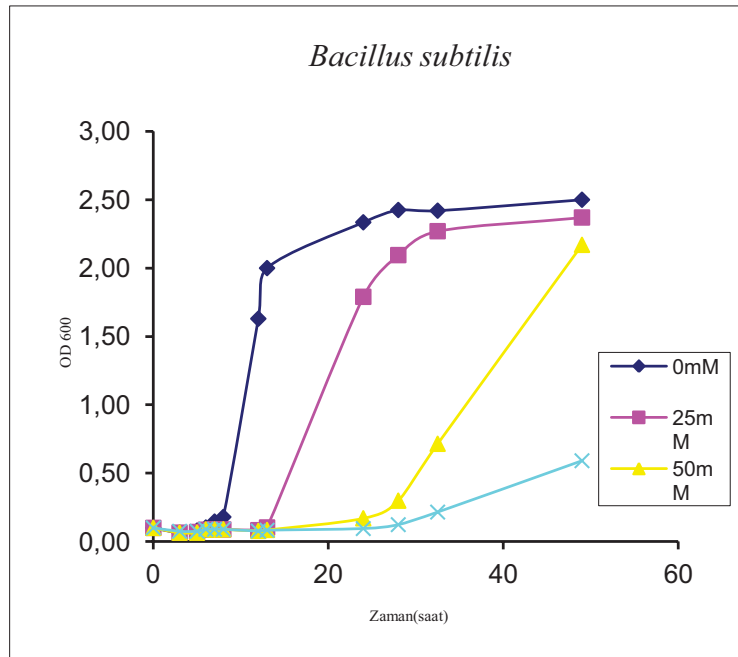


(b)

Şekil 3.18. *Herminimonas arsenicoxydans* (a) ve *Bacillus firmus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 20, 40 ve 60 – 0, 25, 50, 100, 200) MSM ve isosensitest besi yeri kullanılmıştır.

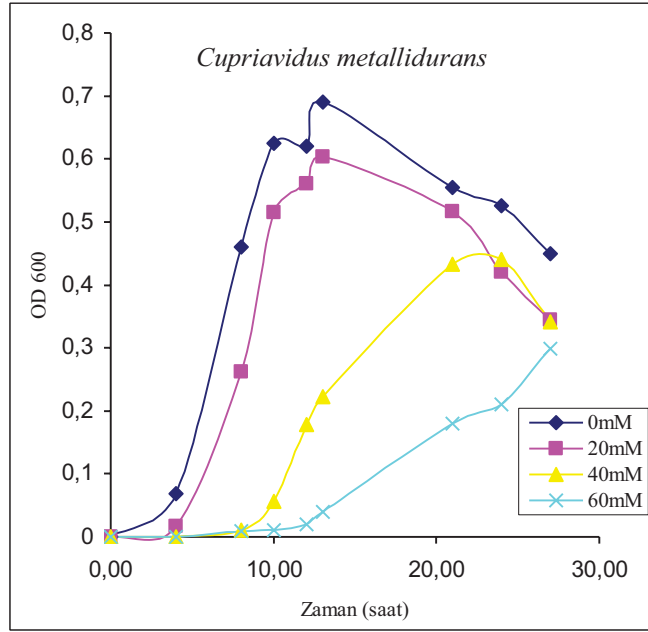


(a)

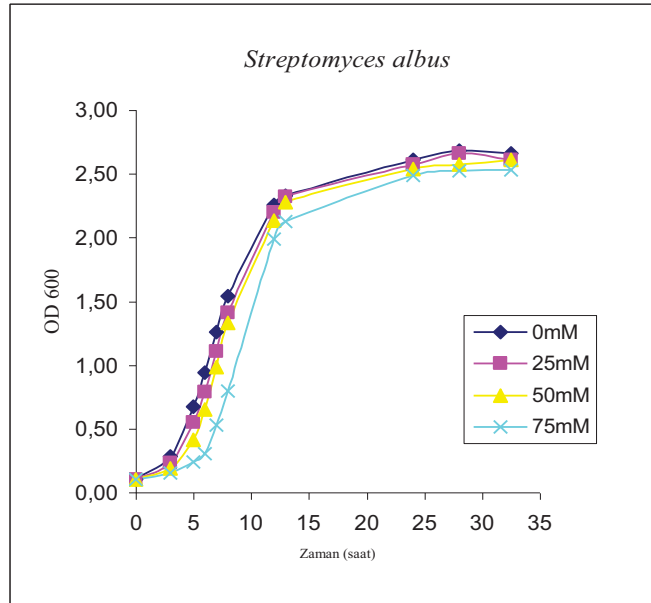


(b)

Şekil 3.19. *Bacillus licheniformis* (a) ve *Bacillus subtilis* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 25, 50, 100, 200 – 0, 25, 50, 75) isosensitest ve TSB besi yeri kullanılmıştır.



(a)



(b)

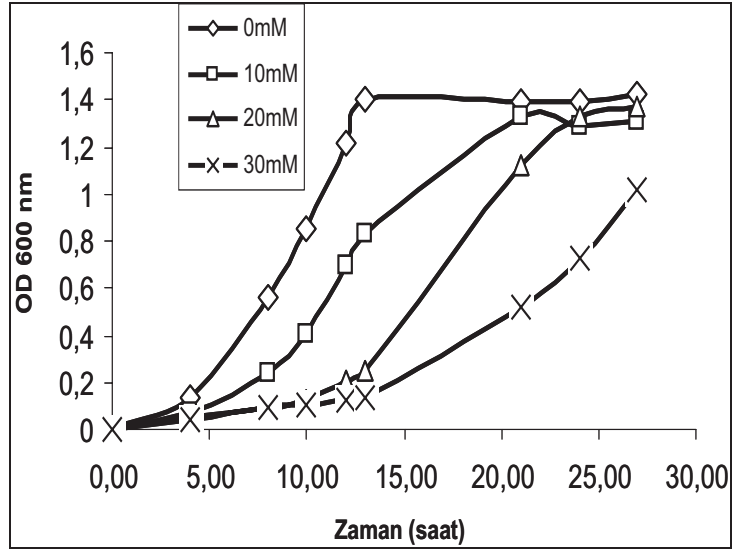
Şekil 3.20. *Cupriavidus metallidurans* (a) ve *Streptomyces albus* (b) suşlarının artan borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 20, 40, 60 ve 0, 25, 50, 75) MSM ve TSB besi yeri kullanılmıştır.

3.1.3. Bor'un bakteri büyümesi üzerine inhibisyon etkisinin matematiksel olarak ifade edilmesi ve karşılaştırılması

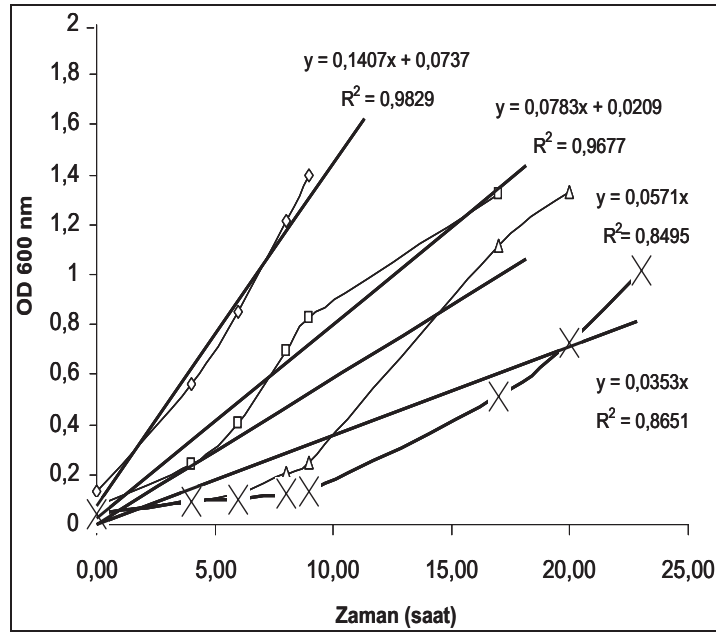
Aşağıda, elde edilen sonuçlar, büyüme grafikleri, bakterinin OD'sinin ikiye katlanması için gereken süre (O D 0,15 ten O D 0,30'a geçen süre; ikiye çoğalma süresi) veya 1/ikiye çoğalma süresi olarak ifade edilerek, artan Bor konsantrasyonun bakteri üremesi üzerindeki inhibisyonunun matematiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. *Micrococcus luteus* bakterisi ile elde edilen deneysel verilerden başlayarak, büyüme eğrilerine ait sonuçlar verilmiştir.

3.1.3.1. *Micrococcus luteus* bakterisinin Bor'a bağlı büyüme hızlarının belirlenmesi

Bu çalışmada, öncelikle bu bakterinin 50 mM üzerinde borik asit içeren MSM besi yeri ortamlarında gelişmediği gösterilmiştir. Büyüme eğrisi çalışmalarında 0, 10, 20 ve 30 mM Borik asit içeren sıvı MSM besi yerlerinde üreme hızları izlenmiştir. Şekil 3.21.'de bu bakterinin büyüme eğrisi gösterilmiştir ve görüldüğü üzere borik asit konsantrasyonu arttıkça bakterinin büyüme hızı azalmaktadır. 20 ve 30 mM'da ayrıca *lag* fazı daha uzun olarak belirlenmiştir. Muhtemelen bakteri Bor'un toksik etkisi nedeni ile hazırlanma safhasını arttırmış ve metabolik iç dengesini ayarlamak üzere bazı biyomolekülleri sentez etmektedir. Bor-bakteri ilişkisini büyüme hızı perspektifinden kantitatif olarak karşılaştırmak amacıyla bu grafikten her bir Bor konsantrasyonundaki, 0,15'ten 0,3 O Daye çoğalmak için gereken süre "ikiye çoğalma süresi" olarak tanımlanmış ve hesaplanmıştır. Buradaki strateji bakterinin *log* fazındaki büyümesinin görüldüğü grafik bölümünde eğimi ($y=ax+b$), öncelikle Microsof Excel programı ile tespit edilmiştir (Şekil 3.22.). Her bir eğriden elde edilen formülle bakterinin iki katına çıkması için gereken süre, iki farklı O D değeri vererek (0,15 ve 0,3 O D) hesaplanmıştır. 1 O D değeri ve 2 x O D değerindeki zamanlar (saat) X1 ve X2 olarak belirtildikten sonra X2-X1 ikiye çoğalma süresini vermektedir (Çizelge 3.5.-3.6.). Borik asitin büyümeyi inhibe etmesini göstermek amacıyla 1/çoğalma süreleri spesifik Borik asit konsantrasyonuna plotlanarak Bor-bakteri büyüme ilişkisi yorumlanmıştır (Şekil 3.23.).



Şekil 3.21. *Micrococcus luteus* bakterisinin Borik asite bağlı büyüme eğrisi



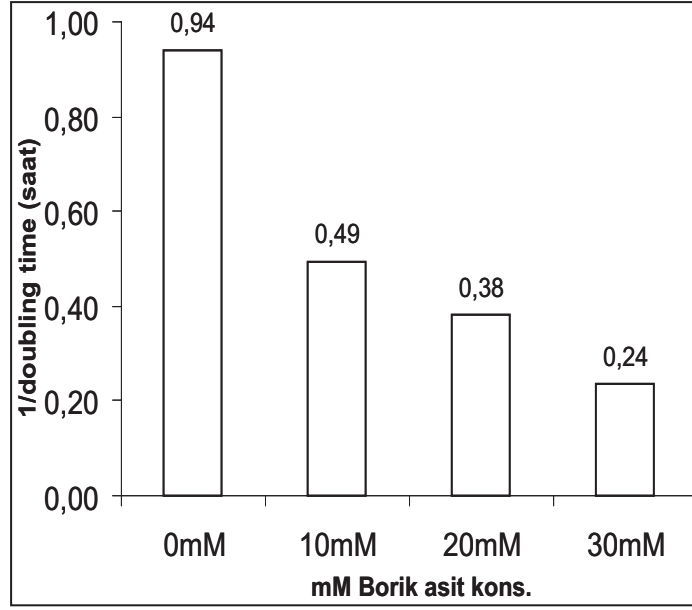
Şekil 3.22. *Micrococcus luteus* bakterisi için logaritmik fazda büyüme formüllerinin tespiti

Çizelge 3.5. İkiye çoğalma sürelerinin hesaplanması

Borik Asit (mM)	X1	X2	X2-X1	Formül
0	0,54	1,61	1,07	$Y=0,1407x+0,0737$
10	1,75	3,78	2,03	$Y=0,0783x+0,0209$
20	2,63	5,25	2,63	$y = 0,0571x$
30	4,25	8,50	4,25	$y = 0,0353x$

Çizelge 3.6. İkiye çoğalma sürelerinin matematiksel ifadesi

Borik Asit (mM)	İkiye Çoğalma süresi (saat)	1/ İkiye Çoğalma süresi (saat)
0	1,07	0,94
10	2,03	0,49
20	2,63	0,38
30	4,25	0,24



Şekil 3.23. *Micrococcus luteus* bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarında büyüme hızlarının gösterilmesi. Bor'un büyüme üzerine inhibisyonunu görsel olarak ifade etmek amacıyla 1/ikiye çoğalma süresi ile zaman grafiklenmiştir.

3.1.3.2. *Esherichia coli*, *Bacillus firmus*, *B. licheniformis*, *Streptomyces albus*, *Herminimonas arsenicoxydans* ve *Cupriavidus metallidurans* türlerinin Bor'a bağlı büyüme hızları

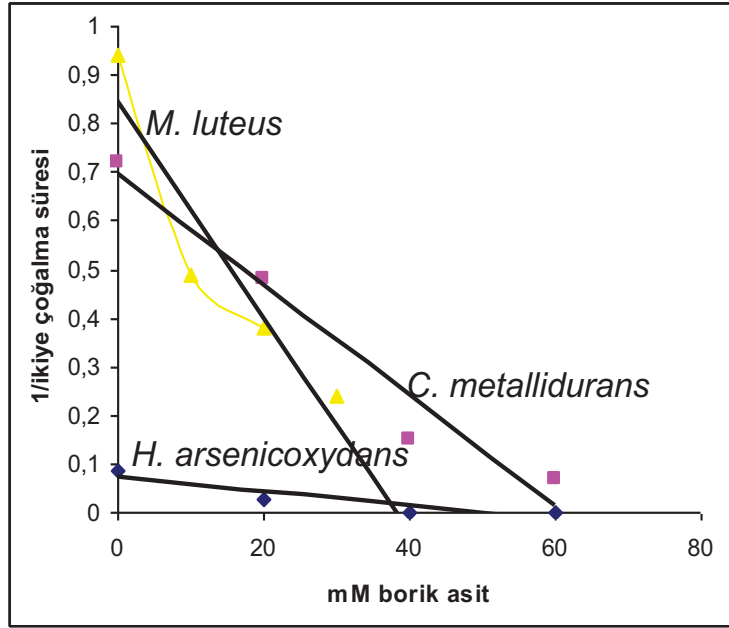
Bundan sonra sonuçları verilecek mikroorganizma türlerinde yukarıda anlatılan aynı strateji izlenerek hesaplamalar yapılmıştır. Borik asit konsantrasyonu arttırıldıkça mikroorganizmanın üremesi azalmıştır. Belli bir konsantrasyon üzerinde ise mikroorganizma yaşamamıştır. Şekil 3.23.'te mikroorganizma türünün farklı borik asit konsantrasyonların da ki, 1/çoğalma süreleri gösterilmiştir. Aşağıda sonucu verilen, çalışılan mikroorganizmalardan hiçbiri 100 mM borik asit içeren besi yerinde üreyememiştir. Daha önceki çalışmalardan elde edilen bulgular bakterilerin büyük çoğunluğunun 100 mM ve üzeri borik asit konsantrasyonun da yaşayamadığını göstermiştir.

M. luteus, *C. metallidurans* ve *H. arsenioxydans* bakterilerinin MSM besi yerinde büyüme hızlarının borik asit arttıkça azalması çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. MSM besiyerinde *H. arsenioxydans*'ın gelişmesi yavaştır. 40 mM borik asit içeren besi yerinde ise gelişme gözlemlenmemiştir.

Arseniğe tolerans gösteren *H. arsenioxydans*'ın Bor'a direncinin çok düşük olması, bakterilerde Bor ve arsenik resistant mekanizmalarının farklı yollarla kazanıldığına işaret edebilir. *C. metallidurans* MSM besiyerinde üremiş olmasına rağmen, 60 mM borik asit içeren besi yerinde gelişmemiştir. Çevrede çok yaygın olarak bulunan *M. luteus* ise Bor olmadan iyi ürerken, 40 mM borik asitli ortamda üreyememiştir (Çizelge 3.7., Şekil 3.24.).

Çizelge 3.7. *Herminiimonas arsenicoxydans* ve *Cupriavidus metallidurans* farklı borik asit konsantrasyonları içeren MSM besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)

Bakteri adı	Kullanılan Borik Asit Kons.(mM)			
	0	20	40	60
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	0,087	0,027	0	0
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	0,72	0,48	0,15	0,07



Şekil 3.24. MSM besiyerinde büyüme hızının Borik asit tarafından düşürülmesi. Test edilen borik asit konsantrasyonları şekil üzerinde görülmektedir. Deneylerde MSM besi yeri kullanılmıştır.

3.1.3.3. Bazı mikroorganizmaların borik asit içeren TSB besi yerlerinde üreme hızlarının değerlendirilmesi

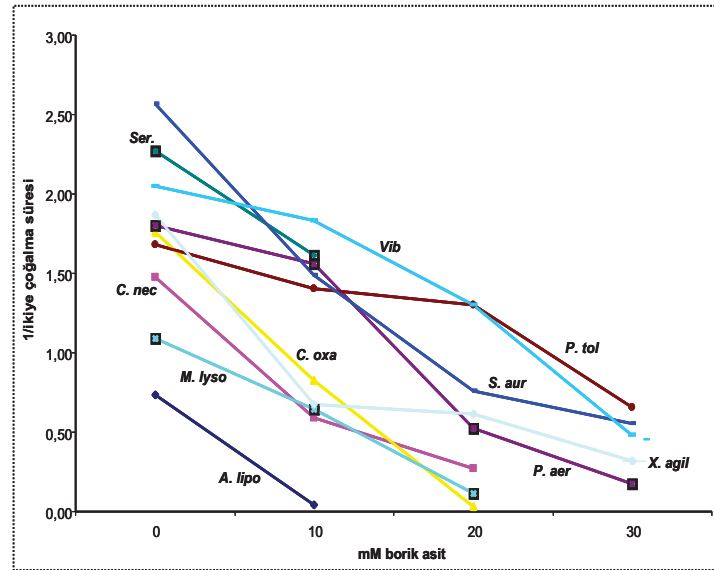
Mikroorganizmaların geliştirilmesi için birçok farklı besi yeri kullanılabilir. Sıklıkla tercih edilen besi yerlerinden bir tanesi TSB'dir. Aşağıda seçilen 14 farklı mikroorganizmanın borik asit içeren TSB besi yerinde üremeleri değerlendirilmiştir (Çizelge 3.8. ve 3.9.) ve bu mikroorganizmaların üreme hızları Şekil 3.25. ve 3.26.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.8.'de farklı mikroorganizma türünün 0, 10, 20 ve 30 mM borik asit içeren besi yerinde 1/ikiye çoğalma süreleri verilmiştir. Hepsinde de borik asit arttıkça bakteri üreme hızının azaldığı görülmüştür. Test edilen mikroorganizmalarda *Azospirillum lipoferum* türünün Bor'a en az direnç gösterdiği görülmektedir. *Pseudomonas tolasii* ve *Vibrio anguillarum* ise bu grup içinde daha fazla direnç gösteren bakterilerdir. Şekil 3.25.'te bu grupta test edilen bakterilerin borik asit tarafından inhibisyon durumları grafik halinde karşılaştırılarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Bazı bakterilerin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 10, 20 ve 30 mM) içeren TSB besi yerlerinde üreme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)

Mikroorganizma adı	Kullanılan Borik Asit Kons.(mM)			
	0	10	20	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,57	1,49	0,76	0,55
<i>Vibrio anguillarum</i>	2,05	1,83	1,30	0,48
<i>Xanthobacter agilis</i>	1,87	0,67	0,62	0,32
<i>Azosprillum lipoferum</i>	0,73	0,04	- ^a	- ^a
<i>Cupriavidus necator</i>	1,48	0,59	0,27	0,18
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1,09	0,64	0,12	0,04
<i>Cupriavidus oxaliticus</i>	1,76	0,83	0,03	0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,80	1,56	0,53	0,18
<i>Pseudomonas tolasii</i>	1,68	1,40	1,30	0,66
<i>Serratia sp.</i>	2,27	1,61	- ^a	- ^a

-^a: mikroorganizmanın bu ortamda büyüme hızı tespit edilmemiştir.

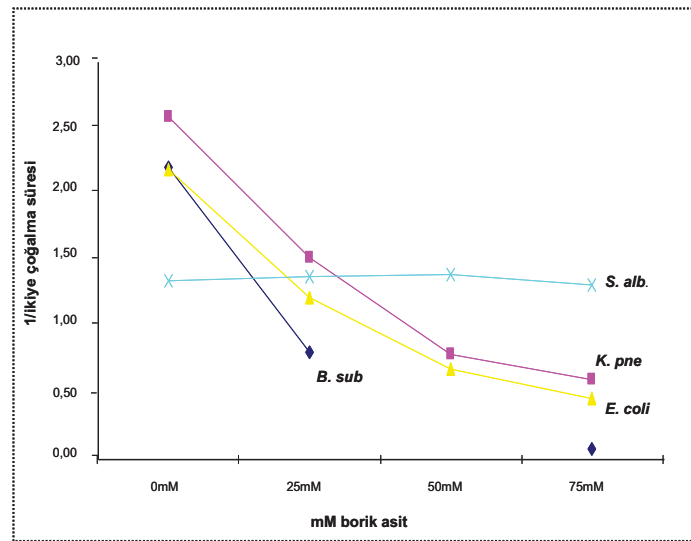


Şekil 3.25. Çeşitli mikroorganizmaların 0, 10, 20 ve 30 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde gelişme hızları. Çizelge 3.8.'den elde edilen değerler (1/ikiye çoğalma süreleri) grafikte gösterilmiştir. Borik asit arttıkça mikroorganizmanın bölünmesi yavaşlamaktadır. *A.lipo*, *Azosprillum lipoferum*; *C. nec*, *Cupriavidus necator*; *C.oxa*, *Cupriavidus oxaliticus*; *M. lyso*, *Micrococcus lysodeikticus*; *P.aer*, *Pseudomonas aeruginosa*; *P.tol*, *Pseudomonas tolasii*; *Ser.*, *Serratia sp.*; *S.aur*, *Staphylococcus aureus*; *Vib*, *Vibrio anguillarum*; ve *X.agil*, *Xanthobacter agilis*.

Çizelge 3.9. Bazı bakterilerin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 25, 50 ve 75 mM) içeren TSB besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)

Mikroorganizma adı	Kullanılan Borik Asit Kons.(mM)			
	0	25	50	75
<i>Bacillus subtilis</i>	2,17	0,77	- ^a	0,05
<i>Streptomyces albus</i>	1,32	1,36	1,37	1,28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,56	1,50	0,76	0,58
<i>Escherichia coli</i>	2,15	1,19	0,65	0,43

-^a: mikroorganizmanın bu ortamda büyüme hızı tespit edilmemiştir.



Şekil 3.26. Çeşitli mikroorganizmaların 0, 25, 50 ve 75 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde gelişme hızları. Çizelge 3.9.'da elde edilen değerler (1/ikiye çoğalma süreleri) grafikte gösterilmiştir.

Üç mikroorganizma için test edilen konsantrasyonlar da, borik asit arttıkça mikroorganizmanın bölünmesi yavaşlamaktadır. *Streptomyces albus*'ta ise kullanılan konsantrasyonlar da çoğalma süresi üzerine etki az olmuştur. *B.sub*, *Bacillus subtilis*; *S. alb*, *Streptomyces albus*; *K.pne*, *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli*, *Escherichia coli*.

Seçilen diğer bir grup mikroorganizma, 0, 25, 50 ve 75 mM borik asit içeren TSB besi yerinde analiz edilmiştir. Büyüme hızları değerlendirildiği zaman *Streptomyces albus*, Bor'a göreceli olarak daha tolerant bir mikroorganizma olarak göze çarpmaktadır (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.26.). Çünkü bu mikroorganizmanın 0 ve 75 mM borik asit içeren besi yerlerindeki üreme hızında değişim yok denecek kadar azdır. Diğer üç bakteri için *Klebsiella pneumoniae*'nin, *E. coli* ve *Bacillus subtilis*'e göre daha fazla direnç gösterdiği görülmektedir.

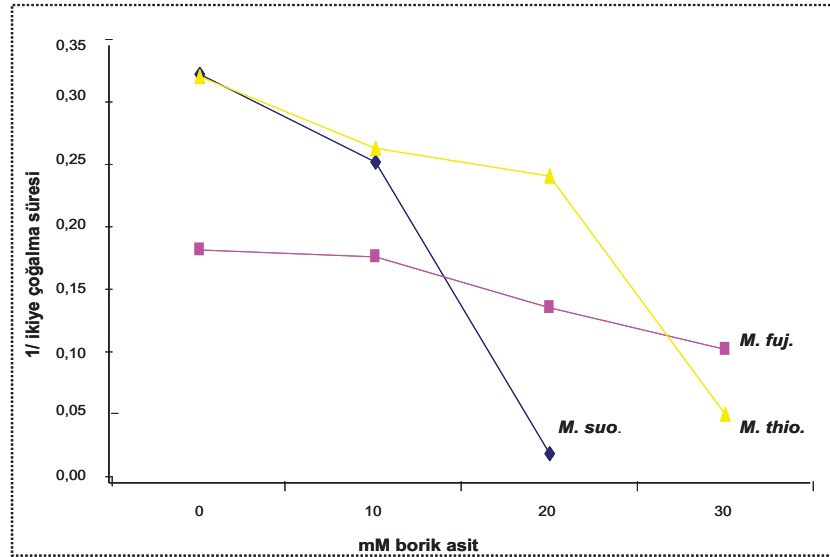
3.1.3.4. Bazı *Methylobacterium* türlerinin borik asit içeren MSM besi yerlerinde üreme hızlarının değerlendirilmesi

Methylobacterium türleri besi yeri olarak TSB'yi tercih etmemektedir. Burada üremeleri yok denecek kadar azdır. Bu yüzden bu bakteriler için MSM besi yeri kullanılmıştır. Bor'lu ortamda üreme hızları çalışılan üç türden, *Methylobacterium suomiense* daha az tolerans göstermiştir. Üç bakteri için değerler ve karşılaştırmalı grafikler Çizelge 3.10. ve Şekil 3.27.'de verilmiştir.

Çizelge 3.10. Bazı *Methylobacterium* türlerinin farklı borik asit konsantrasyonu (0, 10, 20 ve 30 mM) içeren MSM besi yerlerinde büyüme hızları (1/ikiye çoğalma süresi)

Mikroorganizma adı	Kullanılan Borik Asit Kons.(mM)			
	0	10	20	30
<i>Methylobacterium suomiense</i>	0,32	0,25	0,02	- ^a
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	0,18	0,18	0,14	0,10
<i>Methylobacterium thiocynatum</i>	0,32	0,26	0,24	0,05

-^a: mikroorganizmanın bu ortamda büyüme hızı tespit edilmemiştir.

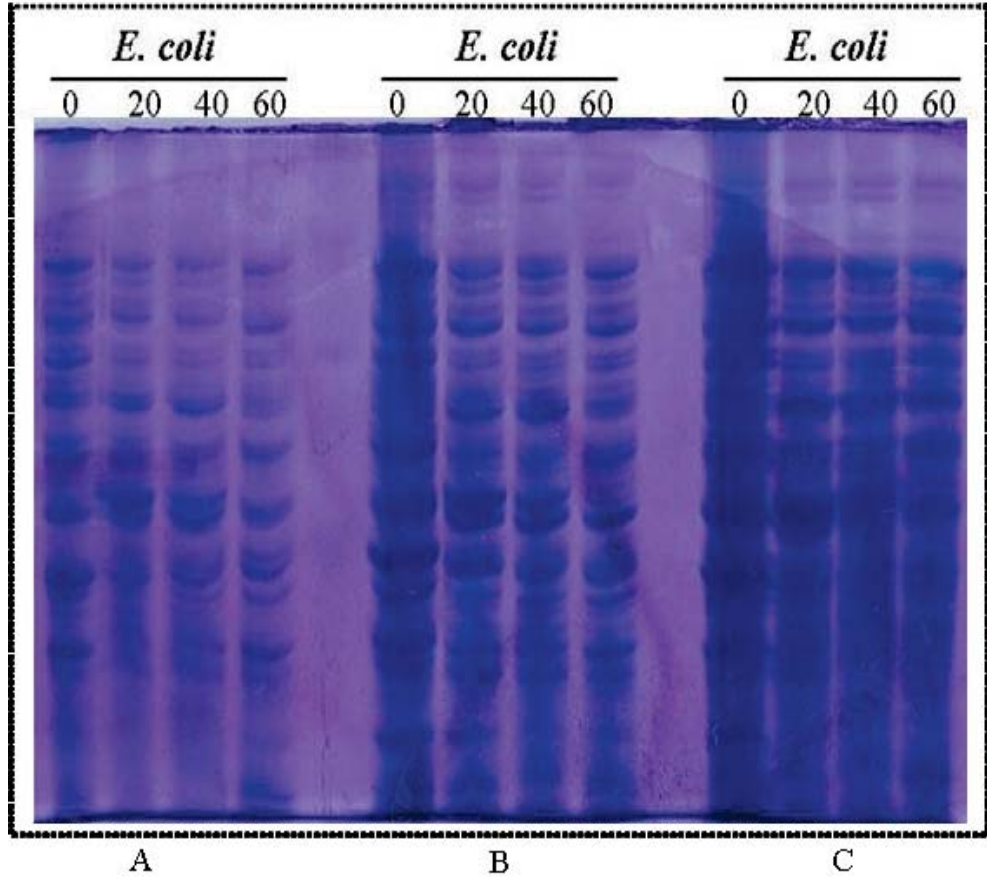


Şekil 3.27. Bazı *Methylobacterium* türlerinde 0, 10, 20 ve 30 mM borik asit içeren MSM besi yerlerinde gelişme hızları. Çizelge 3.10.'dan elde edilen değerler (1/ikiye çoğalma süreleri) grafikte gösterilmiştir. *M.suo.*, *Methylobacterium suomiense*; *M.fuj.*, *Methylobacterium fujisawaense* ve *M.thio.*, *Methylobacterium thiocynatum*.

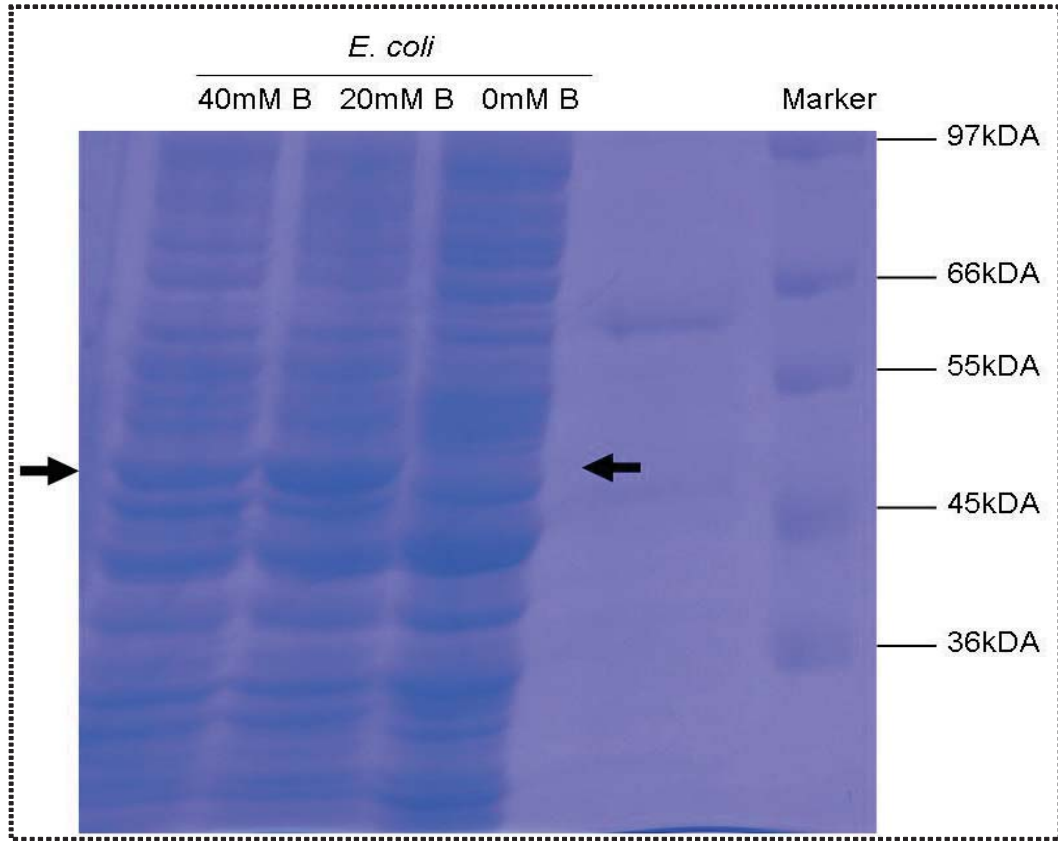
3.1.4. Farklı Bor/Borikasit konsantrasyonlarını içeren besi yeri ortamlarında verilen mikroorganizmaların SDS-PAGE protein profillerinin çıkarılması

Önceki bulgular test edilen mikroorganizmaların Bor tolerans seviyelerinde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu durumda bakteri hücresi Bor elementinin artan dozları ile baş edebilmek için yeni proteinler sentezleyebilir. Bu durum kadmiyum gibi bazı ağır metallere direnç gösterebilen bakterilerde görülmüştür. Ağır metal ortamında yetiştirilen bakteri, bazı proteinleri sentezlerken diğer bazı proteinler degradasyona uğramıştır. Bu tür protein değişiklikleri 1D-SDS-PAGE ile gözlemlenebilmiştir.

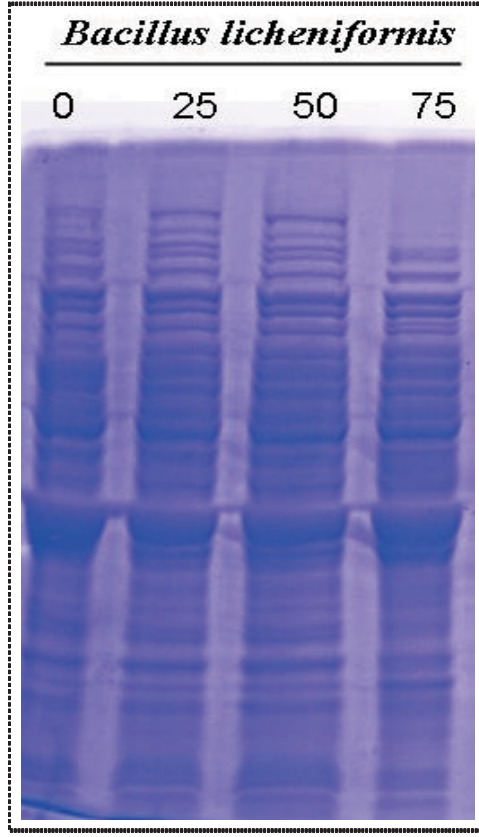
Çalışmanın bu kısmında birçok bakterinin protein ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri belirlenmiştir. Bakteri genellikle 4 farklı Bor konsantrasyonunda (mM) O D 1 civarına kadar yetiştirilmiştir. Bunun olmadığı durumlar metin içinde belirtilmiştir. Çalışmada, *Methylobacterium* ve *Vibrio* türlerinde parçalanmada problemler yaşanmıştır. 18 bakteri türünün farklı Bor konsantrasyonlarında yetiştirilmiş hücrelerinden elde edilen hücreden arındırılmış ekstraktların SDS-PAGE profilleri verilmektedir (Şekil 3.28.–3.36.). Bu bakteriler şunlardır: *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Serratia* sp., *Lactococcus garviae*, *Cupriavidus metallidurans*, *C. necator*, *C. oxalaticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. tolaasii*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptomyces albus*, *Methylobacterium thiocyanatum*, *M. suomiense*, *Vibrio anguillarum*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Xanthobacter agilis* ve *Klebsiella pneumoniae*. Bu bakteri türlerinden *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* türlerinde Bor konsantrasyonu arttığında farklı protein bandı görülmüştür. *Escherichia coli* bakterisi 0, 20 ve 40 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. 20 ve 40 mM borik asit içeren TSB besi yeri ortamında yaklaşık 50 kDA civarında farklı bir protein bandı görülmüştür (Şekil 3.29.).



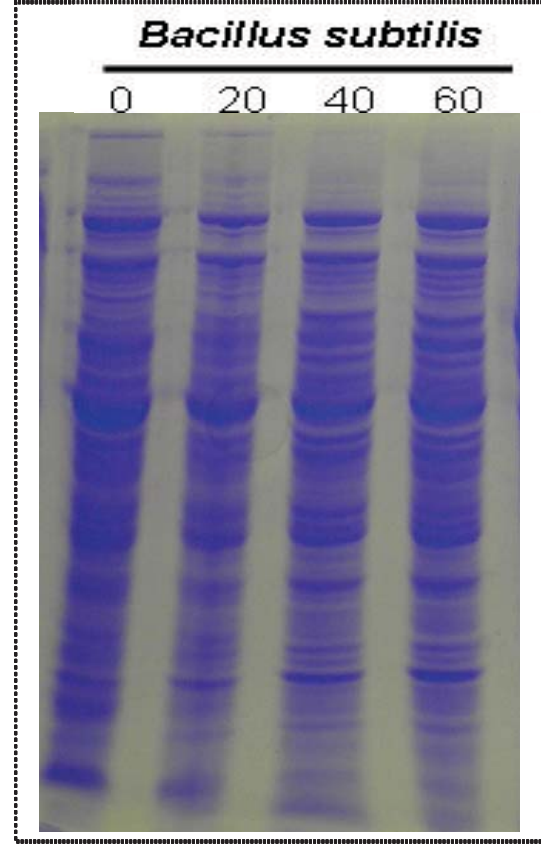
Şekil 3.28. *E. coli* bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarındaki SDS-PAGE profilleri. Üç farklı protein miktarı (A-30, B-50 ve C-80 µg olmak üzere) yüklenerek SDS-PAGE optimizasyonu yapılmıştır. Ekstraktlar materyal metotta belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Bakteri 0, 20, 40 ve 60 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. Bu deneyde sırasıyla elde edilen O D 600 değerleri; 1.29, 2.21, 1.92 ve 1.40'tır. Örnekler Thermo Midi Jel'de, 180 Volt'da koşulmuştur. Komassi (coomassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel %12'dir.



Şekil 3.29. *E. coli* bakterisinin farklı borik asit konsantrasyonlarında ifade edilen bir protein bandının görülmesi. Her kuyucuğa 30 µg total protein yüklenmiştir. Ekstraktlar materyal metotta belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Bakteri 0, 20 ve 40 mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. Bu deneyde sırasıyla elde edilen O D 600 değerleri; 1.29, 2.21 ve 1.92'dir. Örnekler Thermo Mini Jel'de, 180 Volt'da koşulmuştur. Komassi (coamassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel %12'dir. M, protein markırı gösterilmiştir. Ok ile farklı ifade edilen bir protein bandı gösterilmektedir.



(a)

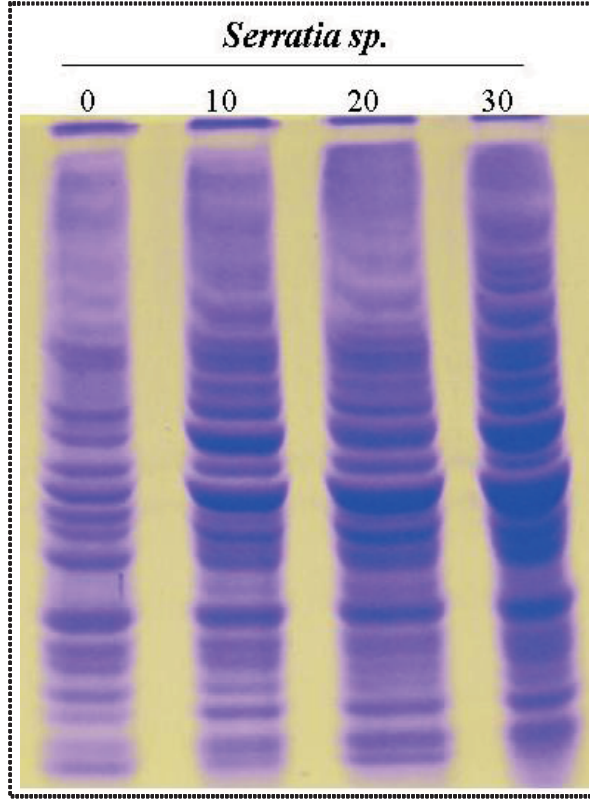


(b)

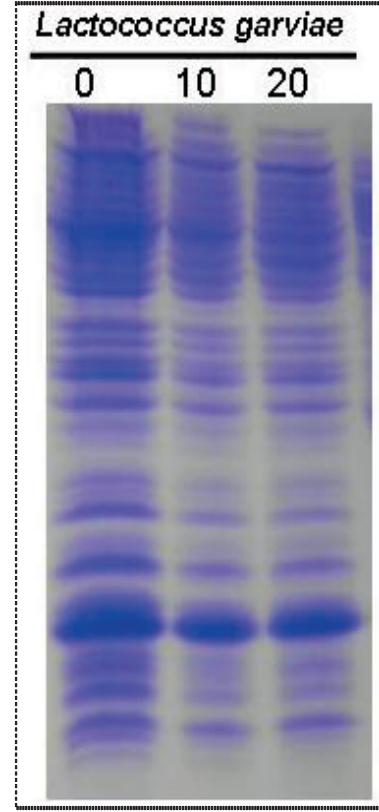
Şekil 3.30. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir.

Bakteriler şekilde gösterilen (0, 25, 50, 75 veya 0, 20, 40, 60) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O. D. 600 değerleri a'daki, *B. subtilis* için 1.6, 1.65, 1.38 ve 0.95; b'deki, *B. licheniformis* için ise 1.68, 1.24, 0.84 ve 1.43'tür. Örnekler BioRad Mini Protean jelde, 180 Volt'da koşulmuştur. Komassi (coamassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir.

Kullanılan ayırıcı jel %12'dir.

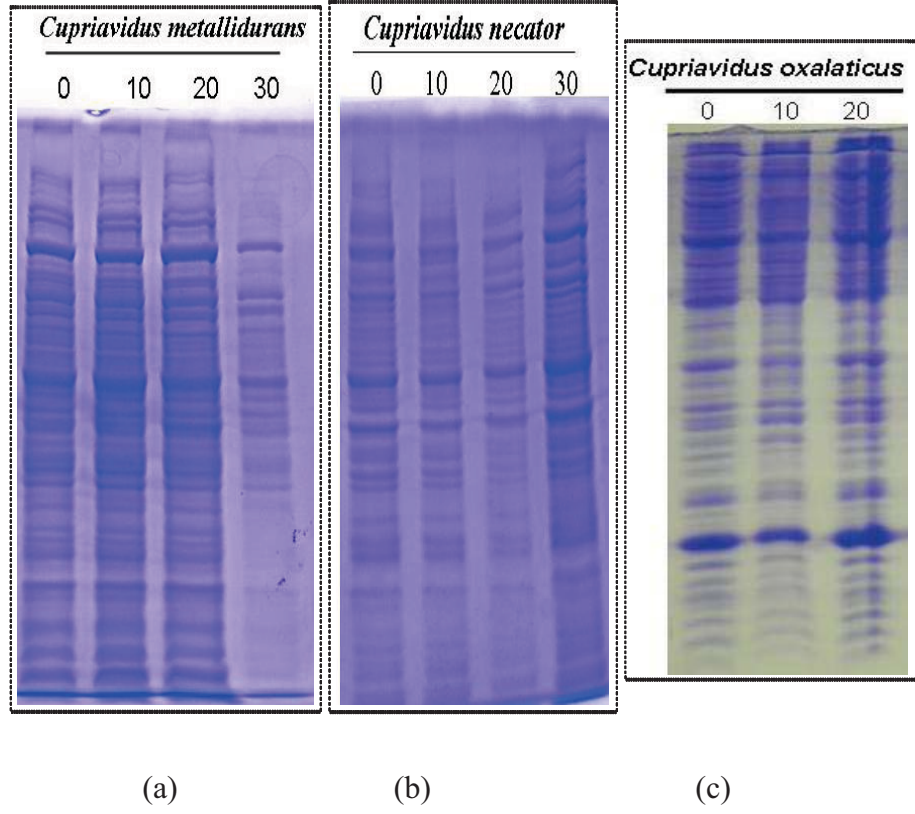


(a)

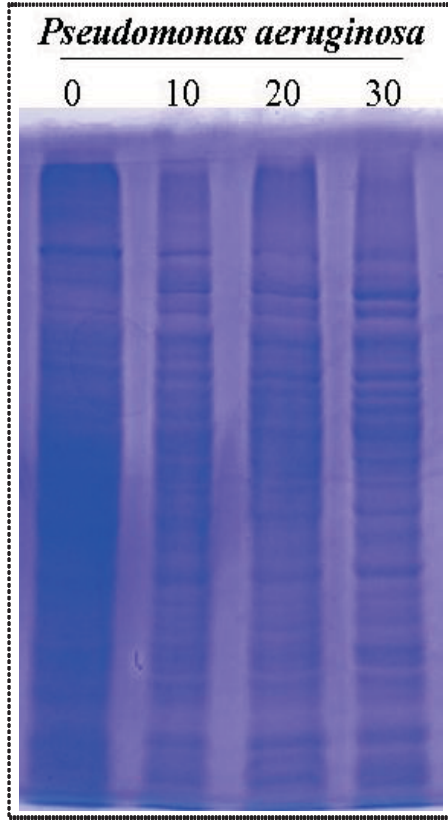


(b)

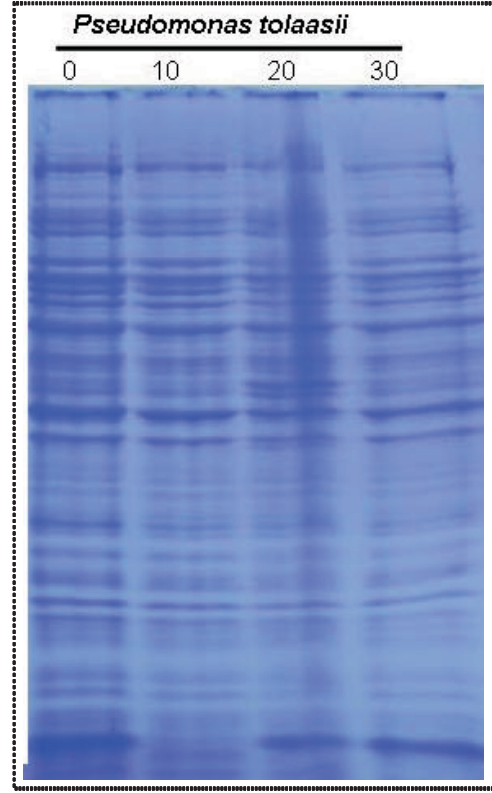
Şekil 3.31. *Serratia* sp. ve *Lactococcus garviae* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20, 30 veya 0, 10, 20) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O. D. 600 değerleri a'daki, *Serratia* sp. için 1.87, 1.52, 2.11 ve 1.45; b'deki, *L. garviae* için ise 1.29, 0.94, ve 1.13'tür. a jeli BioRad Mini Protean jelde, 180 Volt'da, b jeli ise Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coomassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel a jeli için %12, b jeli içinse %16'dır.



Şekil 3.32. *Cupriavidus metallidurans*, *C. necator* ve *C. oxalaticus* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20, 30 veya 0, 10, 20) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *C. metallidurans* için 0.84, 1.1, 0.83 ve 1.85; b'deki, *C. necator* için 0.89, 0.68, 0.95 ve 0.80; c'deki, *C. oxalaticus* için ise 1.14, 2.25 ve 1.00'dir. a ve b jelleri BioRad Mini Protean jelde, 180 Volt'da, c jeli ise Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coomassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel a ve b jelleri için %12, c jeli içinse %16'dır.

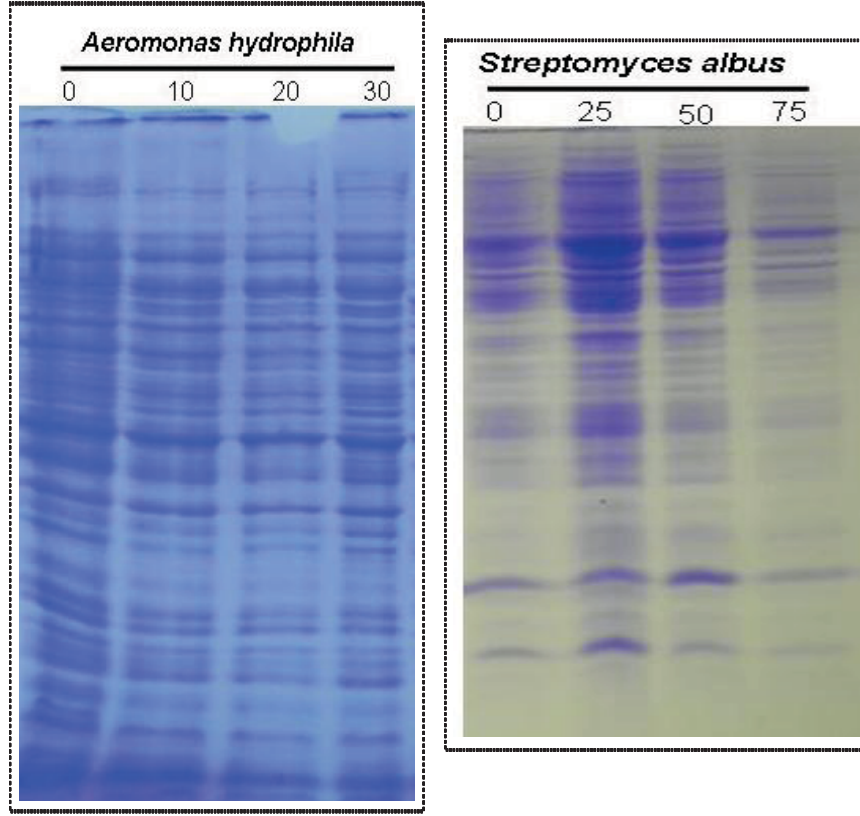


(a)



(b)

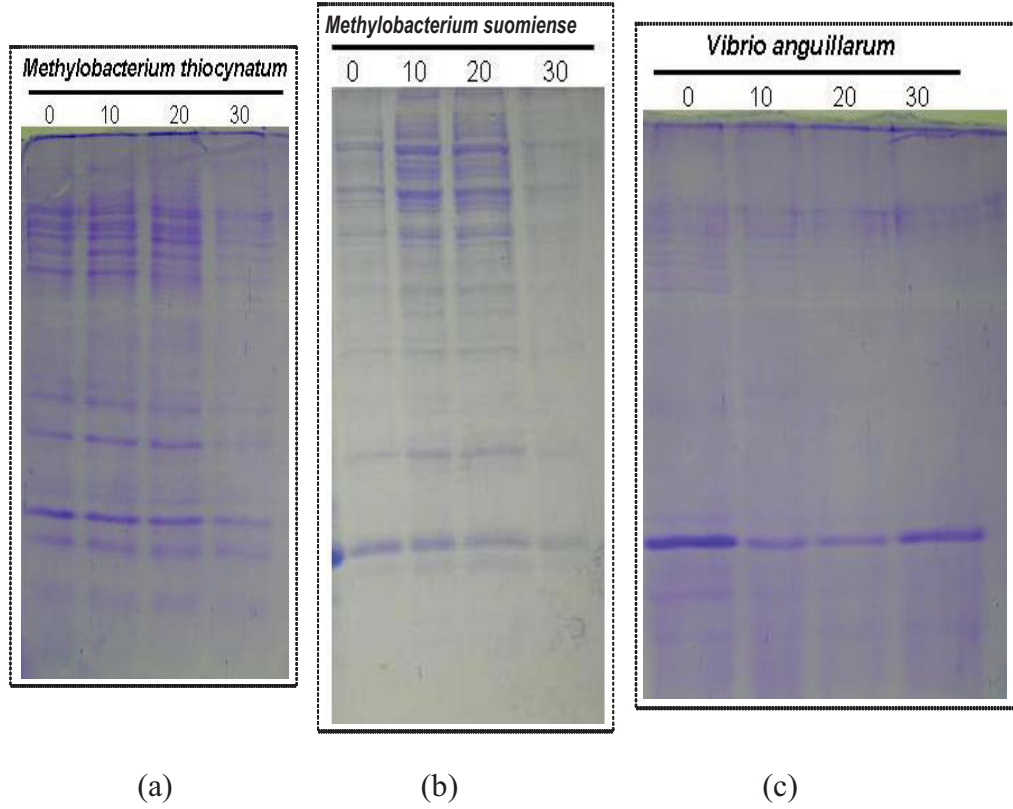
Şekil 3.33. *Pseudomonas aeruginosa* ve *P. tolaasii* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Her kuyucuğa 30 µg total protein yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20, 30) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *P. aeruginosa* için 1.97, 1.88, 0.82 ve 0,9; b'deki *P. tolaasii* için ise 1.16, 1.12, 1,9 ve 1.22'dir. a jeli BioRad Mini Protean jelde, 180 Volt'da, b jeli ise Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coamassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel, a jeli için %12, b jeli içinse %16'dır.



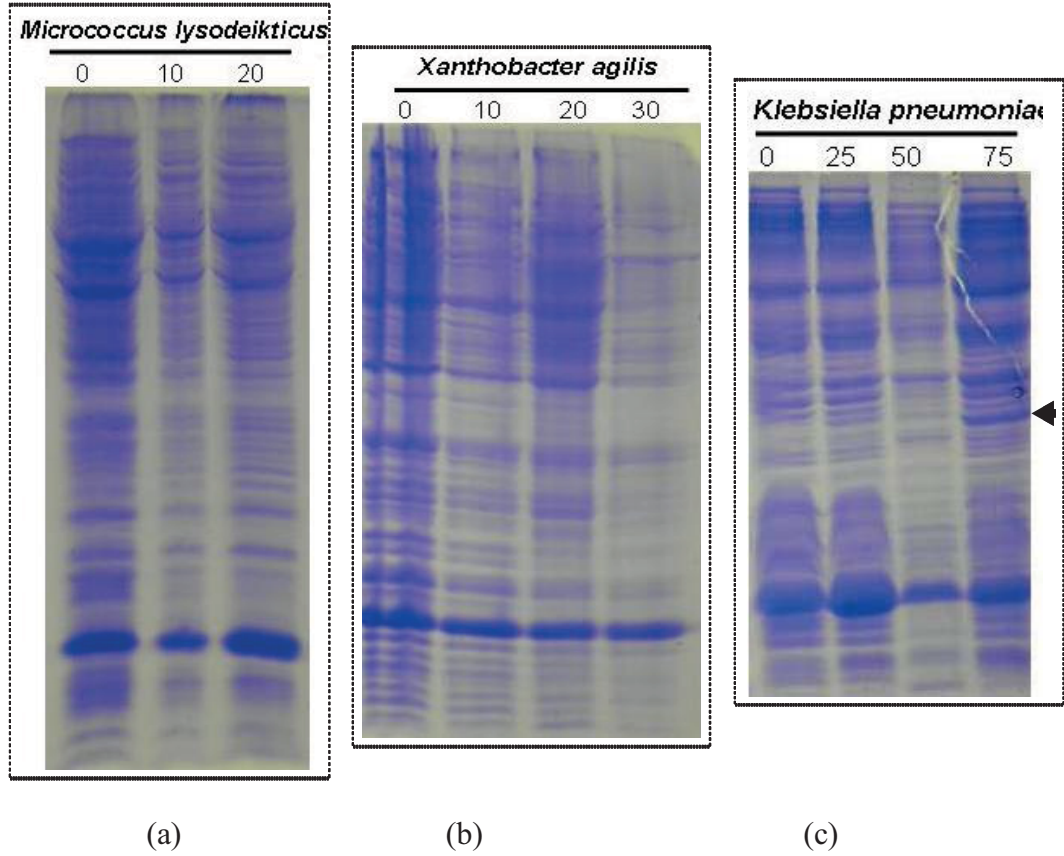
(a)

(b)

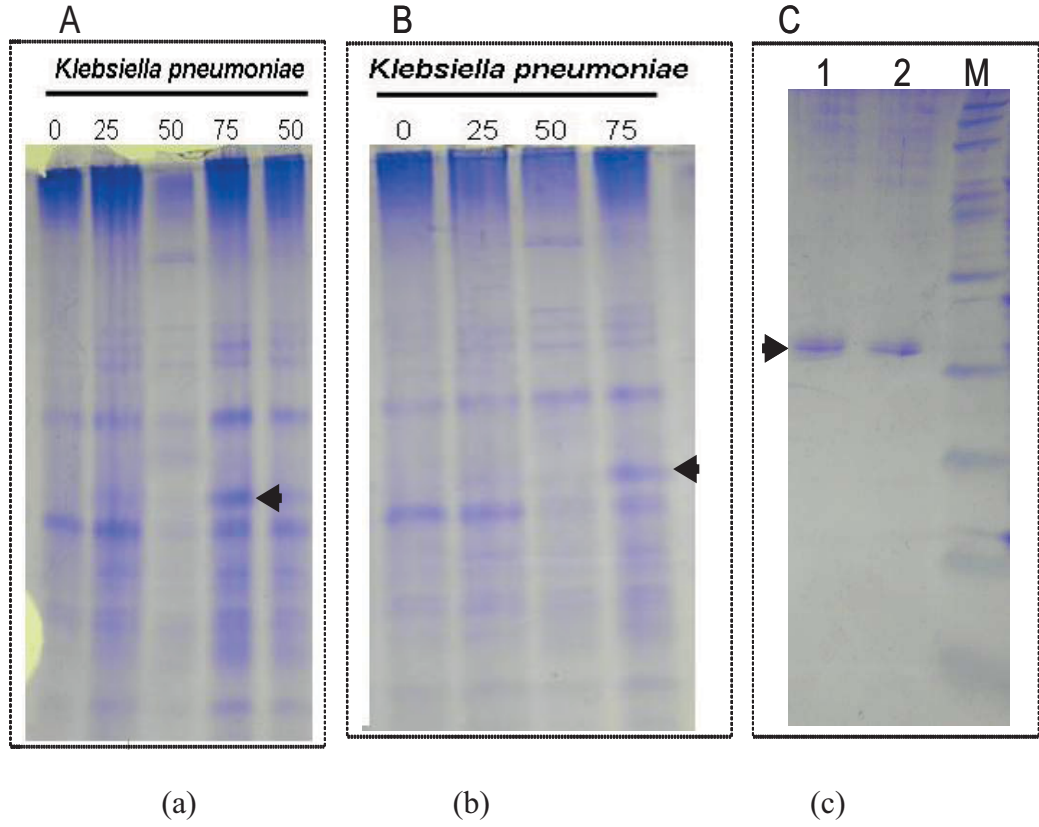
Şekil 3.34. *Aeromonas hydrophila* ve *Streptomyces albus* mikroorganizmalarının farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Soldaki jelde her kuyucuğa 30 µg total protein yüklenmiştir. Ancak b'deki bakteride parçalanma problemi olduğu için, Bradford sonuçları eşit olmamış ve her kuyucuğa 25 µl ekstrakt yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20, 30 veya 0, 25, 50, 75) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *Aeromonas hydrophila* için 1.85, 1.71, 1.51 ve 1.85; c'deki *Streptomyces albus* için ise 1.45, 1.50, 1.56 ve 1.41'dir. Jeller Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coomassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel %16'dır.



Şekil 3.35. *Methylobacterium thiocyanatum*, *M. suomiense* ve *Vibrio anguillarum* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Bu bakterilerin parçalanmasında zorluklar olmuştur. Bradford sonuçları yetersiz olduğu için her kuyucuğa 25 µl ekstrakt yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20, 30) mM borik asit içeren TSB besi yeri (*Vibrio* türü için) veya MSM besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *M. thiocyanatum* için 1.02, 0.94, 0.95 ve 1.17; b'deki *M. suomiense* için 1.12, 0.99, 0.95 ve 1.15; c'deki *Vibrio anguillarum* için ise 1.17, 1.32, 0.99 ve 0.44'tür. Jeller Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coamassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel %16'dır.

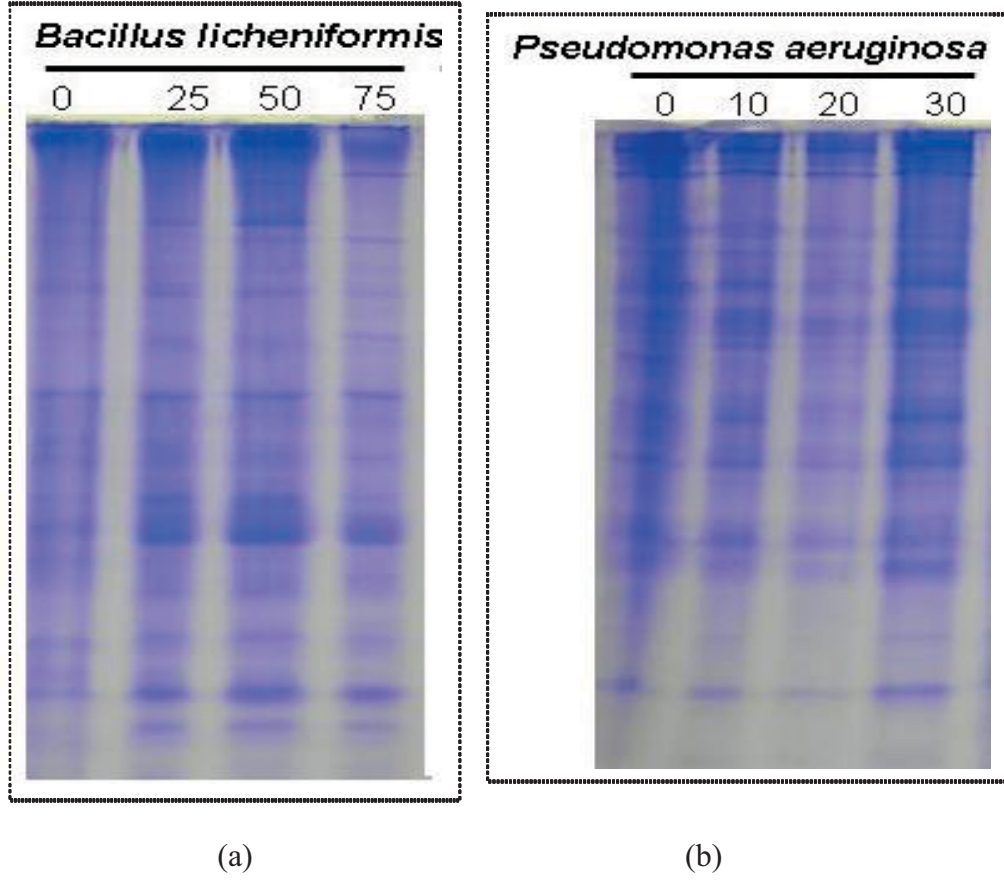


Şekil 3.36. *Micrococcus lysodeikticus*, *Xanthobacter agilis* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE profilleri. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 10, 20-0, 10, 20, 30 veya 0, 25, 50, 75) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *M. lysodeikticus* için 1.38, 0.98 ve 0.82; b'deki, *X. agilis* için 0.82, 0.89, 1.97 ve 1.13; c'deki, *K. pneumoniae* için ise 1.39, 1.02, 2.18 ve 1.43'tür. Jeller Atto (Japonya) mini jelde 150 voltta koşulmuştur. Komassi (coamassie) boyama sonrası dijital kamera ile fotoğraflar çekilmiştir. Kullanılan ayırıcı jel %16'dır. Klebsilla türünde farklı ekspres edilen bir protein bandı ok işareti ile gösterilmiştir.



Şekil 3.37. *Klebsiella pneumoniae*'de farklı ifade edilen bir protein bandının tespit edilmesi.

Soldaki iki jelde her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir. A ve B. Native-PAGE analizi sonuçları. Proteinler 4-8 °C'de 130 voltta Atto (Japonya) jel aparatıyla koşulmuş, daha sonra komasi ile protein bandları boyanmıştır. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 25, 50, 75) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri soldan sağa, 1. jel için, 1.48, 1.13, 2.27, 1.35 ve 1.21; 2. jel için ise 1.42, 1.35, 2.25 ve 1.36'dır. 75 mM'daki farklı ekspres edilen protein bandı bariz bir şekilde görülmekte olup, ok ile gösterilmiştir. C. Native-PAGE analizinde elde edilen protein bandının SDS-PAGE analizi. Soldaki ike jelde görülen protein bandları temiz bir jilet ile kesilmiştir. Jel parçası 1.5 ml'lik bir tüp içinde saf suda 4 °C'de bir gece bekletilmiş ve daha sonra analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır. Daha sonra jel parçası %50'lik methanol ile 15 dakika dehidrasyona uğratılmıştır. Rehidrasyon için 40 µl 2X SDS dye içinde 10 dakika beklenip, 5 dakika kaynatılarak kuyucuğa yüklenmiştir. SDS-PAGE sonucu görülmektedir. Protein markörü olarak Mark12 unstained Standard (Invitrogen) kullanılmıştır. Bir adet 27 kDa civarında major bir band şekilde görülmektedir.

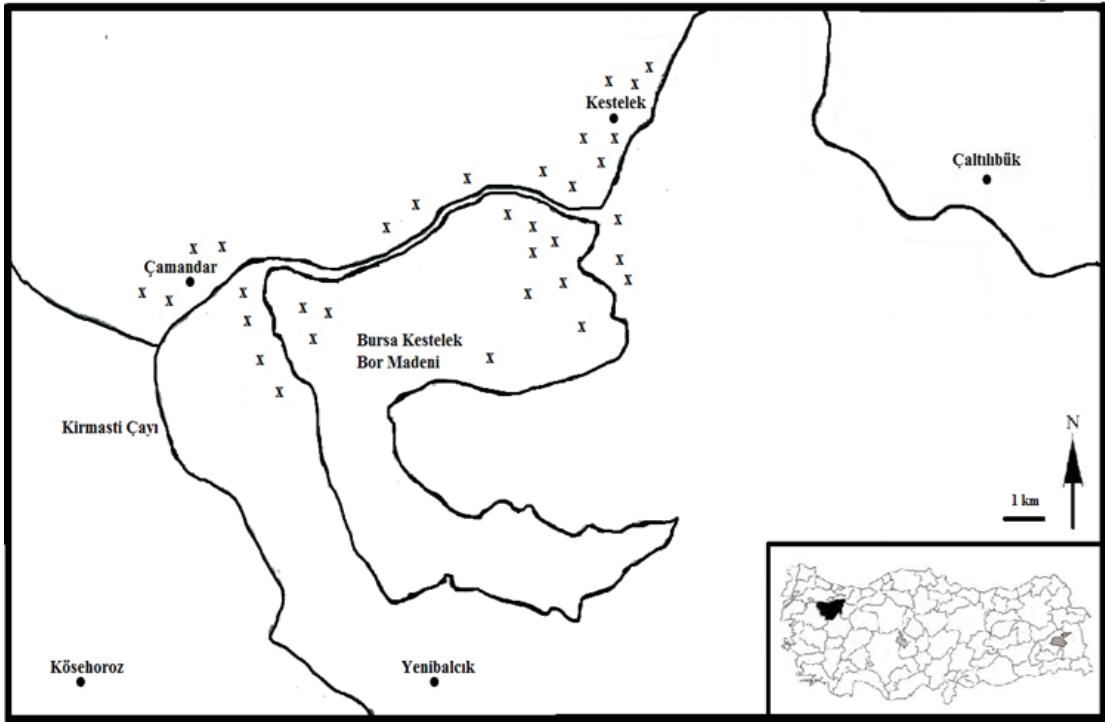


Şekil 3.38. *Bacillus licheniformis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen ekstraktların Native-PAGE analizi. Her kuyucuğa 40 µg total protein yüklenmiştir. Bakteriler şekilde gösterilen (0, 25, 50, 75 veya 0, 10, 20, 30) mM borik asit içeren TSB besi yerlerinde yetiştirilmiştir. O D 600 değerleri a'daki, *B. licheniformis* için 1.68, 1.24, 0.84 ve 1.43; b'deki, *P. aeruginosa*'nın ise 1.97, 1.88, 0.82 ve 0.90'dır. Proteinler 4-8 °C'de 130 voltta Atto (Japonya) jel aparatıyla koşulmuş, daha sonra komasi ile protein bandları boyanmıştır. Kullanılan ayırıcı jel soldaki jel için %12'dir.

3.2. Bursa İlindeki Bor Madeni Ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu

3.2.1. Bursa’da ki Kestelek Bor madeninden örnekleme

Örnekleme aşaması, 107T796’nolu Tübitak projesi döneminde, iki mevsimde (bahar ve güz ayları) yapılmıştır. Bursa iline bağlı Mustafa Kemal ilçesinde yer alan Kestelek köyündeki maden ve çevresinden örnekler alınmıştır (BUK örnekleri). Burada ayrıca madenin yanından küçük bir çay geçmektedir. Çayın aşağısında bulunan Çamandar köyü başta olmak üzere, birçok lokasyondan örnekler alınmıştır (Şekil 3.39.).



Şekil 3.39. Bursa Kestelek Bor madeni ve çevresinden örneklemenin yapıldığı alanlar

3.2.2. İzolatların Bor toleranslarının saptanması

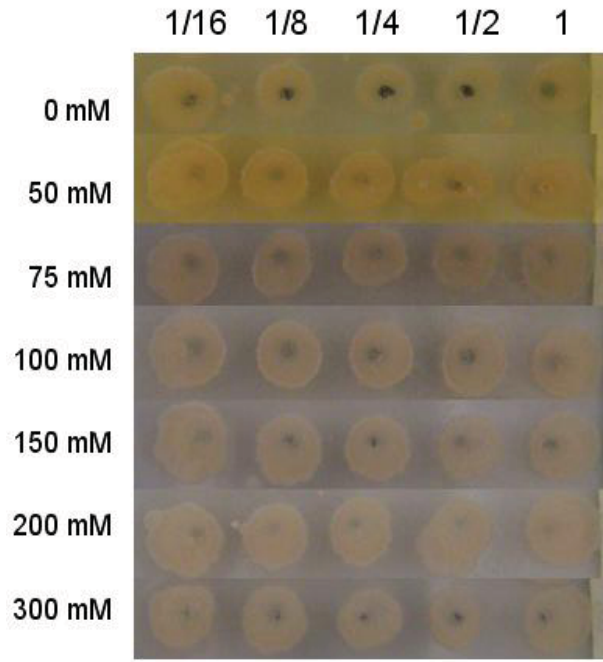
Bor biyolojisi çalışmalarında esas olan uygun model bakterileri bulabilmektir. Bu yüzden çalışmalarımızda öncelikle Bor toleransı yüksek olan bakterilerin tespiti gerekmiştir. Burada kullanılan strateji, izolatların koloni renkleri, görünüşlerinin yanı sıra, Bor toleransı yüksek çıkan izolatların da türlerinin bilinmesi olmuştur. Bunun içinde bazı izolatların Bor toleransı belirlenmiştir.

3.2.2.1 Katı besiyeri üzerinde izolatların Bor toleransını belirleme deneyleri

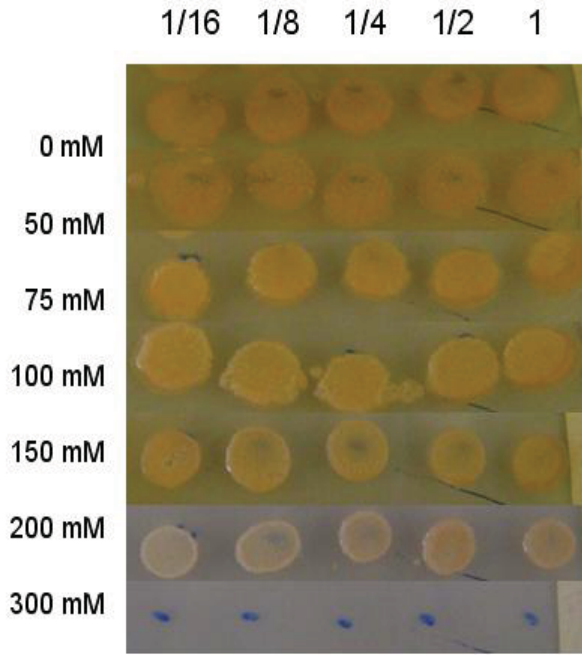
Yüksek düzeyde Bor'a tolerans gösteren bakterilerin seçilmesi için birkaç yaklaşım kullanılmıştır. Ancak denemelerimiz sonucu en güvenilen teknik, katı besi yeri kullanarak yaptığımız deneyler olmuştur. Ayrıca birkaç makalede de benzer teknik kullanıldığı için aşağıda anlatılacak yöntem seçilmiştir.

7 çeşit Borik asit konsantrasyonu (0, 50, 75, 100, 150, 200, ve 300mM) içeren katı besi yerleri üzerine, dilüsyonlara uğratılmış 6-7 µl bakteri süspansiyonunu ekerek, bakteri gelişimlerini 48 saat ve 4-5 gün izleyerek verilere kaydetmektir. Buna, “Bor Tolerans Nokta Testi” ya da “Nokta Ekim Bor Tolerans Testi” adı verilmiştir. Bununla ilgili teknik detaylar Gereç ve Yöntem bölümünde verilmiştir.

Aşağıdaki şekilde (Şekil 3.40.) tolerans deneyinde kullanılan bir petrinin resmi örnek olarak gösterilmiştir. Şekilde, dilüsyonlar ve “Nokta Ekim Bor Tolerans Testi” görülmektedir. BUK izolatlarının Bor toleransı verilmiştir (Çizelge 3.11.).



BuK 63 2Y



BuK 69b

Şekil 3.40. Nokta ekim Bor tolerans testleri sonuçlarından bazı örnekler. Her resmin altında izolat adı verilmiştir. Solda besi yerinin içerdiği borik asit konsantrasyonu milimolar (mM) olarak ve üstte ise bakteri dilüsyonları gösterilmiştir. Üreyen bakteriler somut olarak görülmektedir.

Çizelge 3.11. Bazı izolatların Bor toleransları

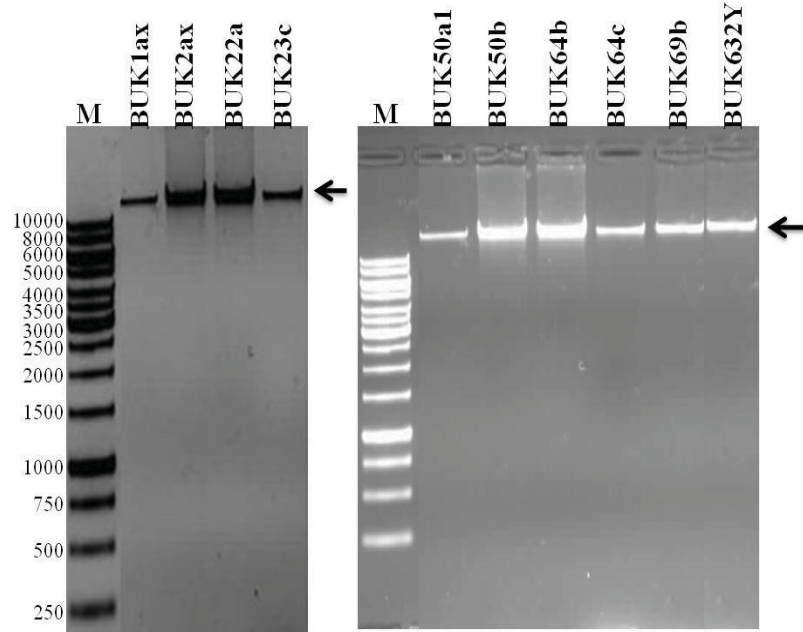
İZOLAT ADI	0 mM	50 mM	75 mM	100 mM	150 mM	200 mM	300 mM
BUK 632Y	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
BUK 50a	*****	*****	*****	*****	*****	*****	-
BUK 69b	*****	*****	*****	*****	*****	*****	-
BUK 64c	*****	*****	*****	*****	*****	**^---	-
BUK 64b	*****	*****	*****	*****	*****	-	-
BUK 23c	*****	*****	*****	*****	*****	-	-
BUK 2ax	*****	*****	*****	*****	***^	-	-
BUK 50b	*****	*****	*****	*****	^^^	^^^---	-
BUK 1ax	*****	*****	*****	*****	^^^---	-	-
BUK 17a	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 21c	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 24a	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 24b	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 25c	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 26a	*****	*****	*****	*****	-	-	-
BUK 18a	*****	*****	*****	-	-	-	-
BUK 88a	*****	*****	*****	-	-	-	-
BUK 22b	*****	*****	***^	^^^---	-	-	-
BUK 22a	*****	*****	***^	^^^---	^^^---	^^^---	^^^---

*Yıldız işaretleri bakteri üremesini göstermektedir, yarım yıldızlar zayıf üremeyi temsil etmektedir. 5 yıldız sağdan sola 1/16-1/8-1/4-1/2-1/1 (McFarlant 3) dilüsyonlarda üremeyi göstermektedir.

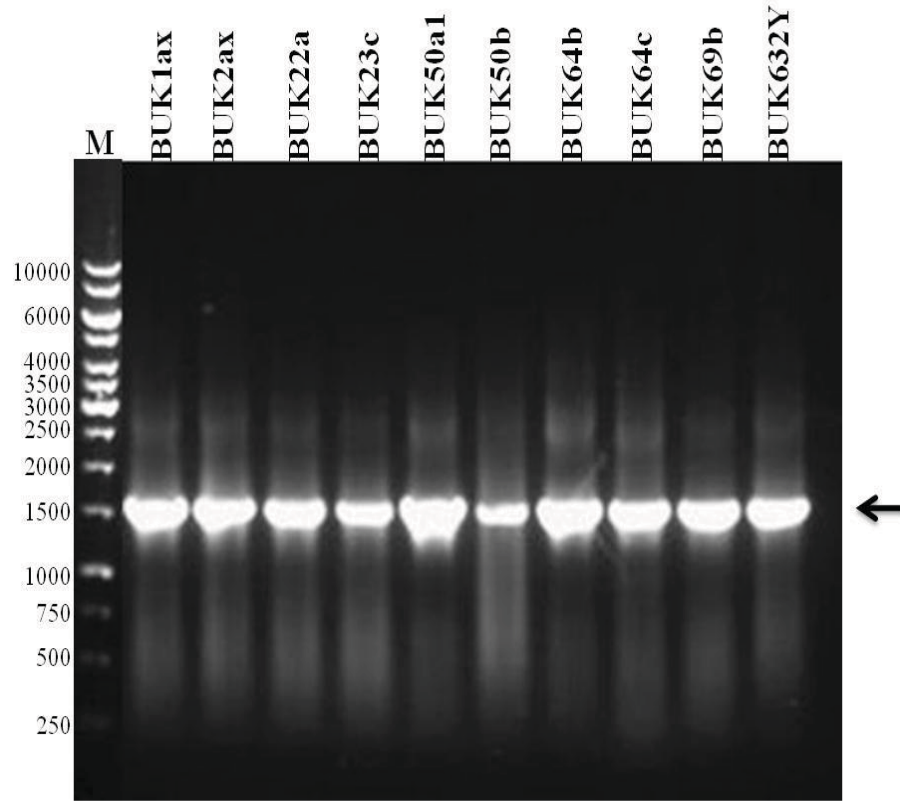
3.2.3. Bor toleransı yüksek çıkan izolatların moleküler karakterizasyonu

3.2.3.1 İzolatlardan DNA izolasyonu ve PCR sonuçları

Çalışmada Bor toleransı yüksek bulunan 10 izolatın gDNA'sı izole edilmiştir. İzole edilen gDNA'ların intact ve yaklaşık 50 ng miktarda olduğu bulunmuştur. Spektrofotometrede analizleri protein veya RNA kontaminasyonu olmadığını göstermiştir (Şekil 3.41.). Çalışmada 16SrRNA gDNA kalıplarından PCR ile çoğaltılmış agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin beklenen boyutlarda (1500 bp) olduğu ve nonspesifik ürünlerin meydana gelmediği görülmüştür. (Şekil 3.42.). Jellerden kesilerek saflaştırılan PCR ürünlerinin “hizmet alımı” ile sekansı belirlenmiştir (Macrogen, Hollanda).



Şekil 3.41. 16SrDNA sekans analizi yapılan izolatlardan DNA izolasyon sonuçları. DNA izolasyonu fenol-kloroform metodu ile yapılmıştır. DNA örneklerinden 3µl yüklenerek agaroz jel elektroforezi yapılmış ve UV ile görüntülenmiştir. Sağdaki şekil U. V. resminin negatif imajıdır. M kullanılan marker olup, DNA büyüklükleri şekilde gösterilmiştir. Elde edilen DNA saf ve kaliteli olup, ok ile işaret edilmiştir.



Şekil 3.42. BUK izolatlarının PCR sonuçları. 16SrRNA geninin amplifikasyonu ürünleri %0.8 agaroz jele 8 µl yüklenmiştir. Daha sonra PCR tekrarlanarak her izolat için toplam 4 reaksiyondan elde edilen ürünler jelden kesilerek bir kit ile saflaştırılmış ve sekansa hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.2. 16SrRNA gen sekans sonuçlarının biyoinformatik analizi

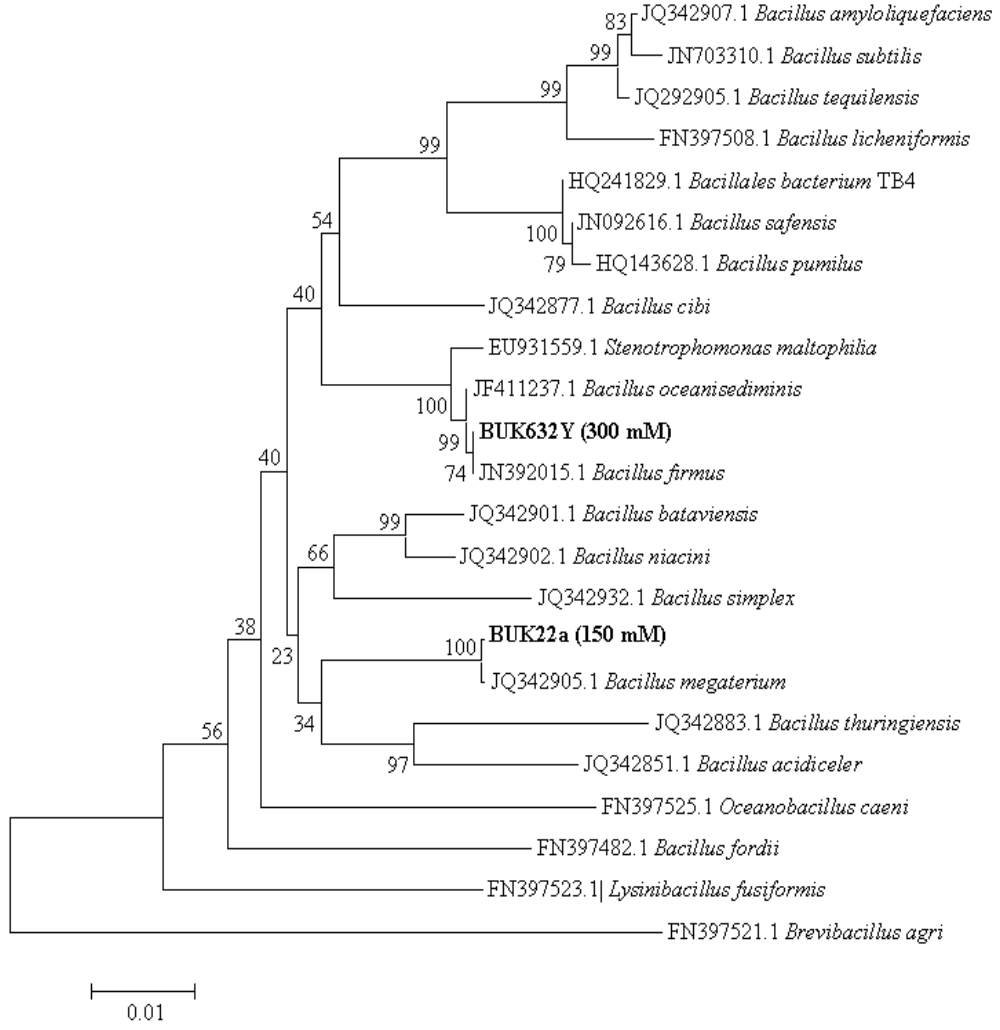
16SrRNA geni sekans sonuçları; BioEdit ve Mega4 gibi biyoinformatik yazılım paketleriyle analiz edilmiştir. Öncelikle gelen sonuçlardaki $QV \geq 20$ değerleri dikkate alınarak sekans kalitesi değerlendirilmiştir. Ayrıca gelen sekanslar Bioedit programıyla açılarak okunan dizilerin piklerine bakılarak sekans kalitesi hakkında fikir edinilmiştir. Piklerin karışmış olması sekans kalitesinin düşük olduğunu ve okumanın hatalı olduğunu göstermektedir. İki farklı primer ile elde edilen okumalar Bioedit programının contig analizi (CAP) ile birleştirilmiş ve tüm 16SrRNA gen sekans dizisi elde edilmiştir. Hizalanan (align edilen) nükleotid sekans sonuçları BlastN programı kullanılarak GenBank nükleotid verileri ile karşılaştırılmıştır. İzolatların 16SrRNA gen dizilerine göre en çok benzerlik gösterdikleri bakteri türleri saptanmıştır (Çizelge 3.12–3.13). Contig yapılan izolatlarla en çok benzerlik gösterdikleri bakteri türleri ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur (Şekil 3.43.–3.46.). Ayrıca izolatların kendi içerisinde de filogenetik ağacı yapılmıştır (Şekil 3.47.).

Çizelge 3.12. Bazı BUK izolatların BlastN analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

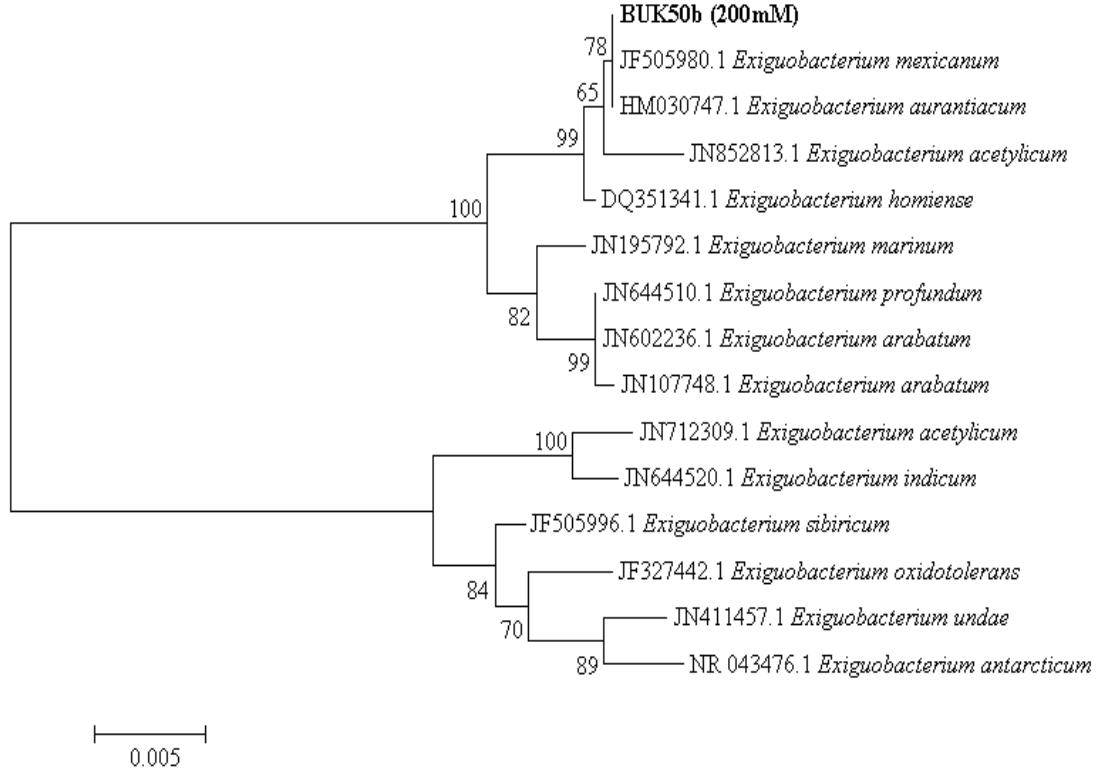
Cins İsmi	En Yakın Tür	İzolat İsmi
Bacillus	<i>Bacillus firmus</i>	BUK632Y
	<i>Bacillus megaterium</i>	BUK22a
	<i>Bacillus pumilis</i>	BUK64c
Exiguobacterium	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	BUK50b
Pseudomonas	<i>Pseudomonas plecoglossicida-putida</i>	BUK2ax
	<i>Pseudomonas plecoglossicida-putida</i>	BUK1ax
	<i>Pseudomonas stutzerii</i>	BUK50a1
	<i>Pseudomonas stutzerii</i>	BUK69b
Zhihengliuella	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>	BUK64b
	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>	BUK23c

Çizelge 3.13. Bazı BUK izolatlarının 16SrRNA gen sekansı sonuçlarının BlastN analizi sonuçları

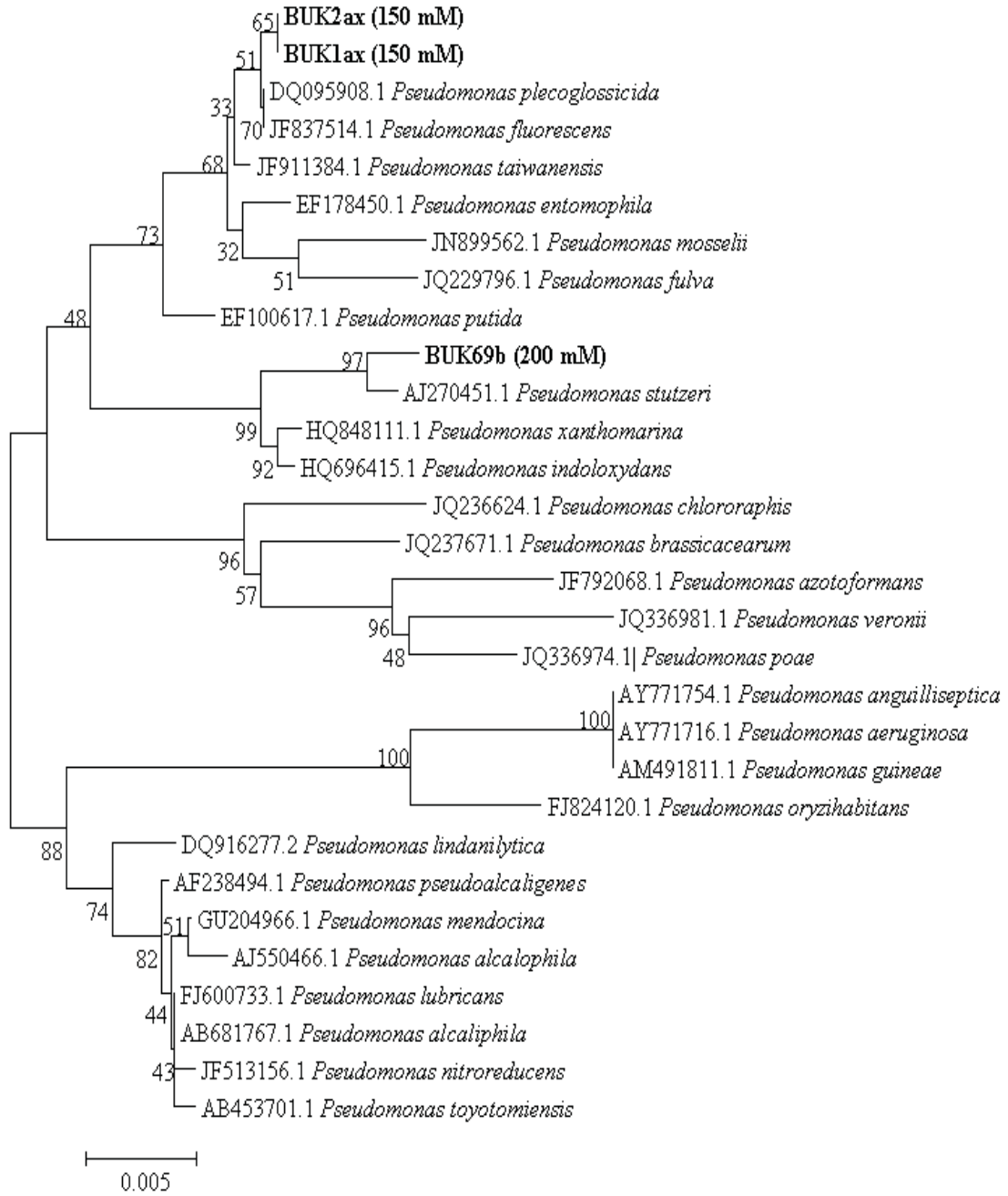
İzolat Adı	En Yakın Tür	Genbank No	Sorgulanan sekans	Benzerlik (%)
BUK1ax	<i>Pseudomonas putida</i>	AB513735.1	100	100
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	EU594553.1	100	100
BUK2ax	<i>Pseudomonas putida</i>	AB513735.1	100	99
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	FR668235.1	100	99
BUK22a	<i>Bacillus megaterium</i>	GU471206.1	100	100
	<i>Bacillus aryabhattai</i>	JF895478.1	100	100
BUK23c	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>	NR_043765.1	100	99
	<i>Zhihengliuella</i> sp.	FJ425902.1	100	99
BUK50a1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AB682251.1	100	99
BUK50b	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	JF505980.1	100	100
	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	EU282460.1	100	99
BUK64b	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>	NR_043765,1	100	100
	<i>Zhihengliuella</i> sp.	FJ425902	100	99
BUK64c	<i>Bacillus safensis</i>	JN092616.1	100	99
	<i>Bacillus pumilus</i>	HQ143628.1	100	99
BUK69b	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AJ270451.1	100	99
	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ588844.1	100	99
BUK632Y	<i>Bacillus firmus</i>	JN392015.1	100	99
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	JF411237.1	100	99



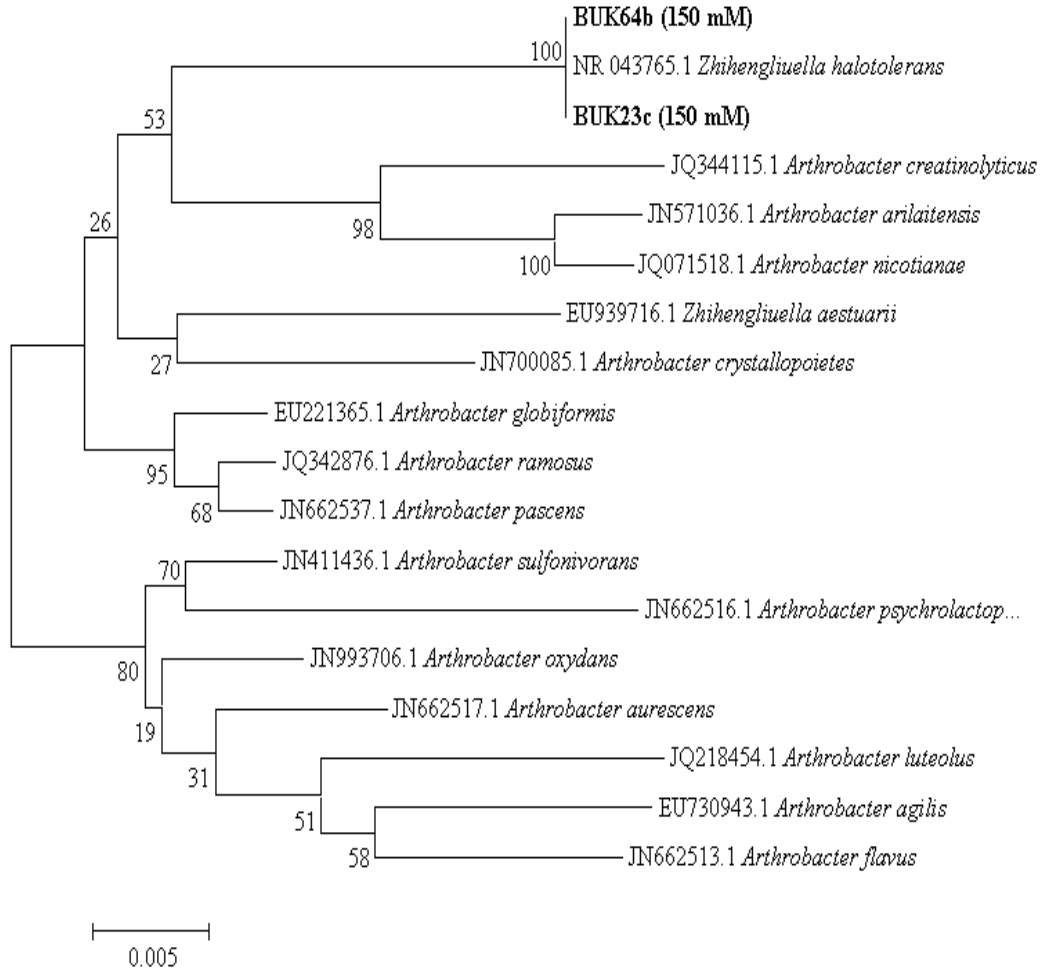
Şekil 3.43. *Bacillus* türleri ile 2 adet izolatin (BUK632Y ve BUK22a) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA4 programıyla Clustal W align ve Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Ağaç dalları oluşturulurken program tarafından 10000 kez tekrar (bootstrap) yapılmıştır. Toplamda 1350 adet nükleotit karşılaştırılmış ve farklılıklara göre dallanmıştır.



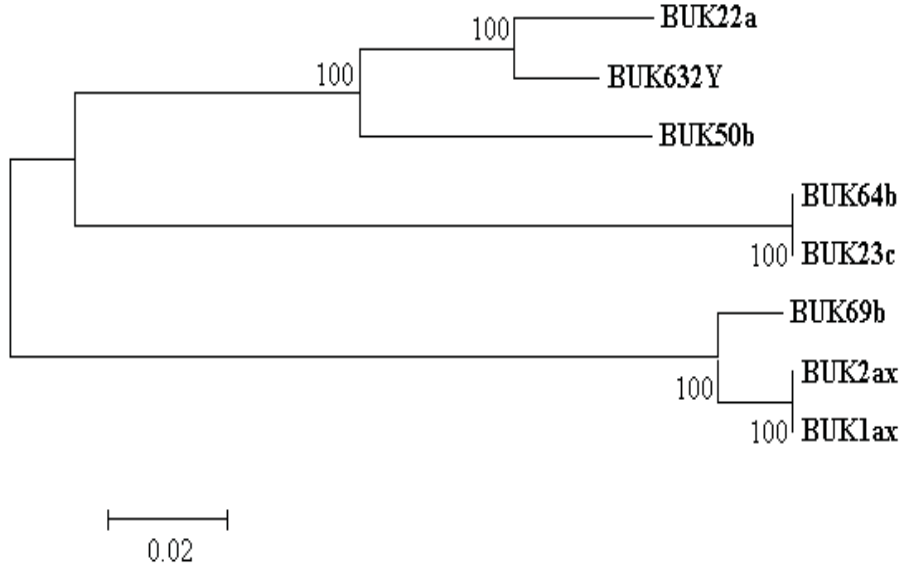
Şekil 3.44. Exiguobacterium türleri ile BUK50b izolatının 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA4 programıyla Clustal W align ve Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Ağaç dalları oluşturulurken program tarafından 10000 kez tekrar (bootstrap) yapılmıştır. Toplamda 1263 adet nükleotit karşılaştırılmış ve farklılıklara göre dallanmıştır.



Şekil 3.45. *Pseudomonas* türleri ile 3 adet izolatın (BUK69b, BUK1ax ve BUK2ax) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA4 programıyla Clustal W align ve Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Ağaç dalları oluşturulurken program tarafından 10000 kez tekrar (bootstrap) yapılmıştır. Toplamda 1305 adet nükleotit karşılaştırılmış ve farklılıklara göre dallanmıştır.



Şekil 3.46. Zhihengliuella türleri ile 2 adet izolattın (BUK64b ve BUK23c) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA4 programıyla Clustal W align ve Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Ağaç dalları oluşturulurken program tarafından 10000 kez tekrar (bootstrap) yapılmıştır. Toplamda 1319 adet nükleotit karşılaştırılmış ve farklılıklara göre dallanmıştır.



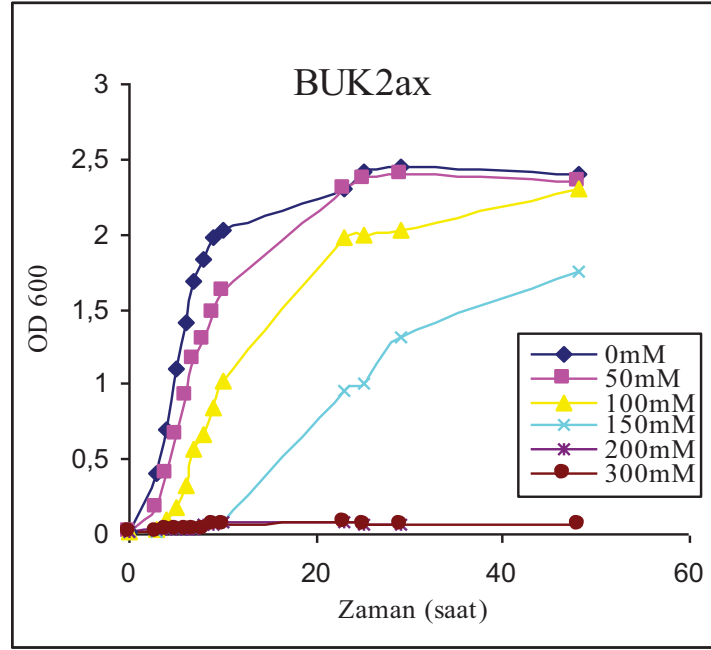
Şekil 3.47. İzolatların kendi içerisinde (BUK22a, BUK632Y, BUK50b, BUK64b, BUK23c, BUK69b, BUK2ax ve BUK1ax) 16SrRNA gen sekanslarına dayalı filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA4 programıyla CLUSTAL W align ve Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Ağaç dalları oluşturulurken program tarafından 10000 kez tekrar (bootstrap) yapılmıştır. Toplamda 1205 adet nükleotit karşılaştırılmış ve farklılıklara göre dallanmıştır.

3.2.4. Bor toleransı yüksek çıkan bazı izolatlarda büyüme eğrisi çalışmaları

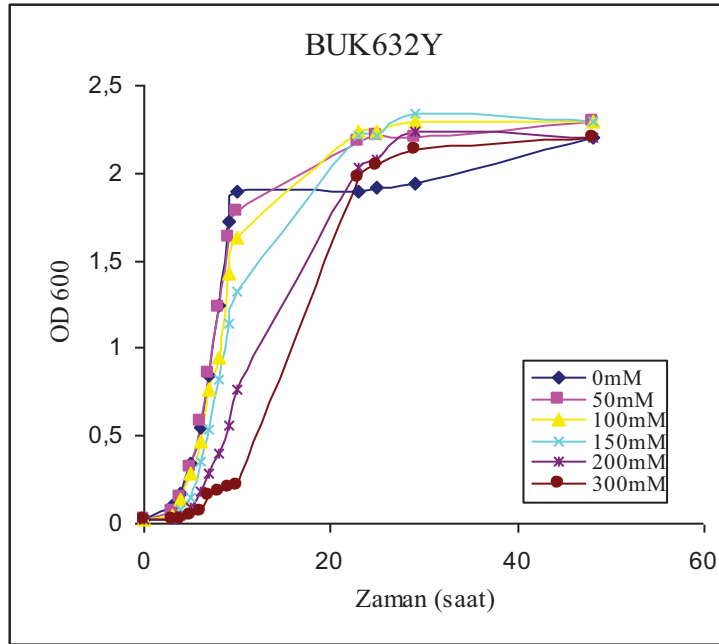
Bu deneylerin detayları materyal ve yöntem bölümünde anlatılmıştır. Elde edilen büyüme değerlerinden Microsoft Excel programıyla tablo oluşturulmuş ve grafikler çizilmiştir (Şekil 3.48.–3.51.). Çizelge 3.14.’te 16SrRNA sonucu en yakın tip tür verilerek, TSB besiyerinde kullanılan Bor konsantrasyonları verilmiştir. Bu çalışmada BUK1ax, BUK2ax, BUK50a-1, BUK22a, BUK632Y, BUK69b, BUK64b izolatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.14. Bu çalışmada kullanılan izolatların en yakın tip türleri ve borik asit konsantrasyonları

İzolat Adı ve En Yakın Tür	Kullanılan Borik Asit (mM)
BUK1ax, <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK2ax, <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK50a-1, <i>Pseudomonas stutzerii</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK22a, <i>Bacillus megaterium</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK632Y, <i>Bacillus firmus</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK69b, <i>Pseudomonas stutzerii</i>	0, 50, 100 150, 200, 300
BUK64b, <i>Zhihengliuella halotolerans</i>	0, 50, 100 150, 200, 300

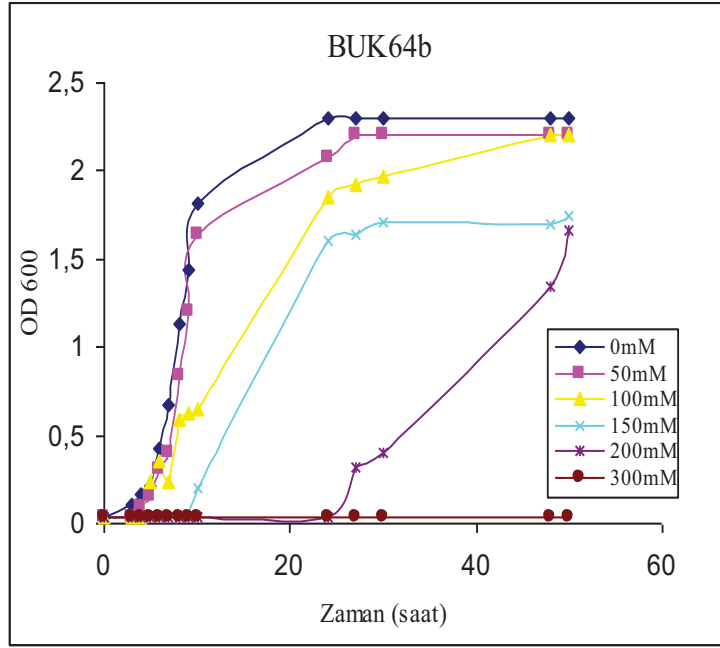


(a)

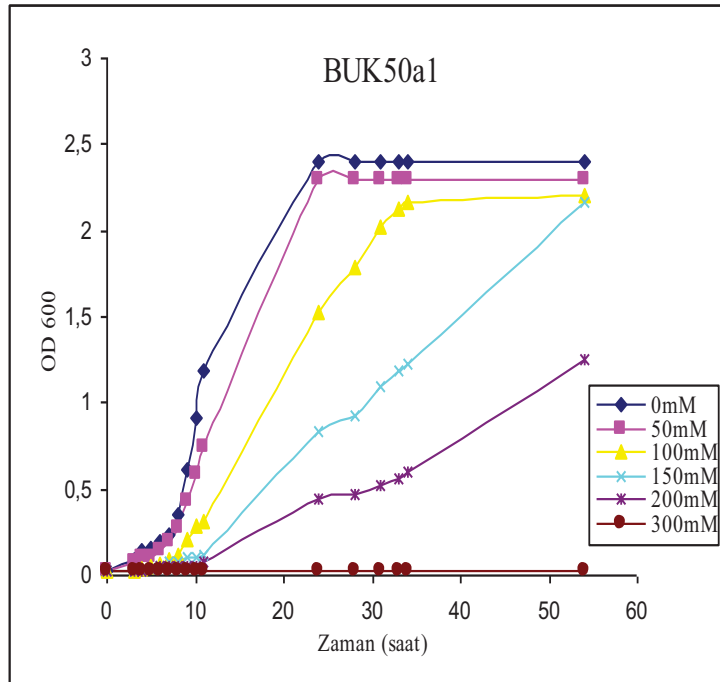


(b)

Şekil 3.48. BUK2ax (a) ve BUK632Y (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 50, 100 150, 200 ve 300) TSB besi yeri kullanılmıştır.

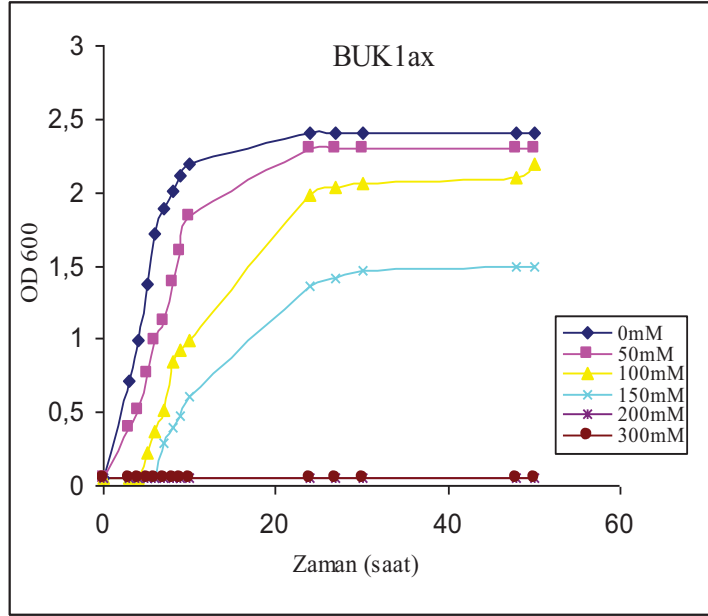


(a)

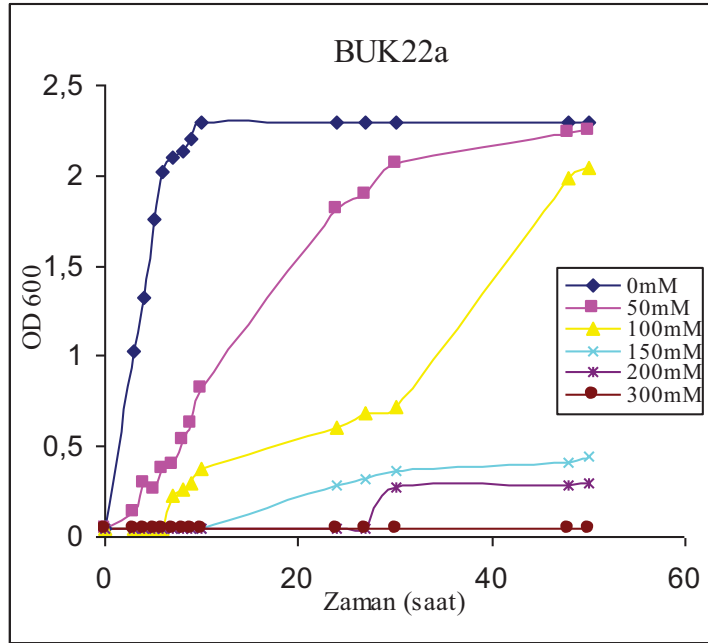


(b)

Şekil 3.49. BUK64b (a) ve BUK50a-1 (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 50, 100 150, 200 ve 300) TSB besiyeri kullanılmıştır.

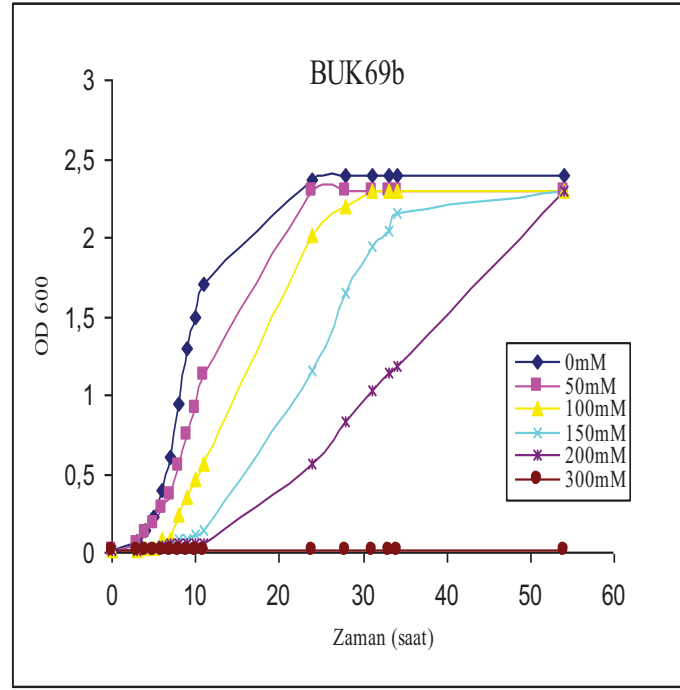


(a)

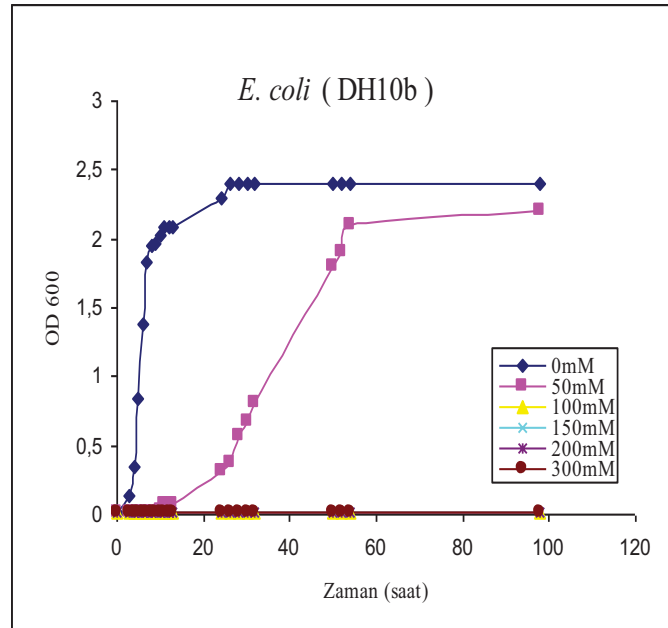


(b)

Şekil 3.50. BUK1ax (a) ve BUK22a (b) izolatlarının artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 50, 100 150, 200 ve 300) TSB besiyeri kullanılmıştır.



(a)



(b)

Şekil 3.51. BUK69b izolatının (a) ve *E. coli* (b) bakterisinin artan borik konsantrasyonuna bağlı büyüme eğrileri. Bu deneyde farklı borik asit konsantrasyonu içeren (0, 50, 100 150, 200 ve 300) TSB besi yeri kullanılmıştır.

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Borik Asitin Türleri Bilinen Mikroorganizma Türlerinin Gelişimleri Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar

4.1.1. Bor tolerans sonuçları

Bu çalışmada seçilen bazı mikroorganizma türlerinin, Bor'a tolerans seviyeleri saptanmasında 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar, "plate-plaka yöntemi", "tüp dilüsyon yöntemi" ve "Bor tolerans nokta testi" olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemlerden en çok tercih edilen yöntem "Bor tolerans nokta testi" olmuştur. Çünkü bize daha kesin sonuçlar vermektedir.

Plate-plaka yöntemine göre, araştırılan 16 mikroorganizma arasında hastane suşlarından *Klebsiella sp.* en fazla direnç gösteren bakteri olarak belirlenmiştir. Diğer mikroorganizmalar için ise genel olarak sınır, 50-100 mM borik asittir. Bunun üzerindeki değerlerde bakterilerin gelişmediği gözlemlenmiştir.

Tüp dilüsyon yöntemine göre, test edilen 18 adet mikroorganizma arasında *Streptomyces albus* hariç hepsi 100 mM borik asit içeren besi yerinde gelişme göstermemiştir. Bu mikroorganizma 100-150 mM arasında borik aside direnç gösterebilmektedir. Ayrıca test edilen 7 adet *Staphylococcus* türlerinde Bor tolerans değerinin düşük olduğu görülmüştür. Bu türlerin Bor'a direncinin yaklaşık olarak 50 mM olduğu görülmüştür.

Bor tolerans nokta testi sonuçlarına göre ise, mikroorganizmaların en son gelişme gösterdiği Bor konsantrasyonu Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Çalışılan 28 mikroorganizma türlerinin büyük çoğunluğunun, 0-75 mM arasında Bor'a tolerans gösterdiği görülmüştür. Çalışılan maya türlerinde ise *Candida sp.* 50 mM, *Streptomyces albus*'ta ise (100–150 mM) görülmesi dikkat çekmiştir. Bu sonuçlar da bize mikroorganizma türlerinin Bor'a olan dirençlerinin birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. Bu değişkenliğe neden olan hücresel düzeydeki yapısal farklılıklar

ve tolerans mekanizmalarıyla, rol alan biyokimyasal oyuncular, gelecekteki çalışmalarda daha kapsamlı olarak araştırılmalı ve bu tür deneylerde “Bor tolerans nokta testi” kullanılmalıdır.

4.1.2. Farklı Bor (Borik asit) konsantrasyonlarında test mikroorganizmalarının büyüme eğrilerinin saptanması ile ilgili sonuçlar

Test mikroorganizmalarının farklı Bor konsantrasyonlarında gelişim grafikleri ile bor içermeyen (0 mM) sıvı besiyerindeki verilere göre hesaplanan optimum büyüme verileri bulgular bölümünde verilmiştir. Verilerin analizlerinden 25 mM’ın üzerindeki Bor konsantrasyonlarının logaritmik faza geçişi uzatarak büyümeyi sınırlandırdığı açıkça görülmektedir.

Veriler değerlendirildiğinde, test mikroorganizmalarının Gram-reaksiyonu, exopolisakkarit üretmeleri veya kapsül- glikokaliks gibi extrasellüler yapı veya membran özelliklerinin, Bor’a olan toleransları ile bir bağlantısının olmadığı yorumu yapılabilir.

4.1.2.1 Test edilen mikroorganizma türlerinin Bor tarafından inhibisyonunun ikiye çoğalma süreleri olarak ifade edilmesi

Bor’un inhibisyon etkisini göstermek için, bulgular bölümünde anlatılan yaklaşımla hesaplanan, 1/ikiye çoğalma süreleri verilmiştir. Şimdi çizelge ’de, her bir bakteri türü için test edilen spesifik Borik asit konsantrasyonundaki çoğalma süreleri, toplu olarak verilmektedir. Test edilen değerlerde Bor konsantrasyonu arttıkça, ikiye katlanma süresi (saat) artmaktadır (Çizelge 5.1.-5.2). Literatürde bu şekilde toplu bir veri bulunmamaktadır. Bu çizelgedeki değerler kullanılarak farklı bakteri türlerinin Bor ile ilişkisi karşılaştırılabilir ve spesifik değerler gelecekteki başka veya benzer deneyler için kullanılabilir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin, Bakteri-bor ilişkisine dair, bir referans oluşumunda yararlı olacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.1. Çeşitli bakteri türlerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında logaritmik fazda (OD_{0,15}'ten OD_{0,30} a) ikiye katlanma süreleri (saat)

Borik asit (mM)	<i>A. lipo.</i>	<i>B. sub.</i>	<i>C. nec.</i>	<i>K. pn.</i>	<i>C. oxa.</i>	<i>M. lys.</i>	<i>P. aer.</i>	<i>P. tol.</i>	<i>Ser. sp.</i>	<i>S. aur.</i>	<i>V. an.</i>	<i>S. alb.</i>
0	1,36	0,46	0,68	0,46	0,57	0,91	0,56	0,60	0,44	0,39	0,49	0,76
10	23,81		1,70		1,21	1,56	0,64	0,71	0,62	0,67	0,55	
20			3,67		30,61	8,67	1,90	0,77		1,32	0,77	
25		1,29		0,84								0,74
30							5,68	1,52		1,81	2,07	
40												
50				1,54								0,73
60												
75		18,29		2,33								0,78

Çizelge 4.2. Çeşitli bakteri türlerinin farklı borik asit konsantrasyonlarında logaritmik fazda (OD 0,15'ten OD 0,30 a) ikiye katlanma süreleri (saat)

Borik asit (mM)	<i>X. agil</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. sum.</i>	<i>M. fuji.</i>	<i>M. thi.</i>	<i>M. lut.</i>	<i>H. ars.</i>	<i>C. met.</i>	<i>B. firm.</i>	<i>B. liche.</i>
0	0,53	0,46	3,11	5,54	3,13	1,07	7,39	1,60	0,57	0,67
10	1,49		3,97	5,66	3,80	2,03				
20	1,62		53,57	7,39	4,14	2,63	16,13	2,21		
25		0,84							0,66	0
30	3,11			9,87	19,74	4,25				
40								5,36		
50		1,54							2,89	0
60								12,10		
75		2,33								

*Çizelge içindeki rakamlar saat olarak, mikroorganizma yoğunluğunun lineer grafikte O D 0,15'ten O D 0,30' a geçme sürelerini belirtmektedir. Kısaltmalar: *A. lipo*, *Azospirillum lipoferum*; *B. sub*, *Bacillus subtilis*; *C. nec*, *Cupriavidus necator*; *K. pn*, *Klebsiella pneumoniae*; *C. oxa*, *Cupriavidus oxaliticus*; *M. lys*, *Micrococcus lysodeikticus*; *P. aer*, *Pseudomonas aeruginosa*; *P. tol*, *Pseudomonas tolasii*; *Ser sp*, *Serratia sp.*; *S. aur*, *Staphylococcus aureus*; *V. an*, *Vibrio anguillarum*; *S. alb*, *Streptomyces albus*; *X. agil*, *Xanthobacter agilis*; *M.sum*, *Methylobacterium suomiense*; *M.fuj*, *Methylobacterium fujisawaense*; *M. thi*, *Methylobacterium thiocynatum*; *M. lut.*, *Micrococcus luteus*; *H. ars*, *Herminiimonas arsenicoxydans*; *C. met*, *Cupriavidus metallidurans*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *B. firm*, *Bacillus firmus*; *B. liche*, *Bacillus licheniformis*.

4.1.3. Bazı bakterilerin farklı Bor konsantrasyonlarında SDS-PAGE protein profillerinin çıkarılması ile ilgili sonuçlar

Bor bir yarı metaldir. Aynen ağır metallerde olduğu gibi bir hücresel cevap değişikliğinin SDS-PAGE ile saptanabileceği düşünülmüştür. Çünkü örneğin 0 mM borik asit içeren besi yerinde geliştirilen bir bakteri, 75 mM içinde göreceli olarak kayda değer bir metabolik yapılanmaya geçecek ve yeni proteinler ve biyomoleküller sentezleyecektir. Bu hipotezi test etmek için SDS-PAGE ve Native-PAGE deneyleri yapılmıştır. SDS-PAGE deneyinde, *E.coli* bakterilerinde farklı Bor konsantrasyonlarında 20 ve 40 mM borik asit içeren besi yerinde farklı bant gözükümüştür. Bu bant 60 mM borik asit içeren besiyerinde gözükmemektedir. Bunun sebebinin de Bor'a bağlı bir değişiklikten olmadığı düşünülmektedir. Çünkü bakterinin yetişmiş olduğu O.D. değerleri farklıdır. Bu farktan dolayı bu protein sentezlenmiş olabilir. *Klebsiella pneumoniae* bakterisi 75 mM borik asit içeren ortamda farklı protein sentezlemiştir. Bu protein Native-PAGE ile kısmi olarak saflaştırılmıştır ve bu proteinin yaklaşık olarak 27 kDa civarında olduğu bulunmuştur (Şekil 3.37.). Ayrıca bu proteinin tanımlanması için ek çalışmaların da yapılması gerekmektedir.

4.2. Bursa İlindeki Bor Madeni ve Çevresinden Bakteri İzolasyonu

4.2.1. İzolatların Bor toleransının belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

Öncelikle 19 adet izolatın Bor toleransı belirlenmiştir. 0 mM'dan 300 mM'a kadar farklı Bor konsantrasyonuna sahip besi yerlerine nokta ekim yapılmıştır. Bu ekimlerde izolatların üreme gösterdiği en yüksek Bor konsantrasyonları tespit edilmiştir. Sonuç olarak 10 adet izolatın 150 mM ve üstü Bor konsantrasyonlarına toleransı olduğu saptanmıştır. Bu izolatların aralarındaki benzerliği bulmak için 16SrRNA gen sekansı analizi yapılmıştır.

4.2.2. İzolatların 16SrRNA sekans analizi ve değerlendirilmesi

16SrRNA gen dizisi yapılacak izolatlar seçilirken Bor tolerans değerlerine bakılmıştır. Bor tolerans değerlerini göz önüne almanın sebebi çalışılan mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun 100 mM Bor'a kadar direnç göstermesidir. Hatta 150 mM ve üstünde ki konsantrasyonlar da yaşayamamaktadır. Bu verilere bakılarak Bor toleransı yapılan izolatlardan 150 mM ve üstünde yaşayan izolatların 16SrRNA gen dizisi yapılmıştır. Buna göre 4 farklı cins ve 7 farklı tür tespit edilmiştir. Bunların listesi Bulgular bölümünde verilmiştir (Çizelge 3.12.). Gelen sekans sonuçlarından $QV \geq 20$ değerleri ve piklerinin durumu dikkate alındığında BUK50a1 izolatının 27F primeriyle sekans analizi yapılamamış ve bu yüzden contig yapılamamıştır. Bundan dolayı bu izolatın sekansı tekrarlatılmış ancak yine değerler beklenilenden düşük gelmiştir. Bu izolat 1492R primeriyle Blast yapılmıştır ve filo genetik ağaç oluşturmada kullanılmamıştır. Ayrıca BUK64c izolatı da filogenetik ağaç oluştururken sorun oluşturduğundan ağaca dahil edilmemiştir. 16SrRNA gen dizisine göre cins tanımlamaları kesin olarak kabul edilse de tür tanımlamaları konusunda daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Sekans analizinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zhihengliuella* ve *Exiguobacterium* olmak üzere 4 adet farklı cins bulunmuştur (Çizelge 3.12.). Bulunan cinsler; *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zhihengliuella* ve *Exiguobacterium* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen cinslere ait izolatların filo genetik ağaçları yapılmış ve türlere olan benzerlikleri kısmen de olsa belirlenmiştir.

İzolatlardan bazılarının yeni tür olabilme ihtimalleri yüksektir. Örneğin BUK632Y izolatının 16SrRNA dizisine göre Blast sonucu *Bacillus firmus* bakterisidir. İki bakterinin gen sekansları arasında %99 benzerlik vardır. *B. firmus* 14T suşu ile BUK632Y izolatının tolerans gösterdikleri Borik asit değeri farklıdır (300 ve 100mM borik asit). Büyüme eğrisinde farklı gelişim göstermektedirler. Bu izolatın bundan sonraki çalışmalarda yeni tür analizi yapılmalıdır.

16SrRNA gen sekansını yaptığımız izolatlardan bazıları (BUK23c ve BUK64b) *Zhihengliuella halotolerans* çıkmıştır. Bu bakteri tuzlu topraklardan izole edilmiştir; gram pozitif, aerobik, besiyerinde hareketsiz, spor formu oluşturmayan, katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Optimum büyümeleri % 10 tuz içeren besiyerinde pH 8-9 arasında, 28–30°C 'dir (Wen-Jun Li, 2007). Bizimde izole etmiş olduğumuz ortam tuzlu toprak gibi ekstrem koşul olan Bor'lu topraklardır. Bulmuş olduğumuz bu izolatlar 150-200 mM borik asite direnç göstermektedir. Bu tip tür ile izolatlar karşılaştırılarak (mikrobiyolojik, moleküler ve FAME) yeni tür analizi yapılabilir.

Benzer şekilde BUK1ax, BUK2ax, BUK50a1, BUK69b izolatları *Pseudomonas* bakterisine benzemektedir. *Pseudomonas*, gram negatif, katalaz pozitif, hafif oval çomak şekline sahip olan bu bakterinin, optimum üreme sıcaklığı 25–30 °C'dir. Glikoz ve sakkarozu asit oluşturarak metabolize eder, maltoz, laktoz, fruktoz ve mannitol şekerlerini ise metabolize edemez (Güç, 2010). *Pseudomonas* bakterisinin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Burada örnekleme alanlarımız maden içi, toplama havuzu, taban suyu kenarından ya da madene yakın yol kenarlarından toprak ve su örnekleri olduğundan dolayı *Pseudomonas* türlerini bulmamız gayet normaldir. Burada asıl sorulması gereken soru ise bu izolatlar yüksek miktarda Bor içeren ortamda nasıl yaşamakta olduğudur? Bizim bulmuş olduğumuz bu izolatlar 150-200 mM borik asite direnç göstermektedir fakat doğada

yaşayan bakteri türleri yüksek miktarda Bor'a direnç gösterememektedir. Bundan dolayı da bu izolatların yeni tür analizi için diğer biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle birbirinden ayrılması gerekmektedir.

Literatüre baktığımız zaman Toru Fujiwara ve İftikhar Ahmed Bor toleransı gösteren bazı bakteriler hakkında yayınlar yapmışlardır. Bu yayınlar incelendiğinde bulunan türlerin *Bacillus boroniphilus* (Ahmed vd., 2007c), *Chimaericella boritolerans* (Ahmed, Yokota ve Fujiwara, 2007a), *Gracilibacillus boracitolerans* (Ahmed, Yokota ve Fujiwara, 2007b), *Lysinibacillus boronitolerans* (Ahmed vd., 2007d), *Lysinibacillus parviboronicapien* (Miwa vd., 2009) ve *Variovorax boronicumulans* (Miwa vd., 2008) oldukları görülmektedir. Gen sekans analizini yaptığımız izolatların da, yüksek Bor konsantrasyonuna direnç göstermesi yeni tür adaylarını ilerleyen çalışmalarla bize sunabilir.

4.2.3. Bazı izolatların büyüme eğrilerinin değerlendirilmesi

Artan Bor (borik asit) konsantrasyonuna bağlı olarak bazı izolatların büyüme eğrileri belirlenmiştir. Burada amaç Bor'un mikroorganizma üremesini ne derecede inhibe (veya aktive) ettiğini belirlemek olmuştur. Normalde bu tezde çalıştığımız mikroorganizmalarda borik asit konsantrasyonu arttıkça büyümesinin yavaşladığı görülmüştür. Burada çalışılan bazı izolatlarda ise Bor'a bağlı olarak, büyümenin çok fazla yavaşlamadığı görülmüştür. Örneğin, BUK632Y, BUK2ax ve BUK64b gibi izolatlar borik asit konsantrasyonunun artmasına rağmen büyümeleri çok fazla değişmemiştir. BUK632Y izolatı 16SrRNA gen sekansına göre *Bacillus firmus*'a benzemektedir. *Bacillus firmus*'un büyüme eğrisine baktığımızda 100 mM ve üzerinde yaşayamadığını ve BUK632Y izolatının büyüme eğrisine göre farklı gelişim gösterdiğini görmekteyiz. Bu izolatın diğer mikrobiyolojik ve moleküler yöntemlerle yeni tür analizi çalışmaları yapılmalıdır. İzolatların büyüme eğrisi ile ilgili deneylerde *E. coli* (DH10b) suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında; Test edilen 37 farklı mikroorganizma türünde, Borik asit toleransları büyük çoğunlukla 25 mM-75 mM arasında değişiklik göstermiştir. Sadece iki bakteride tolerans değeri 100 mM borik asit olarak tespit edilmiştir. Bazı bakterilerde borik asit konsantrasyonuna bağlı büyüme hızları belirlenmiştir. Bor'a

bağlı olarak, büyümenin değiştiği gözlenmiştir. Bazı mikroorganizmalarda farklı borik asit konsantrasyonlarında SDS-PAGE ile protein profilleri belirlenmiş ve bazı protein bant farklılıkları gözlenmiştir.

Bursa Kestelek Bor madenleri ve çevresinden toprak ve su örneği toplanmış ve bunlara bakteri izolasyon teknikleri uygulanarak izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatlardan bazılarının Bor toleransları belirlenmiştir. Bor toleransı yüksek olan, bazı izolatların 16SrRNA sekans analizleri yapılmıştır. En yakın türler; *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas plecoglossicida-putida*, *Pseudomonas stutzerii*, *Zhihengliuella halotolerans* olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, hem türü bilinen bakteriler üzerinde Bor tolerans ve protein profil belirleme deneyleri yapılmış, hem de Bor toleransı yüksek olan yeni bakteri izolatları elde edilmiştir. Bu çalışma ile Bor-bakteri ilişkisinin anlaşılabilmesi adına önemli bir boşluğu doldurarak, gelecekteki çalışmalarda kullanılacak veriler üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, I., Yokota, A. ve Fujiwara, T. (2007a) *Chimaereicella boritolerans* sp. nov., a boron-tolerant and alkaliphilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 986-992.
- Ahmed, I., Yokota, A. ve Fujiwara, T. (2007b) *Gracilibacillus boraciitolerans* sp. nov., a highly boron-tolerant and moderately halotolerant bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 796-802.
- Ahmed, I., Yokota, A. ve Fujiwara, T. (2007c) A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth. *Extremophiles* 11: 217-224.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A. ve Fujiwara, T. (2007d) Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1117-1125.
- Anderson G. R, J., J. V. (1961) Boron: A non-essential growth factor for *Azotobacter chroococcum*. *Soil Sci* 92: 113–116.
- Bartleta, R.J., Picarelli, C.J., (1973) Availability of boron and phosphorus as affected by liming on acid potata soil. *Soil Sci* 116: 77-83.
- Bennett, O.L., Mathias, E.L., (1973) Growth and chemical composition of crownvetch as affected by lime, boron, soil source and temperature regime. *Agron J* 65: 587-593.
- Barranco, W. T. ve Eckhert, C. D. (2004) Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 216: 21-29.
- Barranco, W. T., Kim, D. H., Stella, S. L., Jr. ve Eckhert, C. D. (2009) Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 25: 309-320.

- Benkovic, S. J., Baker, S. J., Alley, M. R. K., Woo, Y. H., Zhang, Y. K., Akama, T., Mao, W. M., Baboval, J., Rajagopalan, P. T. R., Wall, M., Kahng, L. S., Tavassoli, A. ve Shapiro, L. (2005) Identification of borinic esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases, CcrM and MenH. *J of Med Chem* 48: 7468-7476.
- Cakmak, I. ve Romheld, V. (1997) Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* 193: 71-83.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. ve Hughson, F. M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549.
- Col, M. ve Col, C. (2003) Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya Province of Turkey. *Food Chem Toxicol* 41: 1417-1420.
- Camacho-Cristobal J.J., M.B. Herrera-Rodriguez, V.M. Beato, J. Rexach, M.T. Navarro-Gochicoa, J.M. Maldonado and A. Gonzalez-Fontes, (2008) The expression of several cell wall-related genes in Arabidopsis roots is down-regulated under boron deficiency. *Environ Exp Bot* 63: 351-358.
- Devirian, T. A. ve Volpe, S. L. (2003) The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 219-231.
- Epa, (1986) The Environment (Protection) Act
- Gaby, A. R. (1999) Natural treatments for osteoarthritis. *Altern Med Rev* 4: 330-341.
- Goldberg, S. (1997) Reactions of Boron with Soils, *Plant and Soil* 193: 35-48.
- Güç E., (2010) Kocamanit içeriğindeki arseniğin biyoliç ile uzaklaştırılması, yüksek lisans tezi, Adana.
- Hou, J., Evans, L. J. and Spiers, G. A., (1996) Chemical fractionation of soil boron: I. Method development. *Can J Soil Sci* 76: 485-491.
- Hu, H., Penn, S. G., Lebrilla, C. B. ve Brown, P. H. (1997) Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol* 113: 649-655.

- Irschik, H., Schummer, D., Gerth, K., Hofle, G. ve Reichenbach, H. (1995) The Tartrolons, New Boron-Containing Antibiotics from a Myxobacterium, *Sorangium Cellulosum*. *Journal of Antibiotics* 48: 26-30.
- Jin, J., Martens, D. C. and Zelazny, L. W., (1987) Distribution and plant availability of soil boron fractions. *Soil Sci Soc Am J* 51: 1228-1231.
- Katsivela, E., Bonse, D., Krüger, A., Strömpl, C., Livingston, A., & Ittich, R.-M. (1999) An extractive membrane biofilm reactor for degradation of 1,3-dichloropropene in industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 853–862.
- Keren, R., F.T. B., (1985) Boron in Water, soil and plants. *Adv Soil Sci* 1: 229-276.
- Kohno, J., Kawahata, T., Otake, T., Morimoto, M., Mori, H., Ueba, N., Nishio, M., Kinumaki, A., Komatsubara, S. ve Kawashima, K. (1996) Boromycin, an anti-HIV antibiotic. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 1036-1037.
- Lukaszewski, K. M. and Blevins, D. G. (1996) Root growth inhibition in boron deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism, *Plant Physiol* 112: 1135–1140.
- Mateo P., Bonilla, I., Garcia-G. (1990) Boron requirement in Cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiol* 94: 1554–1560.
- Mastromatteo, E., F. S. (1994) International symposium on health effects of boron and its compounds. *Environ Health Perspect* 102: 139-141.
- Mc Kee E, Wolf H.W. (1963) Water Quality Critaria, *California State Water Resources Contral*
- Moseman, R.F.(1994) Chemical disposition of Boron in animals and humans, *Environmental Health Perspect* 102: 113-117.
- Miwa, H., Ahmed, I., Yokota, A. ve Fujiwara, T. (2009) *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 1427-1432.

- Miwa, H., Ahmed, I., Yoon, J., Yokota, A. ve Fujiwara, T. (2008) *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 286-289.
- Miwa, K., Takano, J. ve Fujiwara, T. (2006) Improvement of seed yields under ,boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 46: 1084-1091.
- Moody, D., Rathjen, A., Cartwright, B., Paull, Lewis, J. (1988) Genetic diversity and geographical distribution of tolerance to high levels of soil boron. In *7th International Wheat Genetics Symposium* 113: 859–865
- Naghii, M. R. ve Samman, S. (1993). The role of boron in nutrition and metabolism. *Prog Food Nutr Sci* 17: 331-349.
- Nielsen, F. H., Hunt, C. D., Mullen, L. M. ve Hunt, J. R. (1987) Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J* 1: 394-397.
- Parr AJ, Loughman BC (1983) Boron and membrane function in plants. Metals and Micro-Nutrients: *Uptake and Utilization by Plants* 123: 87-107.
- Rahmatullah, M., Gopalakrishnan, S., Andrews, P.C., Chang, C.L., Radke, G.A., and Roche, T.E. (1989) Subunit associations in the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Structure and role of protein X and the pyruvate dehydrogenase component binding domain of the dihydrolipoyl transacetylase component. *J Biol Chem* 264: 2221-2227.
- Reeves, R.E., Warren, L.G., Susskind, B., and Lo, H. Reid, R. (2007) Update on boron toxicity and tolerance in plants. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition* 224: 83-90.
- Reid, R.J., Hayes JE, Post A, Stangoulis JCR ve Graham R. D. (2004) A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell Environ* 27: 1405–1414.
- Rezanka, T. ve Sigler, K. (2008) Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* 69: 585-606.

Sambrook J, Russell DW. (2006) The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.

Sayli, B. (2000) *İnsan Sağlığı ve Bor Minarelleri*.

Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A. ve Iordachescu, D. (2008) Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biol Trace Elem Res* 122: 197-205.

Taban, S. E., I. (2000) Bor Uygulamasının Değişik Buğday Çeşitlerinde Gelişme ve Toprak Üstü Aksamda Bor Dağılımı Üzerine Etkisi. *Turk J Agric For* 24: 255-262.

Tamura K., Dudley J., Nei M ve Kumar S., (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.*; 24(8):1596-1599.

Tanrıseven A., (2011). Balıkesir-Bigadiç Bor maden yatakları ve çevresinden Bor toleransı yüksek bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu, yüksek lisans tezi, Muğla.

Warrington, K. (1923). The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann Bot* 37: 629–672.

Wen-Jun Li, Yu-Qin Zhang, vd., (2007) *Zhihengliuella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Micrococcaceae, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1018–1023.

Who (1998). World Health Organization. Environmental Health Criteria 204.

Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Keren, R. ve Reid, R. J. (2008) Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil* 304: 73-87.

Ek A. BUK İzolatlarının 16SrRNA Geninin Nükleotid Dizileri

BUK1ax

27F

NNNNGGNCNNNGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCA
GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGA
AAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC
GCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
CAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
ATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTG
ACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
AAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGCCTT
GACATGCAGAGACTTTCAGAGATGGATGNGCTTCGGGACTCTGACACNNTGCTGCATGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTGGTAGTCCCGTACGAGCGCANCCNNTCANNNTACAG
CACGTNNGGTGGGCACTCTAGGGACTTGCNNGACAANCNGGGAAGGTGGGANNNNGTC
AGGTCATCATNNNTTTNNGGCTGGCTACACNNNNCTCAATGNCCNGNANNNNNCANNCC
NGTGGNCTATTNCNGAAACGNAGTNNNNTCGATCAGCNA

1492R

NNNNTNNAACCGTGGTACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCAC
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTG
ATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT
ACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCAT
TGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACATAACGTGCTGGTAACTAAG
GACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTC
TGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACC
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCG
GTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACA
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCT
CAGTGTCAGTATCAGTCCANGTGGTCGCCAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT
TGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAAGTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCCAACTTAACAAA
CCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGC
GCTGCTGGCACAGAGTAGCNGTGCTATCTGTGCGGTACGTCAAACAGCANTATACTACTGC
CCTTCTCCCACTAAAGTGCTTACATCGAGACTCTNNNACACGCGGCATGCTGGATCAGGC
TTCGCCATGTCNNATNCCNCTGCTGCNNCCGTAGANNCTGGAACNNNNCTCANNNACTG
TGACTGANNATCTCTNNAACAGNNACCGGATGCTGNNNNNGNANNNNNCANNNACNANNA
GCNAATCGNNNTAGGNNACTCTGTATNNNNNAN

Contig

TGCTCCTTGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG
GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC

CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGG
 CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA
 GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAG
 CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTT
 GGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC
 CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCA
 ACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC
 CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACC
 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCT
 GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCG
 CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG
 AATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA
 CTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGA
 GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
 GGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTG
 GAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
 GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGT
 ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGTCACCAGAAGTA

BUK2ax

27F

GNGGAGGAGCNGCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGA
 AAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC
 GCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGCG
 ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
 CAGTAAGTTAATACCTTGCTGTAATGCCGTAACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCGCGTAGGTGGTTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATCTGC
 ATCCAAAACCTGGCATGCTATAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAC

1492R

NNNNNNNATCACCTGTGGTACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAAC
 CCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACA
 TTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCC
 GGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCG
 ACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
 ACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTAACGTGCTGGTAA
 CTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAG
 GTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCT
 CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACTTGCGGCCGTACTCCCC
 AGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGT
 TGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
 CACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATC
 TACGCATTTACCGCCTACACAGGAAATTCACCAACCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCA
 GTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACC
 TACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGCT
 GCTGGCACAGAGTAGCCGNGCTTNTCTGTCCGGTACGTCAAACAGCANNAATACTACTGCC
 CTTNCNCCACTAAAGTGCTTACATCGANACTNCTCACACACGCGCATGCTGATCAGCTNG
 NCNATGGTCANATCCCACTGCNGCCTCCGTAGNNNTGGAACNNNTCTCANTTCCNNNNN

NNGATCATNCTNCNGAACNNNCGATCNTGNNNNNTGANNNNNCNACACANNNCTATCGACN
NANG

Contig

TGCTCCTTGATTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG
GACAAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC
CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGG
CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTT
GGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC
CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCA
ACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC
CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACC
TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCG
CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG
AATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA
CTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGA
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTG
GAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTA

BUK22a

27F

GNTNNNANNTCNGCCTATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGA
CGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
TCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAG
ATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC
AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTT
TTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTTAGTG
TTGCGGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAA
AGAATTGACAGGGGGCCCGCGCAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTCTAATCAACGACGA
GAACCTTACCTGGTCTGGCGTCCGTCAGACACTCTAACATGTGCATTCCGCNTTCGGCGN
NNNAGTGACAGATGTGCATGGTTGTCATCAGTCCTNCCATGANATGTAGTNNAANNCA
NGNNNGACNNNNCNTGANNNACNNNCTACNNANTCGGNCATNNNNNGAACTCNNNGNN
CAGCGNNNANNNGAGANNNGNNNGNNNNNNNGTATGNCTGNNNATNNNNNTCNNNTN
NCNNNNNGGGAANTCNGNGCTANNNNANNGNN

1492R

NNCNNTNNNGNNNNNCCTTAGGCGGCTAGCTCCTTACGGTTACTCCACCGACTTCGGGTGT
TACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCG
GCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAA
TCCGAACCTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTAC
CATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGTTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAA
CTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCTCTATCTCTAGAGT
TGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGC
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCC
CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTT
AGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACA
TCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCACGTTGAGCCGTGGGCTTTTACATCAGACTTAAGAAACCG
CCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGNGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGTACGAAGCAGT
TACTCTCGTACTTGTCTTCCCTTAACAACAGAAGTTTTACGACCGAAGCCTCATCACTCA
ACGCGGCGTTGCTCGTCNGACTTCGTCAATTGCCGAAGATTCNCTGCTGCNCCGTAN
GANNTGNNNGNNNNCTCAGTTCCCACTGNNNNATCACCCCTNCNAGNCGGCNATGCAA
TCNNNGCCNNTGGGNNNNNGTNCNNNNNNCAACTANGACCTANAGNNN

Contig

ACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTT
CTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCG
TGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTCGTA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTG
AGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGA
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAC
TCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT
GCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGG
TACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGG
ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
ACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCG

BUK23c

27F

GNNNNAGNTANAGCNTTACCNTGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATT
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCGACTCCAGGATAAGCCCCGG
GAAACTGGGTCTAATACTGGATATTCAATTTCTACCGCATGGTGGTTTTTGAAAGGATT
CTGGTCGAGGAGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAG

CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGTTT
GTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGA
CTAGAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA
GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTAGAGGAGCGA
AAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCA
CTAGATGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGTCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGGATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGCGGATTAATTTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGA
CCGGATCGGGCCTAGAACGTAGTCT

1492R

GNNNNANNNAGNNNNNNNTATCGTANAGCTCCTTCTCACAAGGAGGTTAGGCCACCAGC
TTCGGGTGTTACCAACTTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTAT
TCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGC
AGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGAA
CCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATT
GACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCACCATC
ACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGAACCAGCCCCGAAGGGAAAGACTAT
TTCTAGCCCGATCCGGTCCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAA
TCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC
CGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGACGCGGAAAACGTGGAATGTC
CCCCACATCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCG
TCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTG
TTCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCTACAGCAC
TCTAGTCTGCCCCGTACCCACCGCAGATCCGGAGTTAAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACG
CGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGCGATAACGCTTGCGCCCTAC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTT
CGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGNTTACACCCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCG
CTGCATCAGGCTTCGCCCATTGNTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGANNCTGN
NNNGTTCNNAGTCCAGGTGGNNNNGTACCTCTCANNNGNCTAACCCGTCGTNNNNNN
ANCCATTACNTCANNNCAGCCTGANNGNNGCNCNNANNNTCCTNCTCTNNGNA

Contig

TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCGACTCCAGGATAAGCCCCGGGA
AACTGGGTCTAATACTGGATATTCAATTTCTACCGCATGGTGTTTTTGGAAAGGATTCT
GGTTCGAGGAGGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGT
GCGTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTA
GAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTAGAGGAGCGAAAG
CATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTA
GATGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGTCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCG
GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGGACCG
GATCGGGCTAGAAATAGTCTTTCCCTTCGGGGCTGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG
TCAGTCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATG
TTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGG
TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGG
CCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTT
CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGT
TGTAACACCCGAAG

BUK50a1

27F

NNNCANAANNNGCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGAGAGCTTGCTCTCTGATTC
AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACGTTTCG
AAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTAATAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGC
GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCA
CACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCCCG
CGTGCCACGTGTGTGAAGAACGTCCTTCGGATTGTCAAGCAATTCATTTTGGGAGGAAGGT
TCGTATGCTAAGAAACAACCTATTGTGACATTTTCATGGAGAATATATGCCGGCTCCTTTCC
AGCAAGCCACCAATTACTCCGTTCCATTATTCACGGTAATACGTAAGTTGCGGGCGTAAA
ACAAAATATGTGGCTTTTCATGCTAGATGGCAAAGACTTAATATCCACGTGAAAACCCCAA
CAAAACCGGCGAAATTCACTTTAACTTGTGATGCTAAAATATATGATAATATACTGGAAA
TACAAAAATAAAGTTTGAATGCTAACAGATAACTATGAACTCCAGTTCTTATCTGACACC
TTTGGTCTATAAAATACGCCCAGATTGGTATAGATAGATAACAATATAGAATACCTGCCTG
TTACACGCTCNAT

1492R

NNNNNNNATACTCCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAAC
CCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACAT
TCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCG
GACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCTTAACGTGCTGGTAACT
AAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTT
CTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTAACCTCCAG
GCGGTGCACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCG
ACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA
CCTCAGTGTCAGTATTAGCCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTA
CGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGCTCGCCAGTTT
TGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACTTAACGAACCACCTACG
CGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTTCGTATACCGCGCTGCTGG
CACGAAGTAGCCGNGCTTATTCTGTCCGGTACGTCAAACAGCANTATAGCTACTGCCCTT
CNCCCACTAAAGTGCTTACATCGANACTCTCACACACGCGCATGCCTGATCAAGCTTTCG
CCNNTGTCNNNTCCCACTGCTGCTCCCGTAGANNCTGGACGNGTCTCAGTCNNNNNNCTG
ATCNATCCTCTCCNNNNNNACGANCGTCNCCNGNNNNNNNNNTCACGCACATNNNTAAT
CGANCNNANNNNNNN

BUK50b

27F

NNNNNNCGCANGCTATACATGCAGTCGAGCGCAGGAAATCGACGGAACCCCTTCGGGGGG
AAGTCGACGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCTCAGGTC
TGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCATCGGACCGCATGGTCCG
AGGATGAAAGGCGCTTCGGCGTTCGCTGGGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAG
TTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTG
CGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGA
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

CTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTG
AAACTCAAGGAGTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC
AACGCGAGANCTTACCACTCTGACATCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACGNCCNTCAG
GGGCAGGGTGACAGTGNGCATNNGTCGTCTGAGCTCGTGTGATGAGATGTNAGTAGTCCGC
ACNANCGCANCNNGTCCTANNNGCATCATTCTNTTGGTCACTCTAANGAACTGCGGGNAN
NNCNNNNNNNGNNGACGTCGAGTGTCNNNNCCTATNNATTGGCTNNNNNNNTCCNNNNN
NNNGNNNANGNACGCNACCNAGNNGAGGNATNNNAGAGAGNN

1492R

NNNCNNNNNTNTCACCTTCGGCGGGCTGGCTCCCTAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTT
ACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTACCGCAG
TATGCTGACCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAAT
CCGAAGTGAAGACGGCTTTCTGGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTAC
CGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAACTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACTGAATGGTGGCAA
CTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAACCATGCACCACCTGTACCCCTGCCCCGAAGGGGAAGGTACATCTCTGTACC
GGTCAGGGGGATGTCAAGAGTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATG
CTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGACCGTACTCC
CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACC
TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT
TTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATAGGCCAAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCTCCAC
ATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTTCTCTCCTATACTCAAGCCTC
CCAGTTTCCAATGGCCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAGGCC
GCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTAGCCGTGNNTTCTCGCNGTACCGTCANNGCCGCATGCCTGCGN
ACTGTCTNCCTACACNGACTTACGACCGGANNNCATCGTCACGCGCNTGCTCATCNACTT
TCGTCCATTGTGAGATCCCTACTGCTGCNTCCGTAGNNNCTGGNCGNGTCTCAGTCCANN
TGNCNATTCACCCNACAGTCGNNGACANNNTNCCNNNTGNNNNNNNNNCNNACNAAGC
TNANNGNNNNNNGA

Contig

ATCGACGGAACCCCTTCGGGGGGAAGTCGACGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTAAAGAACCTGCCCTCAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
GGGTCATCGGACCGCATGGTCCGAGGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCGCCTGGGGATGGC
TTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCGAGGCAAT
GGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG
GCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAACTGG
GAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCC
CTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
CCTTAGTTGCCACCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAGTTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTTCT
CAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGG
TCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGA

BUK64b

27F

NNNNTNNGCNGNNNGCNTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATT
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCGACTCCAGGATAAGCCCGG
GAAACTGGGTCTAATACTGGATATTCAATTTCTACCGCATGGTGGTTTTTGAAAGGATT
CTGGTCGAGGAGGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGA
CTAGAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGATGCGGTGAAATGCGCAGATATCA
GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAA
AGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCAC
TAGATGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGTCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCT
GGGAGTACGCCCGCAAGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGCG
GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAGAACCTTACCANGCTTGACATGGACCGGA
TCGGGCTAGAATAGTCTTCCCTTCGGGCTGGTTCACNGTGTGCATGNNTCGTCAGCTCG
TGTCNGAGATGTNGTTAAGTCGCTGCAACGATCACAACCGTCATCATGTTGCAGCACGGG
ATGNTGGGANGCNGNGNTACTGACNNGTTCGACTCGGCACGAANGTGNNGGGACAAGG
TGAATCCAGCTNACATCTCTATGTCCCGAGGNNNNNNCCNNNTCCNACNGACCGCGTA
CAATGCGNNGCNACNNNNNGAGNANNNGNNNNNANANGATNNNANANNNGATGCTCNTC
TGACGNNNATGNNNNNNTANANN

1492R

GNNNNNNGNGGNTCNTCTTCGACAGCTCCTTCCCACAAGGGGTAGGCCACCAGCTTCG
GGTGTTACCAACTTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC
CGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGAC
CCCAATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCA
TTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGGCATGATGATTTGAC
GTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCACCATCACGT
GCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGAACCAGCCCCGAAGGGAAAGACTATTTTC
TAGCCCGATCCGGTCCATGTCAAGCCTTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATC
CGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCG
TACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGACGCGGAAAACGTGGAATGTCCC
CCACATCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTC
CCCATGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTT
CCTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCTACAGACTC
TAGTCTGCCGTACCCACCGCAGATCCGGAGTTAAGCCCCGGAATTCACGGCAGACGCG
ACAAACCGCCTACGAGCTCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTA
TTACGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTNTCTGCNNTACCGTCACTTTGCTT
CTTCCCTACTGAAGAGNTTACACCCGAAGNNTCATCCCTCACGCGNGTCGCTGCATCAGC
TTTCGCCCATTGNGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGCGNGTTCTCAGT
CCANNGTNNNGNCACCCNCTCAGNNNTACCCGNNNNCGCCCTTGNNNNNNNTNCTNN
CNAANNNCCTGTATANNNGCNCGAANTTACTTNCTNTNAGCAAGANANNNNCTCTTCT
TCTNNNNNN

Contig

TGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCGACTCC
AGGATAAGCCCGGGAAGTGGGTCTAATACTGGATATTCAATTTCTACCGCATGGTGGTT
TTTGAAAGGATTCTGGTCGAGGAGGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAAT
GGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG
TAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA

GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
 CGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCTCCGGATCTGCGGTGG
 GTACGGGCAGACTAGAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCAGGTGAAATG
 CGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCT
 GAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAA
 CGTTGGGCACTAGATGTGGGGGACATTCCACGTTTTTCCGCGTCGTAGCTAACGCATTAAAG
 TGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATGGACCGGATCGGGCTAGAAATAGTCTTTCCCTTCGGGGCTGGTTCACAGGTGGTG
 CATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACC
 CTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACT
 CGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCAT
 GCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGC
 CGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
 CGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAG
 TCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCTGGTGGCC

BUK64c

27F

GNCNNNNGNNTNNGCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGAT
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC
 CGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGA
 CGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATG
 GCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
 GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTT
 AGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTGTCTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
 TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
 ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC
 ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
 TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT
 GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGAGACTGAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 CCCTTACCAAGTCTTGGACATCCTCTGACAACCCTAAGAGATAGGGCTTTTCCCTTTCCG
 GAACNAAGTGACGGGTGGTGCATGGTTGTCGTATCTCGTGTCTCAGAAANTGGTTTAA
 TCCCGCAACCATCCGCACCCTTGATCCTAGTTGCCAGCATTACGTAGGTCACTCTAAGT
 GACTGNCAGTGACAAGCGNGTANNANGTGNNGATGACGGGCAATGCATACTTGGCCCCCT
 NTGGATCTGANNTACNCACTNNNTNNNNNNNNNTNNNNNAGCTGANNAAACGCNTAGGC
 NNCCCNANNCCNAAGAGNNCGTNNANNNNGNNNNNTCGCNNN

1492R

NNNNANTTGNTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGGT
 TTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCG
 GCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAAACCTGCGA
 TCCGAACCTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTTGACGCCCTTTGTT
 CTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
 CCCACCTTCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCACCTTAAAGTGCCCAACTGAATGCTGGCA
 ACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTT
 GTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGCT
 CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTTCCTTTAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC
 AGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCATGAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTA
 GCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGTTT
 CGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTTCTCCACAT
 CTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCC

AGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGC
CTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGC
TGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGTGCGAGCAGTTACT
CTCGCACTTNNCTTCCCTAACAAACAGAGCTTNCGATCCGAAANNNATCANTCACGCGNN
TGCTCGATCAGACTTCGTTCATGCGANATCCTACTGCNGCTCCGTAGNNCNGACNGNCTNA
NTCAGTTGNNCNATCACCTTCANGTCNNNNNNNTCGTNNNNNNGANNNNNNACACTANCC
TATGCCNCCANNAGNNNNANCTN

Contig

GGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC
ACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAAA
CTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTTGACAGCCC
TTTGTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGAC
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAAAGTGCCCAACTGAATG
CTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCT
AGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCCTAA
CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCA
CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC
CACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCTCTCTCTTCTGCACTCAAGT
TTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAA
ACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGC
AGTACTCTCGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCT
ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT
CTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAAGTATCC
GGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTA
CTCACCCGTCCGCGCTAACATCCGGGA

BUK69b

27F

NNNCTTGCGCNGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGAGAGCTTGCTCTCTGATTTCAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAA
GGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCGC
TAATAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC
GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA
GTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
CCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTAATACTGAC
ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGGTCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAA
GTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTTG
ACATGCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGACACANTGCTGC
ATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAAGCAGCGCACCT
TGTGCTAGCTACAGCACGTNAGTGGGCACTCTNNNGAGACTGCGTGACAAACCGAGNAGT
GGNGATGANGTCAGTCATCATGGCCCTTNCGNNTGGGCTACCTACNNGCTACAANGGNC
CGANACAAAGGATGGCNNNNNNNNNGTGGANNTATTCCNNNGAACGCGAATNNANNTCC
GAGATAGCNNNCTCTGTANCATNNNNANACGTN

1492R

CNCNNNNANTCCTCCNTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAA
CCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTGAC
ATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATC
CGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACC
GACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCTTAACGTGCTGGTAA
CTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTACAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAA
GTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAATCCCC
AGGCGGTGCGACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGACCCCCAACGGCTAGT
CGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCG
CACCTCAGTGTCAGTATTAGCCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTATATC
TACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGCTCGCCAG
TTTTGGATGCAGTTCCCAGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACTTAACGAACCACCTA
CGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTTCCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGAAGTTAGCCCGGTGCTTATTCTGTCCGGTAACGTCAAANAGCAAGGTATTAG
CTTACTGCCCTTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGANNTCNNACACACGN
GNATGNTGNTCAGCTTCGCCATGTCANATCCCCACNGCTGCCTCCGNAGANTCTGACGN
NCNCAGTNCAGTGTGACTGATCATCCTCTTCAGAACANTTACGGATCGTCNCNNNGNN
NNNTTNACCNCCACNTANCNNAATTCCGCANNNNTAGGGCTCCNTNCTATNNN

Contig

AAGAGAGCTTGCTCTCTGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTA
TTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGGGAAA
GCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAGGTCGATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACAC
TGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC
ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAG
AATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTAAAGTTGGATGTGAAAGCC
CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGG
TGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACCACCTGGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTGGGGTCTTGAGATC
TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGC
CGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT

BUK632Y

27F

CGNGCGNNNNCTATACATGCAGTCGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTCAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACC GG G G GCTAATACCGGATAAYTCNTCCCCTCACATGAGGGGARGCTGAAAGATGGTT
TCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGG

AAGAACAAGTRCCGGAGTAACTGCCGGNACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTANATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAG
CAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCNAGGAATT
GANGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCTGAAGCAACGCGAANAACCT
TAC

1492R

CNNNNNTNTNACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAANGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTA
CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACGCGGC
ATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATC
CGAACTGAGAATGGTTTTATGGGATTTCGCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACC
ATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAAC
TAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACCTGTATCCTGTCCCCGAAGGGGAACGCCCTATCTCTAGGGTT
GTCAGGAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCT
CCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCC
AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTTGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTA
GCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTT
CGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACAT
CTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTTCTTCTGCACTCAAGTTCCCC
AGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGC
CTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGACACGCTTGCCACCTACGT

Contig

CTTGCTCCCTGATGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAANTCNTCCCCTCACATGAGG
GGANGCTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTNCCGGAGTAAGTACCGGNACCTTGACGGTAC
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAG
AAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGG
CGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
CGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACAACCTAGAGATAGG
GCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCTG
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAG
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA
TCATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTG
CGAGACCGCGAGGTAAAGCGAATCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA

Ek B. BUK İzolatlarının Benzerlik Gösterdikleri En yakın Türler

BUK1ax

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK1ax/NCBI%20BlastNucleotide%20SequenceBUK1ax%20(1351%20lette

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB513735.1	<i>Pseudomonas putida</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 1106	2495	2495	100%	0.0	100%
AB681215.1	<i>Pseudomonas putida</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100651	2495	2495	100%	0.0	100%
JF911376.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain ECAn8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
JN228332.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain 2D68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb JN679851.1 <i>Pseudomonas putida</i> strain 1576 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
JN228330.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain 2D61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
JF345177.1	<i>Pseudomonas</i> sp. PG5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
HM486417.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain SFA7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
JN253502.1	<i>Pseudomonas</i> sp. QR-101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
JN226401.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Ery-E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%
HM755492.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain C-LS-PYD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	100%

BUK2ax

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK2ax/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK2ax(1368%20lette

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB513735.1	<i>Pseudomonas putida</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 1106	2497	2497	100%	0.0	99%
AB681215.1	<i>Pseudomonas putida</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100651	2497	2497	100%	0.0	99%
JF911376.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain ECAn8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
JN228332.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain 2D68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb JN679851.1 <i>Pseudomonas putida</i> strain 1576 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
JN228330.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain 2D61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
JF345177.1	<i>Pseudomonas</i> sp. PG5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
HM486417.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain SFA7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
JN253502.1	<i>Pseudomonas</i> sp. QR-101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
JN226401.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Ery-E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%
HM755492.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain C-LS-PYD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2497	2497	100%	0.0	99%

BUK22a

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK22a/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK22a(1391%20letts ☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN874761.1	Bacillus sp. 13844 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
JF895478.1	Bacillus aryabhattai strain KU2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
FR746086.1	Bacillus sp. PG-2010-22 partial 16S rRNA gene, isolate 22	2569	2569	100%	0.0	100%
GU979225.1	Bacillus sp. RBB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
GU471206.1	Bacillus megaterium strain Q2BG4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
GQ199735.1	Bacillus sp. 210_33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
GQ199730.1	Bacillus sp. 210_28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
GQ199725.1	Bacillus sp. 210_23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
GQ149108.1	Bacillus sp. AY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EU835567.1	Bacillus sp. HHNB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EU835562.1	Bacillus sp. RKZ11264 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EU652859.1	Bacillus sp. ZY036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EU596422.1	Bacillus sp. W28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EF612725.1	Bacillus sp. TBM358 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EF612720.1	Bacillus sp. TBM352 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%
EF522798.1	Bacillus megaterium strain 095004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	100%	0.0	100%

BUK23c

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK23c/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK23c(1319%20letts ☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NR_043765.1	Zhihengliuella halotolerans strain YIM 70185 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ372937.1 Zhihengliuella halotolerans strain YIM 70185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2429	2429	100%	0.0	99%
FJ425902.1	Zhihengliuella sp. JSM 071043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2340	2340	100%	0.0	99%
JF937439.1	Zhihengliuella sp. H4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2316	2316	96%	0.0	99%
EU937748.1	Zhihengliuella sp. JG 03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2302	2302	100%	0.0	98%
GU968470.1	Zhihengliuella sp. RS236(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	100%	0.0	98%
GU968460.1	Zhihengliuella sp. RS111(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	100%	0.0	98%
GU968469.1	Zhihengliuella sp. RS234(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2292	2292	100%	0.0	98%
EU937749.1	Zhihengliuella sp. JG 05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	100%	0.0	98%
NR_044575.1	Zhihengliuella sp. YIM 90734 strain YIM 90734 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb EU847536.1 Zhihengliuella sp. YIM 90734 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2261	2261	100%	0.0	98%

BUK50a1

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK50a1/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK50a1(930%20let

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF274725.1	Pseudomonas sp. OK1_1_1b3_S5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JF274724.1	Pseudomonas sp. OK1_1_1b3_S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JF274723.1	Pseudomonas sp. OK1_1_1b3_S3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JF274722.1	Pseudomonas sp. OK1_1_1b3_S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JF274721.1	Pseudomonas sp. OK1_1_1b3_S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JQ088449.1	Uncultured bacterium clone B18-45-B04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
AB682251.1	Pseudomonas stutzeri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 105234	1701	1701	100%	0.0	99%
JN644606.1	Pseudomonas stutzeri strain HD5_4C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JN644528.1	Pseudomonas stutzeri strain M52_1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%
JN228290.1	Pseudomonas stutzeri strain B10v 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1701	1701	100%	0.0	99%

BUK50b

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK50b/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK50b(1388%20let

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF505980.1	Exiguobacterium mexicanum strain KNUC9046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
JF346672.1	Exiguobacterium sp. H1632 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
HQ425304.1	Exiguobacterium sp. M7-4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
HM489954.1	Exiguobacterium sp. 3-29(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
HM030747.1	Exiguobacterium aurantiacum strain M-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
EU439417.1	Exiguobacterium sp. DB-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
EU282458.1	Exiguobacterium sp. GIC31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	100%	0.0	100%
EF177690.1	Exiguobacterium sp. Y11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	100%	0.0	99%
FR714841.1	Exiguobacterium sp. PR 10.6 partial 16S rRNA gene, type strain PR 10.6T	2558	2558	100%	0.0	99%
FJ460165.1	Exiguobacterium aurantiacum strain YS-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	100%	0.0	99%

BUK64b

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK64b/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK64b(1342%20letter)☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NR_043765.1	Zhihengliuella halotolerans strain YIM 70185 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ372937.1 Zhihengliuella halotolerans strain YIM 70185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2479	2479	100%	0.0	100%
FJ425902.1	Zhihengliuella sp. JSM 071043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2388	2388	100%	0.0	99%
JF937439.1	Zhihengliuella sp. H4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2350	2350	95%	0.0	99%
GU968470.1	Zhihengliuella sp. RS236(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2340	2340	100%	0.0	98%
EU937748.1	Zhihengliuella sp. JG 03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2338	2338	99%	0.0	98%
GU968460.1	Zhihengliuella sp. RS111(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	99%	0.0	98%
GU968469.1	Zhihengliuella sp. RS234(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2327	2327	99%	0.0	98%
NR_044575.1	Zhihengliuella sp. YIM 90734 strain YIM 90734 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb EU847536.1 Zhihengliuella sp. YIM 90734 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2303	2303	100%	0.0	98%
EU937749.1	Zhihengliuella sp. JG 05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2300	2300	99%	0.0	98%

BUK64c

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK64c/NCBI%20BlastNucleotide%20SequenceBUK64c(1352%20letters).h ☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN092616.1	Bacillus safensis strain FFL31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2492	2492	100%	0.0	99%
HQ143628.1	Bacillus pumilus strain TZQ12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2492	2492	100%	0.0	99%
JN897280.1	Bacillus sp. KC6(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN187385.1	Uncultured Bacillus sp. clone T22F7d4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN187364.1	Bacillus pumilus strain VIT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN628984.1	Bacillus pumilus strain NNN444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN660066.1	Bacillus sp. MIB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN642680.1	Bacillus pumilus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN604049.1	Bacillus pumilus strain FGJ424 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN578480.1	Bacillus sp. MX47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
HQ696405.1	Bacillus safensis strain KTT-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%
JN210577.1	Bacillus sp. AU_SR14_M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	100%	0.0	99%

BUK69b

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK69b/NCBI%20BlastNucleotide%20SequenceBUK69b(1366%20letters).f ☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ588844.1	<i>Pseudomonas</i> sp. BZ55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2507	2507	100%	0.0	99%
AY570696.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Da2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2507	2507	100%	0.0	99%
DQ192039.1	<i>Pseudomonas</i> sp. I91-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%
AY570597.1	Uncultured bacterium clone PL-10B8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%
AJ270451.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial 16S rRNA gene, strain 24a13	2501	2501	100%	0.0	99%
GQ407271.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain MZQ-JX02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	99%
EU275358.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain CONC12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	99%
EU187488.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain W-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	99%
AF411854.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	99%
AY570580.1	Uncultured bacterium clone PL-10B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	99%
U25431.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2495	2495	100%	0.0	99%

BUK632Y

file:///F:/IZOLAT%2016S%20Son%20hal/BUK/BUK632Y/NCBI%20BlastNucleotide%20Sequence%20BUK632Y(1354%20k ☆

Legend for links to other resources: ☐ UniGene ☐ GEO ☐ Gene ☒ Structure ☐ Map Viewer ☐ PubChem BioAssay
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN392015.1	<i>Bacillus firmus</i> strain KC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2483	2483	100%	0.0	99%
AB562921.1	<i>Bacillus</i> sp. NCCP-133 gene for 16S rRNA, partial sequence	2477	2477	100%	0.0	99%
JQ237664.1	<i>Bacillus</i> sp. Hswx5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2466	2466	100%	0.0	99%
JN411318.1	<i>Bacillus firmus</i> strain IARI-BK-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
JN975469.1	<i>Bacillus</i> sp. ABR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
JF496277.1	<i>Bacillus firmus</i> strain XA4-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
FR823403.1	<i>Bacillus</i> sp. ITCr14 partial 16S rRNA gene, isolate ITCr14	2460	2460	100%	0.0	99%
HQ331105.1	<i>Bacillus</i> sp. HJB006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
HQ285922.1	>gb JN098692.1 Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone KMNC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
HQ234339.1	<i>Bacillus firmus</i> strain PAN MC15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
GU397391.1	<i>Bacillus firmus</i> strain AK39423 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
EU867373.1	<i>Bacillus firmus</i> strain D8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%
EU867373.1	<i>Bacillus firmus</i> strain CCGE2246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	100%	0.0	99%

[illegible]

Ek D. SDS-PAGE Solüsyonları

STACKING ve RESOLVING GEL

	RESOLVING GEL	STACKING GEL
Buffer	7,05 ml	1,25ml
Acry	5,625ml	0,5ml
%10 APS	375µl	125µl
%10 SDS	187,5µl	50µl
Temed	7,875µl	2,5µl
dH ₂ O	5,5125ml	3,1ml

STACKING ve RESOLVING BUFFER

STACKING ve RESOLVING BUFFER (1lt)		
1M	121,4gr Tris	
0,5M	60,57gr Tris (stacking jel buffer için)	pH:6,84
1,5M	181,71gr Tris (resolving jel buffer için)	pH:8,83

*1lt'ye tamamlanır.

%40 Acrylamide: Bis Solution (29:1)

Acrylamide	29gr
N,N'-methylenebisacrylamide	1gr
dH ₂ O	75ml (final volume)

*37⁰C'de ısıtılabilir (kimyasalları çözmek için)

*solusyon 0,45µm-membran filtreden geçirilir.

*pH:7.0

%10 APS

1gr Amonium persulfate 10ml dH₂O içinde çözülür.

10X Running Buffer

Trismabase	30,2gr
Glycine	144gr
SDS	10gr
H ₂ O	1000ml
pH	8,3

6X SDS Loading Buffer

Stok konsantrasyonları	Solusyon için hedef konsantrasyon
0,5M Tris:HCl pH:6,8	80mM Tris:HCl pH:6,8
%20 SDS	%6 SDS
%100 β-mercaptoethanol	%5 β-mercaptoethanol
%87 Glycerol	%15 Glycerol
	dH ₂ O
	bramphenol blue

Destaining Solüsyonu

Asetik asit	metanol	dH ₂ O
10ml	25ml	65ml

*100ml için

Coomassie staining

Coomasie Brilliant blue R_250	2,5gr
Glacial Acetic acid	100ml
Methanol	500ml
H ₂ O	400ml
	total volume =1000ml

Fixing Solüsyonu

%5 Asetik asit

Ek E. Besiyerleri

Trypton Soya Broth (TSB)

65 gr/L Triple sugar iron agar, 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda 5 ml kapaklı tüplere paylaştırılmıştır.

Trypton Soya Agar (TSA)

30 gr/L Trypton soya agar, 1 litre distile suda çözüldükten sonra, pH 7.6' ya ayarlanmıştır ve 121 °C'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür.

1/10 TSB Zengin Besiyeri

Solution A

2,9 gr Na₂HPO₄.2H₂O

2,3 gr KH₂PO₄.2H₂O

1 gr NH₄Cl

0,5 gr MgSO₄.7H₂O

9,275 gr borik asit (150 mM)

Solution B

3 gr TSB

0,5 gr yeast extract

0,5 gr Na-pyruvat

15 gr Agar

1 Litre distile su

* Distile su içerisine maddeler yukarıdaki sırayla eklenmelidir.

* Solution B eklemeyen önce Ph ölçülmeli ve ph=7,2+-0,2 arasında olmalıdır.

* En son agar eklenmelidir.

MSM Zengin Besiyeri

Glukoz	2gr
Casein hydrolysate	1,5gr
KH ₂ PO ₄	1gr
MnSO ₄	10mg
NaCl	0,5gr
Yeast ext.	3gr

*1lt dH₂O ile tamamlanır.

*Broth besiyeridir. 15gr agar ilavesi ile katı besiyeri elde edilir (1lt için).

Ek F. Solüsyonlar

Pbs buffer

NaCl	8gr
KCl	0,2gr
Na ₂ HPO ₄	1,15gr
KH ₂ PO ₄	0,2gr

1M Tris: HCl (pH: 8)

12,1 gr Tris base (MW:121,14) → 100ml dH₂O içine eklenir.

0,5M EDTA (pH: 8)

186,1gr Na₂ EDTA.800ml H₂O

*pH: 8'e getirilir (NaOH ile)

TE Buffer

1M Tris: HCl	500µl	pH: 8
0,5M EDTA	10µl	pH: 8

*total hacim: 50ml dH₂O

Lysozym preparasyonu

0,1gr lysozym 10ml dH₂O içerisinde çözülür (10mg/ml).

2ml Pbs'li pelletlere 200µl 10mg/ml lysozym eklenir.

TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer

50X TAE Buffer

121 g Tris ve 50mL 0.5M EDTA pH 8.0 saf su içerisinde çözülüp ve 28.6mL asetik asid eklenerek pH 8 e ayarlanmıştır. Son hacim 500 ml ye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir.

1XTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi

0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözülüp ve pH 8 e ayarlanmıştır . Son hacim 200 ml ye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir.

%10 luk SDS çözeltisi

10 g SDS nin 100 ml saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildi ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi

80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözümüştür. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Toplam hacim 100 ml ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Fenol: kloroform: izoamilalkol çözeltisi

25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. -20°C de muhafaza edilmiştir.

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi

24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. -20°C de muhafaza edilmiştir.

%70 lik Etil alkol

70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml ye tamamlanmıştır. -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Proteinaz K

1 ml steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlanmıştır. -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Bovine serum albumin

1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanmıştır. -20°C de muhafaza edilmiştir.

Fenol preparasyonu

1. Fenol oda sıcaklığına getirilir ve 68 °C’de eritilir.
2. Eşit miktarda tampon (0,5M Tris:Cl , pH:8) eritilen fenole eklenir ve 15dk. karıştırılır.
3. 2 faz ayrıldığında sulu kısım (üst faz) ayırıcı şişe ile ayrılır.

4. Eşit miktarda tampon fenole eklenir ve tekrar 15 dk. Karıştırılır (üst faz uzaklaştırılır).
5. Ekstraksiyon fenolun pH'ı 7,8'e ulaşınca kadar devam edilir. Fenolun pH'ı pH kağıdı ile ölçülür.
6. Dengeye ulaşan fenol küçük miktarda bölünür ve 100mM Tris:Cl (pH:8) altında -20 °C'de saklanır.
7. İhtiyaç duyulduğunda fenol oda sıcaklığında eritilir. Hydroxyquinoline ve β -merkapttoethanol son konsantrasyon sırasıyla %0,1 ve %0,2 eklenir. Fenol solusyona bu şekilde +4 °C'de saklanır.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad : Ramazan KARAKAYA
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 14.05.1986- Kdz. EREĞLİ
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 05303729876
E-posta : karakayaramazan67@gmail.com

EĞİTİM

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Kdz. Ereğli Lisesi (Y.D.A)	2004
Lisans	Muğla Ünivesitesi	2009
Yüksek Lisans	Muğla Üniversitesi	2012

YABANCI DİL(LER)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	

BİLİMSEL FAALİYETLER

1. Borik Asidin Bazı Standart ve Klinik Kaynaklardan İzole Edilen Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Etkisi; Arslantürk, N. Şahin, H. Güneş, A.Tanrıseven, **R. Karakaya**, B. Çöl, XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Bodrum/Muğla, 2008
2. “Bor Toleransı Yüksek Bazı Bakterilerin Bazı Enzim İçeriklerinin Tespiti”, B. Çöl, N. Akgüç, H. Güneş, **R. Karakaya**, N. Şahin, A. Arslantürk;; 4. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir, 2009
- 3.Bazı Mikroorganizmaların Bor Toleranslarının Belirlenmesi B. Çöl, **R. Karakaya**, N. Akgüç, H. Güneş, N. Şahin, A. Arslantürk, Denizli 2010
4. Eskişehir Kırka Bor Madeni Ve Çevresinden Elde Edilen Toprak, Maden Ve Su Örneklerindeki Bor Miktarlarının Azomethın H Yöntemi İle Tespit Edilmesi B. Çöl, N. Akgüç, **R. Karakaya**, A. Tanrıseven, H. Güneş, Denizli 2010