

**BALIKESİR ve KÜTAHYA BÖLGESİNDEKİ
BAZI TERMAL KAYNAKLARIN
PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Emine ÇELİKOĞLU
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos 2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:1403F100**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine Çelikoğlu'nun “Balıkesir ve Kütahya Bölgesindeki Bazı Termal Kaynakların Prokaryotik Çeşitliliğinin İncelenmesi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 04.08.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ	
Üye	Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ	
Üye	Yrd.Doç.Dr. İsmail POYRAZ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Emine ÇELİKOĞLU

BALIKESİR ve KÜTAHYA BÖLGESİNDEKİ BAZI TERMAL KAYNAKLARIN PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN İNCELENMESİ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ
2015, 122 sayfa

Bu çalışmada Balıkesir-Sındırgı, Güre, Havran ve Kütahya-Eynal termal kaynaklarının prokaryotik çeşitliliği kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler ile araştırılmıştır. İnkübasyon sonucunda izole edilen 66 izolat için 16S rRNA bölgesi spesifik primerler ile çoğaltmış ve amplifikasyon ürünleri *MboI* restriksiyon enzimi ile kesilerek ARDRA işlemi uygulanmıştır ve dizi analizi sonucunda *Geobacillus*, *Bacillus*, *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Chelatococcus* ve *Aneurinibacillus* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. Ayrıca farklı ARDRA profiline sahip izolatlardan bazılarında FAME analizi uygulanmıştır.

Kültür bağımsız yöntemler kapsamında 16S klon kütüphanesi oluşturulmuş ve FISH çalışması yapılmıştır. Klonlama çalışması sonucunda 20 farklı ARDRA profile elde edilmiştir ve dizi analizinden sonra *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Meiothermus*, *Roseomonas*, *Aneurinibacillus* ve *Brevibacillus* cinslerine ait klonlar elde edilmiştir. FISH çalışması sonucunda Bakteria domaini üyelerinden sinyaller alınırken Arkea sinyali alınamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Balıkesir, Kütahya, termofilik, ARDRA, FAME, klonlama, FISH

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION of PROKARYOTIC DIVERSITY of SOME THERMAL SPRINGS in BALIKESIR and KUTAHYA DISTRICT

Emine ÇELİKOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ
2015, 122 pages

In this study, prokaryotic diversity of Balıkesir-Sındırgı, Gure, Havran and Kütahya-Eynal thermal sources were investigated by culture-dependent and culture independent methods. After the incubation 66 strains were isolated and 16S rRNA amplified with specific primers and then ARDRA analysis of amplification products were performed by cutting with the restriction enzyme *Mbo* I. Result of sequencing, isolates which belong to the genus of the *Geobacillus*, *Bacillus*, *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Chelatococcus* and *Aneurinibacillus* were obtained. In addition, the FAME analysis was applied to the some isolates having different ARDRA profiles.

16S clone library was created within the scope of culture-independent methods and FISH studies were conducted. As a result of cloning research, we have obtained 20 different ARDRA profile and after sequencing clones belonging to the genus *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Meiothermus*, *Roseomonas*, *Aneurinibacillus* and *Brevibacillus* were obtained. As a result of FISH study, members of the domain Bacteria signals have been received, but members of the domain Archaea signals have not received.

Keywords: Balıkesir, Kütahya, thermophilic, ARDRA, FAME, cloning, FISH

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, Danışman Hocam Sayın Doç.Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ'a

Çalışmalarım süresince desteğini, değerli fikirlerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ, Prof.Dr. Kıymet GÜVEN, Doç.Dr. Mehmet Burçin MUTLU, Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ ve Doç.Dr. Rasime DEMİREL'e

Tez çalışmam süresince destekleriyle, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Arş.Gör. Nilgün POYRAZ, Uzm. Erdoğan ÇAKIR, Tekn. Mustafa KARAKAŞ ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşim Umut ÇELİKOĞLU'na, annem, babam ve kardeşime

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Emine ÇELİKOĞLU

Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Termofiller.....	3
1.1.1. Termofilik Gram (+) bakteriler	4
1.1.2. Termofilik Gram (-) bakteriler	5
1.1.3. Hipertermofilik bakteriler	7
1.2. Hipertermofilik Arkea	8
1.2.1. Crenarchaeota	8
1.2.2. Euryarchaeota.....	9
1.2.3. Nanoarchaeota.....	10
1.2.4. Anaerobik hipertermofilik Archaea	11
1.3. Yüksek Sıcaklık Değerlerine Adaptasyon.....	12
1.3.1. Nükleik asitlerin adaptif stabilizasyon mekanizması.....	12
1.3.2. Proteinlerin stabilizasyonu	13
1.3.3. Lipidlerin ve membranların stabilitesi	14
1.4. Termofillerin Biyoteknolojik Önemi.....	15
1.4.1. Termofilik ve hipertermofilik enzimler	16
1.4.2. Moleküler biyoloji uygulamalarında termofilik ve hipertermofilik enzimler.....	17
1.4.3. Endüstride termofilik ve hipertermofilik enzimler	18

1.4.3. Diğer biyoteknolojik ürünler.....	20
1.5. Termofilik Habitatlar.....	21
1.5.1. Jeotermal habitatlar.....	22
1.5.2. Diğer termal habitatlar.....	22
1.6. Balıkesir (Sındırgı, Güre, Havran) Jeotermal Yapısı.....	23
1.7. Kütahya (Eynal-Simav) Jeotermal Yapısı.....	24
1.8. Ribozomal RNA.....	25
1.9. Mikrobiyal Kommünite Analizleri.....	26
1.9.1.16S rDNA klon kütüphanesi.....	28
1.9.2. Flourescence In Situ Hybridization.....	29
1.9.3. Mikrobiyal lipid analizi.....	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Materyal.....	32
2.1.1. Çalışmada kullanılan termal su örnekleri.....	32
2.1.2. Kullanılan besiyerleri.....	33
2.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	34
2.2. Yöntem.....	42
2.2.1. Termal su örneklerinin alınması.....	42
2.2.2. Termal su örneklerinin kimyasal analizi.....	42
2.2.3. Termal su örneklerinden termofilik bakteri ve arkeaların izolasyonu	42
2.2.4. İzolatların identifikasyonu.....	42
2.2.5. Komünite analizleri.....	46
3. BULGULAR	53
3.1. Termal Su Örneklerinin Kimyasal Analizi.....	53
3.2. Termal Su Örneklerinden Termofilik Bakteri ve Arkea İzolasyonu.....	54
3.3. İzolatların İdentifikasyonu.....	56

3.3.1. Mikroskopik inceleme	56
3.3.2. Moleküler identifikasyon	58
3.4. Kommunité Analizleri	83
3.4.1. Termal su örneklerinden DNA izolasyonu	83
3.4.2. 16S rRNA geninin klonlanması	83
3.5. Flourescent In Situ Hibridisation (FISH)	92
4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 16S rRNA ‘ya dayalı hayat ağacında termofiller ve hipertermofiller	3
Şekil 1.2. Anaerobik hipertermofilik arkea üyelerinin 16S rRNA’ya dayalı filogenetik ağaçtaki yeri.....	11
Şekil 1.3. Türkiye 500 m yeraltı sıcaklık haritası	21
Şekil 1.4. Türkiye 1000 m yeraltı sıcaklık haritası	22
Şekil 1.5. Balıkesir- Sındırgı jeotermal bölgesi	23
Şekil 1.6. Kütahya Simav-Eynal jeotermal bölgesi	24
Şekil 1.7. Yaşamın üç domaini	26
Şekil 1.8. Kültür bağımsız moleküler metodlar	27
Şekil 1.9. Klonlama akış şeması	28
Şekil 1.10. FISH akış şeması	30
Şekil 1.11. FAME analiz basamakları	31
Şekil 2.1. A ve B- Balıkesir-Sındırgı kaplıcaları örnekleme alanı	32
Şekil 2.2 A- Balıkesir-Güre kaplıcaları örnekleme alanı B- Eynal kaplıcaları örnekleme alanı.	32
Şekil 2.3. Lambda DNA/ <i>HindIII</i> markır	40
Şekil 2.4. pBR322/ <i>Alu I</i> markır	41
Şekil 2.5. pDrive vektör restriksiyon kesim bölgeleri ve direnç genleri	48
Şekil 3.1. Bazı izolatlara ait petri görüntüleri	55
Şekil 3.2. İzolatların Gram boyama reaksiyonları	56
Şekil 3.3. Sındırgı birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA’nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	59
Şekil 3.4. Eynal birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA’nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	59
Şekil 3.5. Güre birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA’nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	60
Şekil 3.6. Havran 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	60
Şekil 3.7. Sındırgı ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA’nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	61

Şekil 3.8. Eynal ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	61
Şekil 3.9. Güre ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü	62
Şekil 3.10. Sındırgı ve Eynal birinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait <i>Mbo</i> I ARDRA görüntüsü	63
Şekil 3.11. Güre birinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait <i>Mbo</i> I ARDRA görüntüsü	64
Şekil 3.12. Havran <i>Mbo</i> I ARDRA görüntüsü	64
Şekil 3.13. Sındırgı ve Güre ikinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait <i>Mbo</i> I ARDRA görüntüsü	65
Şekil 3.14. Eynal ikinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait <i>Mbo</i> I ARDRA görüntüsü	65
Şekil 3.15. Sındırgı bölgesinden izole edilen izolatlara ait % dağılımı	73
Şekil 3.16. Eynal bölgesinden izole edilen izolatlara ait % dağılımı	74
Şekil 3.17. Güre bölgesinden izole edilen izolatlara ait % dağılımı	75
Şekil 3.18. Havran bölgesinden izole edilen izolatlara ait % dağılımı	76
Şekil 3.19. Klonlara ait bazı petri fotoğrafları	85
Şekil 3.20. Sındırgı klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile ARDRA profilleri	85
Şekil 3.21. Eynal klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile ARDRA profilleri	86
Şekil 3.22. Güre klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile ARDRA profilleri	86
Şekil 3.23. Havran klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile ARDRA profilleri	86
Şekil 3.24. Sındırgı Eub338 probu FISH fotoğrafı	93
Şekil 3.25. Sındırgı DAPI fotoğrafı	93
Şekil 3.26. Eynal Eub338 probu FISH fotoğrafı	94
Şekil 3.27. Eynal DAPI fotoğrafı	94
Şekil 3.28. Güre Eub338 probu FISH fotoğrafı	95
Şekil 3.29. Güre DAPI fotoğrafı	95

Şekil 3.30. Havran Eub338 FISH fotoğrafı	96
Şekil 3.31. Havran DAPI fotoğrafı	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ekstremofil mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları	16
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer ve proplar	39
Çizelge 3.1. Termal su örneklerinin pH değerleri ve kimyasal analiz sonuçları ...	53
Çizelge 3.2. İzolatların Gram reaksiyonu ve morfolojisi.....	57
Çizelge 3.3. İzolatlara ait ARDRA grup profilleri	67
Çizelge 3.4. ARDRA grup numaralarına göre 907R/1492R primerleri ile sekans analiz sonuçları.....	69
Çizelge 3.5. Sındırgı bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları	77
Çizelge 3.6. Eynal bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları	78
Çizelge 3.7. Güre bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları.....	80
Çizelge 3.8. Havran bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları.....	82
Çizelge 3.9. Klonlara ait ARDRA profil numaraları	87
Çizelge 3.10. Klonlara ait ARDRA profillerinin sekans analiz sonuçları	89
Çizelge 3.11. DAPI sayım sonuçları.....	97

1.GİRİŞ

Yüksek radyasyon, aşırı tuzluluk, yüksek veya düşük pH ve sıcaklık değerleri gibi ekstrem ortamlarda yaşayabilen mikroorganizmalar ekstremofilik mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Sıcaklık birçok makromolekülün denatürasyonuna neden olan en önemli faktördür ve sıcaklık isteklerine göre mikroorganizmalar psikrofiller, mezofiller, termofiller ve hipertermofiller olmak üzere 4 ana gruba ayrılmaktadır. 50 °C üzerinde sıcaklıklarda yaşayan termofil mikroorganizmalar sahip oldukları yüksek GC oranı, ters giraz, DNA tamir mekanizmaları, ısı şok proteinleri, disülfid köprüleri, aminoasit kompozisyonu, artmış hidrojen bağları gibi mekanizmalarla yüksek sıcaklıkta protein ve DNA denatürasyonunu engelledikleri düşünülmektedir (Hyeung ve ark. 2002; Haki ve Rakshit, 2003).

Yer kabuğunun mağma tabakasına yakın bulunan yer altı sularının ısınmasıyla oluşan ve fay hatları üzerinde dağılım gösteren sular sıcak su kaynakları olarak adlandırılır. Türkiye sıcak su kaynakları bakımından zengindir. Türkiyede resmi kayıtlara alınmış 277 adet jeotermal saha bulunmaktadır (Akkaya ve Kıvanç, 2009; Korkmaz Başel ve ark. 2008) ve bu kaynaklar termal ısınma, elektrik enerjisi ve tuz eldesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklara direnç gösterebilen enzim özelliklerinden dolayı büyük önem taşımaktadırlar. Bu nedenle de termal kaynakların mikrobiyal özelliklerinin ortaya konması endüstriyel ve ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Sert koşullarda aktif enzimlerin endüstride uygulanması son yıllarda artmıştır. Bu durum ekstrem mikroorganizmalarda yeni enzimlerin keşfi için çalışmaları hızlandırmıştır. Yeni ekstremofilik mikroorganizmalar ve enzimlerin keşfi biyokataliz alanında büyük etkiye sahiptir. Termofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan izole edilen amilaz, ksilenaz, proteaz ve DNA polimeraz gibi enzimler endüstriyel alanlarda ve genetik mühendisliği çalışmalarında son derece önemlidir (Demirjian ve ark. 2001).

Bu çalışmada Balıkesir-Sındırgı, Güre, Havran ve Kütahya-Eynal termal kaynaklarının prokaryotik çeşitliliği araştırılmıştır. Kültür bağımlı çalışmalar kapsamında termal su örneklerinden saf kültür izolasyonu yapılmıştır. İzolatların

genomik DNA sı ekstrakte edilerek 16S rRNA bölgesi spesifik primerler ile çoğaltılmıştır. 16S rRNA PZR ürüne ARDRA işlemi uygulanmış ve farklı profiller için dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Farklı ARDRA profiline sahip izolatların yağ asidi metil esterleri analizi yapılmıştır. Çalışmamızda ayrıca kültür bağımsız yöntemlerden 16S klon kütüphanesi ve FISH yöntemleri de kullanılmıştır. Bu çalışmada kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler birlikte kullanılarak Balıkesir-Sındırgı, Güre, Havran ve Kütahya-Eynal termal kaynaklarının prokaryotik çeşitliliğinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Termofilik bakteriler çok yüksek sıcaklıklara adapte olamamışlardır. Termofilik bakteri üyelerinin çoğu 75 °C altında yaşarlar sadece Thermotoga cinsi 80 °C 'de yaşayabilir. Demir amonyak okside eden termofilik bakteriler ise 60 °C 'nin altında yaşarlar.

1.1.1. Termofilik Gram (+) bakteriler

Bacillus stearothermophilus

Basil morfolojisinde, gram (+), spor oluşturan, hareketli, aerobik, katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteridir. Toprak, sıcak sular, okyanus sedimentleri ve bozulmuş yiyecek ürünlerinde yaygın olarak bulunur. 30-75 °C aralığında gelişebilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 55 °C dir (Zeigler, 2001).

Bacillus thermoleovorans

60 °C de yaşayan n-alkan ve diğer hidrokarbonları kullanabilme yeteneğinde olan termofilik bir bakteridir. 1987 yılında balçık çamurundan izole edilmiştir (Zarilla ve Perry, 1987).

Bacillus thermoglucosidasius

Termofilik gram pozitif, fakültatif aerobik bakteridir. İlk olarak 1983 yılında Japonya'da izole edilmiştir. Strainleri 37-68 °C sıcaklıklarında gelişebilme yeteneğindedir. Anaerobik koşullarda ait fermentasyonu ile laktat, süksinat, format, etanol, asetat ve karbondioksit oluşturabilmektedirler (Suzuki ve ark. 1983).

B. pallidus

Scholz ve ark. (1987) maya fabrikasının atıklarının karıştığı lağım suyundan gram (+), basil morfolojisinde, flagellaya sahip, spor oluşturan, 50-60 °C de gelişebilen termofilik aerobik 9 izolat elde etmişler. DNA homolojileri ve isoprenoid kompozisyonu değerlendirildiğinde bu izolatların hepsinin aynı *Bacillus* cinsine ait yeni tür olarak adlandırmışlardır. İzolatların G+C oranı 42.3 mol olarak bildirilmiştir.

B. thermocloaceae

B. pallidus ile %49 DNA homolojisi sahiptir ancak glukoz, fruktoz, sukroz, maltoz, %7 tuz konsantrasyonuna reaksiyonu acısından farklılık göstermektedir. İlk kez 1989 yılında lağım suyundan izole edilmiştir (Demharter ve Hensel, 1989).

B. kaustophilus

1928 yılında pastörize süttten izole edilmiştir. Spor oluşturan, kazein, nişasta ve jelatini hidrolize edebilen gram (+) bakteridir. 37 °C de 2-3 hafta gibi uzun bir sürede gelişebilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 65 °C dir. Nitrat ve nitrojeni indirgeyebilmektedir (Priest ve ark. 1989).

B. thermocatenulatus

Yeşil koloni oluşturan, nitrati indirgeyebilen, fakültatif anaerobik bakteridir. G+C oranı %69 dur (Golovachev ve ark. 1965).

1.1.2.Termofilik Gram (-) bakteriler

Thermus cinsi

Gram (-), çubuk şekilli, filamentli, hareketsiz, endospor oluşturmayan, 50-70 °C de optimum gelişim gösteren bakterilerdir. Bazı strainleri pigment üretmektedir. Aerobik ve zorunlu heterotrofturlar. Düşük organik substrat konsantrasyonunda gelişirler. Birçok strain asetat, piruvat, prolin, gliserol ve glutamati hidrolize edebilirken kırmızı pigment üreten strainler asetat ve piruvat varlığında gelişemezler. Monosakkaritler tek karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır ancak pentozlar hiçbir şekilde kullanılamaz. Birçok izolat kazein, elastin ve fibrin gibi proteinleri hidrolize edebilir (Kristjansson, 1992).

Thermus aquaticus

Çubuk şeklinde 0.5-0.8 µm çaplı, kısa filamentli, parlak sarı koloniler oluşturan bakteridir (Da Costa ve ark. 2006). İlk olarak 1969 yılında Yellowstone Ulusal Parkından izole edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 50-80 °C dir. Sahip

olduğu enzimler moleküler biyoloji çalışmalarında önemli yer tutmaktadır (Brock ve Freeze, 1969).

Thermus ruber

Kırmızı pigmenti ve düşük optimum gelişme sıcaklığıyla diğerlerinden kolaylıkla ayrılır. Optimum gelişme sıcaklığı 60 °C dir. Fruktoz, maltoz, mannoz ve sükrozu karbon kaynağı olarak kullanırlar (Sharp ve Williams, 1988).

Thermus filiformis

Stabil filamentli ve ekstra dış hüre duvarı tabakasına sahip olmasıyla diğer sarı pigmentli strainlerden ayrılmaktadır (Kristjansson, 1992).

Thermus thermophilus

Sarı pigmentli, kısa filamentli, çubuk şeklinde bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklığı 65 °C dir. İlk olarak 1974 yılında Japonyada izole edilmiştir. Genetik manipölasyon çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır. Organik materyallerin degradasyonunda önemli rol oynamaktadır (Oshima ve Imahori, 1974; Beffa ve ark. 1996).

Meiothermus cinsi

Daha önceleri Thermus cinsinin altında yer almış ancak düşük optimum gelişme sıcaklığına sahip olması nedeniyle 1996 yılında yeniden sınıflandırılmıştır. Hücreler 0.5-0.8 µm çapında genellikle kısa filamentli, gram(-) basillerdir. Koloni rengi sahip olduğu pigmente göre kırmızıdan sarıya değişmektedir (Nobre ve ark. 1996; Raulio ve ark. 2008).

Meiothermus ruber

Gram(-), hareketsiz, kırmızı pigmentli bir mezotermofildir. 1975 yılında Kamckhatka'dan izole edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 60 °C dir. (Da costa ve ark. 2006; Tindall ve ark. 2010).

Meiothermus silvanus

Aerobik, hareketsiz, gram (-) bir bakteridir. 0.5-1.2 µm çapında turuncu-kırmızı pigmentli koloniler oluşturur. Optimum gelişme pH sı 8-8.5 dir. Optimum gelişme sıcaklığı 55-60 °C dir. Renkli biofilm üretebilme yeteneğinden dolayı ekonomik öneme sahiptir. (Sikorski ve ark. 2010).

Meiothermus cerberus

Iceland Geysir jeotermal alanından Chun ve ark tarafından 1997 yılında izole edilmiştir. Kırmızı- turuncu pigmentlere sahiptir. Optimum gelişme sıcaklığı 55 °C dir. Diğer Meiothermus cinlerine göre daha fazla 3-OH yağ asidi seviyesine sahiptir. Gelişimi için sitein, tiyosülfat veya tiyoglikolat'a ihtiyaç duymaktadır (Chung ve ark. 1997).

Meiothermus timidus

Azores ve Central Portugal'dan izole edilmiştir. Sarı pigmente sahip koloniler oluşturur. Optimum gelişme sıcaklığı 55 °C dir. Yağ asidi kompozisyonuyla diğer Meiothermus cinslerinden ayrılır (Pires ve ark. 2005).

Meiothermus chliarophilus

Vizela sıcak su kaynağından izole edilmiştir. Yeşil pigmentli, katalaz negatif bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklığı 50 °C dir (Tenreiro ve ark. 1995).

Meiothermus taiwanensis

Taiwan Wu-rai sıcak su kaynağından izole edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 55-60 °C dir. Aerobik, termofilik, spor oluşturmayan, kırmızı pigmentli bakterilerdir (Chen ve ark. 2002).

1.1.3. Hipertermofilik bakteriler

Thermotogales

Filogenetik ağaçtaki yerine bakıldığında bakterilerin atası olarak eşsiz bir yer tutmaktadır. *Thermotoga maritima* gram (-), basil şeklinde ve anaerobik

bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 80 °C dir. Hücrenin etrafında “toga” adı verilen kapsül benzeri bir kılıf vardır. Hücre duvarında mürein bulunduğu için lizozime hassastır. Thermotogales üyeleri eşsiz eter lipidlerine sahiptir (Huang ve Ito; 1998).

Aquificales

Çubuk şeklinde 2-6 µm uzunluğunda bir bakteridir. Spor oluşturmayan gram (-) bir bakteridir. Yaklaşık 100 kadar hücrenin bir araya gelmesiyle oluşan agregatlar halinde bulunurlar. 85-95 °C de optimum gelişme gösterir. Oksijenli ortamda yaşar. *Aquifex aeolicus* genomunun %16 sı Archaea genomuyla benzerlik göstermektedir (Huber ve ark. 1998, Guiral ve ark. 2012).

1.2. Hipertermofilik Arkea

1.2.1. Crenarchaeota

Sulfolobales

Crenarchaeota'nın diğer üyeleri arasında morfolojik, fizyolojik ve moleküler olarak en iyi tanımlanmış üyesidir. Hücreler 1-5 µm çaplı düzenli düzensiz kok şeklindedir. Bütün üyeleri ekstrem termofil ya da hipertermofildir. Optimum gelişme sıcaklığı 65-90°C civarındadır. pH 2 civarında optimum büyüme gösterir. Aerobik, fakültatif aerobik veya anaerobik olarak yaşayabilmektedirler. Yüksek sıcaklığa sahip, yüksek asitli, solfatarlardan izole edilebilirler (Huber ve Prangisvilli. 2006). *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus* ve *Sulfolobus* cinsleri bu takımda yer almaktadır.

Thermoprotales

Crenarchaeota içerisinde yer alan çubuk şekilli aerobik ya da anaerobik ortamlarda yaşayan hipertermofil ya da ekstrem termofil mikroorganizmalardır. Thermoprotales üyeleri volkanik habitatlarda 100°C ve üzeri sıcaklıklarda yaşamaktadırlar. Optimum büyüme sıcaklığı 75-100°C dir. Sulardan, sıcak sulardan, solfatarlardan, düşük tuz yoğunluklu ortamlardan, asidikten nötral

pH'ya birçok ortamdan izole edilebilmektedirler. *Thermoproteus*, *Pyrobaculum* ve *Thermofilum* önemli cinsleridir (Huber ve Prangisvilli, 2006).

Desulfurococcales

Crenarchaeotanın diğer üyesidir. Kok veya disk şeklindeki hücrelerin etrafı ultra flat area ile çevrilidir. Deniz altındaki volkanik habitatlarda yaşamaktadırlar. Üyelerinin hepsi hipertermofildir ve optimum büyüme sıcaklığı 85-106°C dir. Aerob, anaerob ve fakültatif aerob olarak yaşayabilmektedirler. (Huber ve Prangisvilli, 2006).

Pyrolobus fumarii

1997 yılında orta Atlantik black smoker hidrotermal bacasından izole edilmiştir. Hücreleri kok şeklinde olan fakültatif aerobik bir arkeadır. 90-113 °C aralığında gelişim göstermektedir. Otoklavda 1 saat canlı kalabilmektedir. GC oranı %53 olarak bildirilmiştir (Blöchl ve ark. 1997).

1.2.2. Euryarchaeota

Thermococcales

Thermococcales üç cins ile temsil edilir. Bunlar; *Pyrococcus*, *Thermococcus* ve *Paleococcus* cinsleridir. *Pyrococcus* cinsinin optimum büyüme sıcaklığı 95-100 °C iken *Thermococcus*'un optimum büyüme sıcaklığı 80-90 °C dir. Thermococcales üyeleri flagellaları olmayan kok şeklinde hücrelere sahiptirler. Zorunlu anaerobtur. Elementel sülfür bu mikroorganizmaların gelişmesi için önemli bir kaynaktır. Optimum pH ları 6-7 civarındır. Thermococcales üyeleri solfatarlardan, deniz diplerindeki hidrotermal bacalardan ve denizlerdeki petrol kuyularından izole edilebilirler. Thermococcalesin izolasyonu için sadece uygun sıcaklık değil aynı zamanda uygun atmosfer basıncının da (20-30 MPa) sağlanması gereklidir (Lepage ve ark. 2004, Huber ve Prangisvilli. 2006).

Thermoplasmatales

Fakültatif anaerobik, termoasidofilik, otorofik veya heterotrofik mikroorganizmalardır. Morfolojisi ve filogenetik pozisyonuyla arkea içerisinde eşsizdir. Her biri tek cinsle temsil edilen 3 familyası vardır. Bunlar; Thermoplasmaceae, Picophilaceae ve Ferropasmaceae dir. Optimum pH ları 2-3 civarındadır. Deniz altı solfatarlardan, deniz hidrotermal alanlarından, derin denizlerde "black smoker" bacalarından izole edilirler (Huber ve Prangisvilli. 2006).

Methanopyrales

Methanopyrus, çubuk şekilli, hipertermofilik bir metanojendir. *Methanopyrus*, filogenetik ağaçta kendine özgü bir yerde bulunmaktadır. *Methanopyrus kandleri* aynı zamanda halofilik bir arkeadır (Slesarev ve ark. 2002). Hücre duvarında doymamış yağ asitleri, spesifik terpenoidler gibi alışılmışın dışında arkea özellikleri sergilemektedir (Forterre, 2006). Ayrıca *M. kandleri* iki alt üniteye sahip reverse gyrase enzimine sahiptir (Krah ve ark. 1996).

Archaeoglobales

Archaeoglobus, Euryarchaeota içinde kükürtü indirgeyebilen tek gruptur ve bu özellikleriyle yaşam ağacında ayrı bir dal oluştururlar. Küre şekilli hücrelere sahip olan *Archaeoglobus*, optimal olarak 83 °C'de gelişir (Klenk ve ark. 1997, LaPaglia ve Hartzell, 1997).

Ferroglobus, *Archaeoglobus* ile bağlantılıdır fakat kükürtü indirgeyemez. Bunun yerine demiri yükseltgeyebilir. Gelişmesi için en uygun sıcaklık 65-95 °C'dir (Hafenbradl ve ark. 1996).

1.2.3. Nanoarchaeota

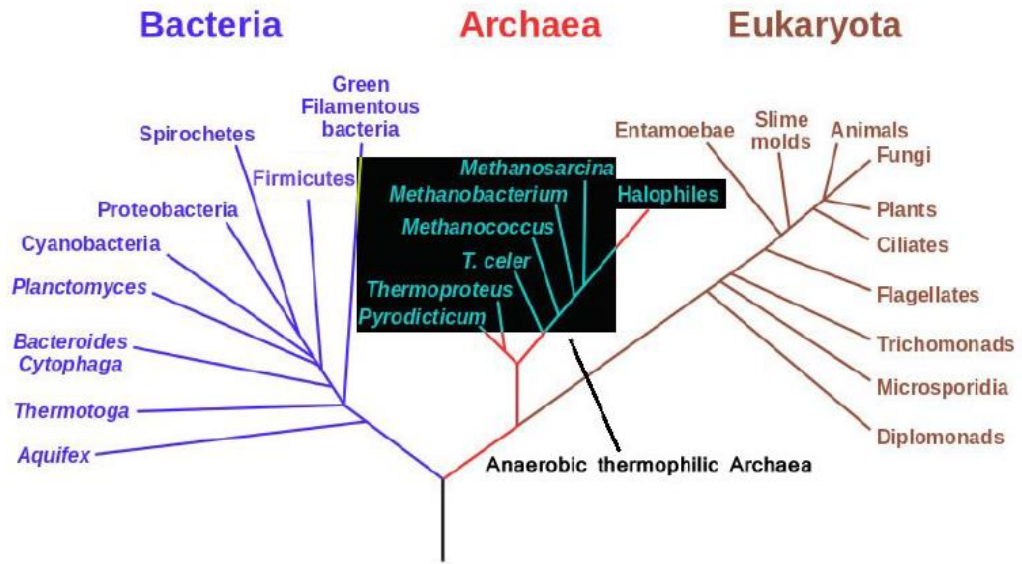
Nanoarchaeum equitans

2002 yılında İzlandanın kıyısındaki bir hidrotermal bacadan izole edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 80 °C dir. pH 6 civarında ve % 2 tuz

konsantrasyonunda gelişebilmektedir. Hücreleri 400 nm çapındadır. *Ignicoccus*'un zorunlu simbiyotudur (Huber ve ark. 2002).

1.2.4. Anaerobik hipertermofilik Archaea

Anaerobik termofilik mikroorganizmalar arasında anaerobik termofilik Archaea geniş bir yer tutmaktadır. Bunlar filogenetik ağacın en derininde bulunur ve en az evrimleşmiş dalını oluşturur. Substrat olarak primordial ekosistemlerdeki substratları kullandıklarından evrenin ilk yaşayan formları olarak değerlendirilirler (Canganella ve Wiegel, 2014). Şekil 1.2 de anaerobik hipertermofilik arkea üyelerinin 16S rRNA ya dayalı filogenetik ağaçtaki yeri gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Anaerobik hipertermofilik arkea üyelerinin 16S rRNA ya dayalı filogenetik ağaçtaki yeri (Canganella ve Wiegel, 2014).

Anaerobik hipertermofiller için doğal habitatlar terestirial volkanik alanlar, denizaltı hidrotermal bacalar, yağ rezervleri ve güneş enerjisi ile ısınan topraklar olabilir. Derin deniz hidrotermal ekosistemlerinde yaşayan anaerobik termofillerin temsilcileri *Archaeoglobus*, *Thermodiscus*, *Thermoproteus*, *Acidianus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* ve *Desulfurococcus* cinsleridir. Sülfatı

indirgeyebilen anaerobik termofil *Sulfolobus* cinsidir. Metanojenler *Methanothermus*, *Methanococcus* ve *Methanopyrus* nitrat indirgeyen anaerobik termofiller *Pyrobaculum* ve *Pyrolobus* cinsleridir (Canganella ve Wiegel, 2014).

1.3. Yüksek Sıcaklık Değerlerine Adaptasyon

1.3.1. Nükleik asitlerin adaptif stabilizasyon mekanizması

Yüksek sıcaklıkta nükleik asitlerin stabilitesi çift ipliklerin ayrılması, kimyasal hasar ve fosfodiester bağlarının kırılması gibi durumlarla tehdit altındadır (Dworkin ve ark. 2006). Çift iplikli DNA yüksek sıcaklıkta helikal yapısını kaybeder ve yeterince yüksek sıcaklıkta çift iplik birbirinden tamamen ayrılır. Konformasyonel denatürasyonu takiben iki ana tip kimyasal degradasyon meydana gelir; DNA ile şeker arasındaki N-glikozidik bağın kırılması ve sitozin ve adenin urasil ve hipoksantine hidrolitik daminasyonu şeklindedir. 40 °C nin altındaki sıcaklıklarda da DNA nın deaminasyonu ve depurinasyonu gerçekleşmektedir. Ancak bu durum sıcaklık arttıkça artmakta ve termofiller için problem oluşturmaktadır. RNA ise DNA ya göre depurinasyon/deprimidasyon'a daha dirençlidir. Ancak RNA da ana problem 3' 5' fosfodiester bağlarının spontan hidrolizidir. 50 °C nin üzerindeki sıcaklıklarda ve Mg^{+2} iyonu varlığında uzun süreli inkübasyon RNA'nın mononükleotidlerine degradasyonuna sebep olmaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007).

tRNA da artmış G+C oranı Tm değerinin yükselerek denatürasyona karşı daha dayanıklı bir mekanizma oluşturur. Ancak mRNA da artan G+C oranı mRNA nın bilgi kodlama potansiyelini düşürmekte ve yaşamsal faaliyetleri sınırlamaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007). Sistematik çalışmalar prokaryotların artan G+C oranı ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Ancak zıt bir durumla karşılaşmıştır; bazı hipertermofilik arkealarda (*Acidinus fervidus*, *Methanococcus*) oldukça düşük G+C oranı görülmesine rağmen Tmax değerinin >90°C olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler nükleik asitlerin stabilitesinin bazı dış faktörler tarafından da kontrol edildiğini göstermektedir (Dworkin ve ark. 2006).

Yüksek sıcaklıklarda Na, K ve Mg iyonlarının çift iplikli DNA'nın fosfodiester bağlarının kimyasal termodegradasyona karşı koruduğu bilinmektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyondaki monovalent katyonlar Mg^{+2} iyonu varlığında dahi RNA'yı degradasyona karşı korudukları bilinmektedir (Gerday ve Glansdorff, 2007). Uzun zamandır bilindiği gibi tuzların veya poliaminlerin eklenmesi T_m değerinde artışa sebep olmaktadır. Aynı zamanda bütün termofillerde olmasa da bazılarında yüksek konsantrasyonlarda potassiumdiinositol-1',1'-phosphat ve tripotassiumcyclic 2,3-diphosphoglycerate gibi varsayılan iyonik termoprotektanlar birikir. Ancak polikasyonik poliaminler ile büyüme sıcaklığı arasında açık bir korelasyon yoktur (Dworkin ve ark. 2006).

Sayırsız arkeal hipertermofillerde DNA'ya bağlanan iki temel protein grubu identifiye edilmiş ve bunların her ikisinin de Hmf histon ailesinin üyeleri olduğu bulunmuştur. Hmf histon ailesi ökaryotik çekirdek histonlarına homologtur ve bu histon benzeri proteinlerin *Sulfolobus* cinsinde T_m değerini arttırdığı bilinmektedir (Dworkin ve ark. 2006).

Aynı zamanda hipertermofillerdeki DNA reversegyrase'lar double heliks yapısının stabilizasyonunda rol oynar. Çoğu organizmanın DNA'sı negatif süper sarmallıdır ve bu yapı DNA'nın daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Ancak termofillerin DNA'sı, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü (reversible) sağlayan bir DNA Giraz ihtiva eder. Bu da DNA'nın erime noktasını en azından organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına kadar yükseltir (Dworkin ve ark. 2006).

Termofiller ayrıca non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimler gibi artan etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara tolerans göstermektedirler (Dworkin ve ark. 2006).

1.3.2. Proteinlerin stabilizasyonu

Yüksek veya düşük gelişme sıcaklıklarındaki gelişme incelendiğinde termofil proteinlerinde çeşitli adaptasyon mekanizmaları ortaya çıkmaktadır.

Termofilik proteinler spesifik aminoasit dizilimine sahiptir. Genellikle termofilik proteinlerdeki glutamin, arjinin ve lizin amino asitlerinde artış gözlenmektedir. Ayrıca termofilik proteinler yüksek prolin ve düşük glisin

içeriğine sahiptir (Gerday ve Glansdorff, 2007). 8 mezofil, 4 termofil ve 6 hipertermofil ile yapılan bir metagenomik data çalışmasında hipertermofillerin proteinlerinde glutamin+lizin sayısında artış glisin+histidin sayısında ise azalma gözlemlenmiştir (De Farias ve Bonato, 2002).

Termofilik proteinler mezofilik homologlarına göre daha fazla apolar çekirdeğe sahiptir. Güçlü hidrofobik etkileşimler stabilitenin sağlanmasında rol oynamaktadır. Ayrıca α heliks yapısına termofilik proteinlerde daha sık rastlanmaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007). Hipertermofilik arkealar ile yapılan bir çalışmada sitoplazmik proteinlerdeki artan disülfid bağlarının stabilizasyonda etkin olduğu bildirilmiştir (Mallick ve ark. 2002).

Disülfid bağları hormonlar, plazma proteinleri veya hidrolazlar ve inhibitörleri gibi proteinlerin stabilizasyonunda en önemli rolü üstlenirler. Arkea ve bakterilerde bazı proteinlerin (örn; *Pyrococcus woesei*'nin TATA-kutusu bağlanma proteini, *Thermotoga maritima* triosephosphate isomerase, *Archaeoglobus fulgidus* ferrik redüktaz) kristal yapısı incelendiğinde sitozolik proteinlerin stabilizasyonunda sistinlerin gerekli olduğu ileri sürülmektedir (Dworkin ve ark. 2006).

Isı şok proteinleri (Hsp) ve arkeadaki termozomlar proteinlerin yüksek ısıdaki stabilitesini belirlemede çok önemli yere sahiptir. Isı şok proteinleri tanımlandığından beri yüksek intrinsik stabiliteyi sağlayan hayati molekül olduğu düşünülmektedir. Ancak aynı fizyolojik şartlar altında mezofillerinde ekstremofiller gibi ısı şok proteinlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Arkeaların yeni keşfedilen nanoarkea da dahil olmak üzere bütün filumları HSPs, termozom ve diğer tip şaperonları içermektedir. (Dworkin ve ark. 2006).

Elektrostatik etkileşimler özellikle tuz köprüleri termofilik proteinlerin yüksek sıcaklıkta stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007).

1.3.3. Lipidlerin ve membranların stabilitesi

Yaşayan hücrelerde stoplazmik membran stoplazma ile çevre arasında bir bariyer oluşturur. Membranda lipid tabaka ve bu tabakaya gömülü proteinler

bulunur. Membrandan küçük moleküllerin geçişi ya aktif taşıma ya da pasif difüzyon ile olur. Sıcaklığın artmasıyla pasif difüzyon hızlanır. Hipertermofillerde ekstrem sıcaklık çözünen gradiyentinin bozulmasına yol açar. Bu nedenle hipertermofillerin membranlarının termostabil ve iyonların geçişini sınırlayan özel adaptif mekanizmaya sahip olması gereklidir (Dworkin ve ark. 2006).

Ökaryotlar, bakteriler ve arkealarda membran lipidlerinin yapısının korunduğu ancak arkeaların bakteri ve ökaryotlardan farklı olarak gliserol ile yağ asidi zinciri arasındaki ester bağı yerine, gliserol ile dallanmış C20-hidrokarbon zincirleri arasında eter bağı bulunduğu bilinmektedir. Eter bağlarının hidrolize daha dirençli olduğu bilinmektedir. Fitanyl zincirler omurgasının her 4. atomunda metil grupları içeren tekrarlı doymuş izopropanoid üniteleri içerir. Bu metil grupları membranın hareketini sınırlar, böylece iyon geçirgenliğine karşı bir stabilizasyon sağlar (Dworkin ve ark. 2006; Gerday ve Glansdorff, 2007).

İki hidrokarbon zinciri her yan gliserol ünitesi ile (archaeol) veya iki gliserol ünitesi ile (caldarchaeol) bağlanabilir. Archaeollerin arkeada bulunduğu bilinirken caldarchaeollerin sadece termofilik arkeada bulunduğu bilinmektedir. Aynı zamanda calarchaeol lipidlerinin termofilik ve asidofilik arkeada tek tabakalı yapıya sahip olduğunu ve bu tek tabakalı yapıda iki gliserol ünitesinin fitanyl zincirleri ile kovalent olarak bağlı olduğu bildirilmiştir (Dworkin ve ark. 2006; Gerday ve Glansdorff, 2007).

Bakterilerdeki yağ asitleri 16-18 karbonlu yağ asitleridir. Aynı zincir uzunluğuna sahip doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine göre daha düşük erime noktası sıcaklığına sahiptir. Zincir uzunluğu, çift bağ sayısı ve metil dallanma pozisyonu erime noktasını etkilemektedir. Birçok arkea lipiti tamamen doymuştur. Bu durum arkea lipidlerini hidrolize ve oksidasyona daha dirençli yapmaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007).

1.4. Termofillerin Biyoteknolojik Önemi

Biyoteknoloji yem ve yemek üretiminden biyoyakıt, enerji ve deterjan üretimine kadar birçok alanda etkinliğini sürdürmektedir. Biyoteknoloji proseslerinde kullanılan koşullar standart proseslerden oldukça farklı olduğu için

ekstrem koşullara dayanıklı enzimlerin bu prosesleri uygulanabilirliği ortaya çıkmıştır. bu nedenle ekstrem koşullarda yüksek verimle çalışan ekstreozimlerin önemi günden güne artmaktadır. Ekstreozimler su /çözücü karışımları, yüksek basınç, yüksek sıcaklık, asidik ve alkali pH ve düşük sıcaklık gibi ekstrem koşullarda çalışabilir (Elleuche ve ark. 2014). Çizelge 1.1 de ekstreofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulama alanları gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Ekstreofil mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları (Elleuche ve ark. 2014).

Ekstreofil	Habitat	Enzim	Uygulama Alanları
Termofil	Yüksek sıcaklık > 80 °C Ilımlı termofiller Termofiller Hipertermofiller	Amilaz Ksilenaz Proteaz DNA polimeraz	Tatlandırıcı endüstrisinde Kağıt endüstrisi Kabartma, deterjan Genetik mühendisliği
Psikrofil	Düşük sıcaklık < 20 °C	Proteaz Dehidrogenaz Amilaz	Peynir olgunlaştırılması, yemek üretimi Biyosensör Deterjanlarda polimer degradasyonu
Asidofil	Düşük pH (pH <7)	Sülfür oksidaz	Kömürün desülfürizasyonu
Alkalifil	Yüksek pH (pH >7)	Selüloz	Deterjanlarda polimer degradasyonu
Halofil	Yüksek tuz konsantrasyonu (5M dan fazla)	Selüloz	İyon değişim reçinelerinin rejenerasyonu

1.4.1. Termofilik ve hipertermofilik enzimler

Termofilik ve hipertermofilik enzimlerin özellikleri sıralandığında;

- Isı denatürasyonuna dayanıklı,
- Deterjan organik çözücüler ve kimyasallara karşı stabil,
- Yüksek sıcaklıklarda aktif 40 °C altındaki sıcaklıklarda aktif değil,

- Orta sıcaklıkta inaktive olan hipertermofilik enzimler sıcaklık arttıkça aktivitelerini geri kazanıyor,

Termofilik ve hipertermofilik enzimlerin sahip oldukları bu özellikler onları endüstriyel uygulamalar için kusursuz yapmaktadır (Vieille ve Zeikus, 2001; Anitori, 2012).

1.4.2. Moleküler biyoloji uygulamalarında termofilik ve hipertermofilik enzimler

DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar DNA tamiri, replikasyon ve rekombinasyon süreçlerinde rol alan önemli enzimlerdir. *Thermus aquaticus*'dan izole edilerek *E.coli*'ye klonlanan Taq polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda çalışabilme yeteneği sayesinde PCR çalışmalarında kullanılmaktadır (Vieille ve Zeikus; 2001). Hipertermofilik arkea olan *Pyrococcus furiosus*' dan izole edilen Pfu polimeraz enziminin proofreading aktivitesi alması sebebiyle high fidelity çalışmalarında tercih edilmektedir. Bunun dışında *T. litoralis* den izole edilen vent polimeraz, *P. woesei* den izole edilen Pwo polimeraz *Pyrococcus GB-B* straininden izole edilen Deep vent polimeraz enzimi moleküler çalışmalarda kullanılmaktadır (Bouzas ve ark. 2006).

DNA Ligazlar

P. furiosus'dan izole edilen Pfu DNA ligaz, *Thermus scodoductus*'dan izole edilen Tcs DNA ligaz *Acidianus ambivalens*'den izole edilen DNA ligazlar 45-80 °C de aktif olarak çalıştığı ve yüksek sıcaklıklarda mükemmel ligasyon aktivitesi gösterdiğinden gen sentezi ve mutasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Vieille ve Zeikus; 2001; Bouzas ve ark. 2006).

1.4.3. Endüstride termofilik ve hipertermofilik enzimler

Amilolitik Enzimler

Nişasta gıda ve gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Nişastanın sindiriminden sorumlu enzimler olan amilazlar ticari enzimlerin % 25 lik bir payını oluşturmaktadır (Elleuche ve ark. 2014). 105 °C altındaki sıcaklıklarda nişasta granülleri jelatinleşmeye başladığından yüksek sıcaklıkta çalışan enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla termofilik ve hipertermofilik enzimler endüstride nişastanın parçalanması prosesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipertermofilik bir mikroorganizma olan *P. furiosus*'dan elde edilen alfa amilaz enzimi 95 °C 105 °C sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilmektedir (Anitori, 2012).

Ayrıca nişasta etanol üretiminde substrat olarak da kullanılmaktadır. Etanol ise yakıt katkısı veya kimyasallar için başlatıcı materyal olarak kullanıldığından amilolitik enzimlerin önemi bir derece daha artmaktadır (Elleuche ve ark. 2014).

Lignoselüloz Degradasyonu

İkinci nesil biyoyakıtların üretiminde kullanılan lignoselüloz selüloz, hemiselüloz ve lignin den oluşan bir materyaldir. Bu polisakkaritler selüloz enzimi yardımıyla parçalanabilir. Yüksek sıcaklıkta enzimatik degradasyon bu süreci kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle termofilik ve hipertermofilik selüloz enzimi biyoyakıt ve biyoetanol üretiminde önemli bir yer tutmaktadır (Elleuche ve ark. 2014).

Esterazlar ve Lipazlar

Lipolitik enzimler yağ asitlerinin sentezi veya hidroliz için kullanılır. Esterazlar genellikle 10 karbondan kısa açıl esterlerini, lipazlar ise 10 karbon atomundan daha büyük olan yağ asitlerinin hidroliz eder. Esteraz ve lipazlar

kimyasal uygulamalarda biyokataliz basamağında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler ilaç sentezi diğer değerli kimyasal bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır (Elleuche ve ark. 2014).

Bacillus thermocatenulatus da ifade edilen bir lipaz geni *E.coli*'ye klonlanmış ve enzimin pH 11 de ve 60-70 °C de aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu enzimin çeşitli deterjanlar ve organik çözücüler varlığında stabil olduğu bildirilmiştir.

Bacillus stearothermophilus da ifade edilen lipaz enziminin optimum sıcaklığının 68 °C olduğu ve enzimin 55 de 30 dakika stabil olduğu bildirilmiştir.

Bacillus licheniformis de ifade edilen bir esteraz geni *E.coli* ye klonlanmış ve enzimin pH 7-8.5 aralığında ve 45 °C sıcaklıkta stabil olduğu bildirilmiştir.

Archaeoglobus fulgidus a ait termofilik esteraz enziminin ise 70 °C ve pH 7.1 de maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Yeni bir termoasidofil esteraz enzimi *Bacillus acidocaldarius* dan *E.coli* ye klonlanmışdır. Bu enzim vinil asetat ve toluen varlığında test edildiğinde asetil esterleri sentezleyebildiği bildirilmiştir (Demirjian ve ak. 2001).

Proteazlar ve Peptidazlar

Proteaz ticari enzimlerin % 60'ını oluşturmaktadır. Diğer proteazlar ile karşılaştırıldığında bakteriyel proteazlar daha önemli bir yer tutmaktadır (Azlina ve Norazila, 2013).

Dünyanın en büyük ticari enzim sınıfını oluşturan proteazlar deterjan, deri endüstrisi, gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi ve biyoremediasyon proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Termofilik ve alkalifilik mikroorganizmalardan izole edilen proteazlar yüksek sıcaklık ve pH da çalışabilmektedir. Bu sebeple endüstriyel alanda çok geniş kullanım alanına sahiptirler.

Aqel ve ark. (2012) termofilik *Bacillus HUTBS62* straininden proteaz enzimini saflaştırmışlar ve enzimi optimum pH 6,8 optimum sıcaklığı ise 80 °C

olan ve 2 mM EDTA konsantrasyonunda çalışan nötral termofilik proteaz olarak karakterize etmişlerdir.

Uganda'nın batısında yer alan Buranga termal kaynaklarından iki aerobik termofilik bakteri izole edilmiş ve bu bakterilerin 16S rRNA analizi sonucunda *Geobacillus* cinsine ait oldukları bildirilmiştir. Bu izolatların 50-70 °C sıcaklıkta ve pH 5-10 aralığında aktif proteaz enzimine sahip oldukları bildirilmiştir (Hawumba ve ark. 2002).

1.4.3. Diğer biyoteknolojik ürünler

Etanol Üretimi

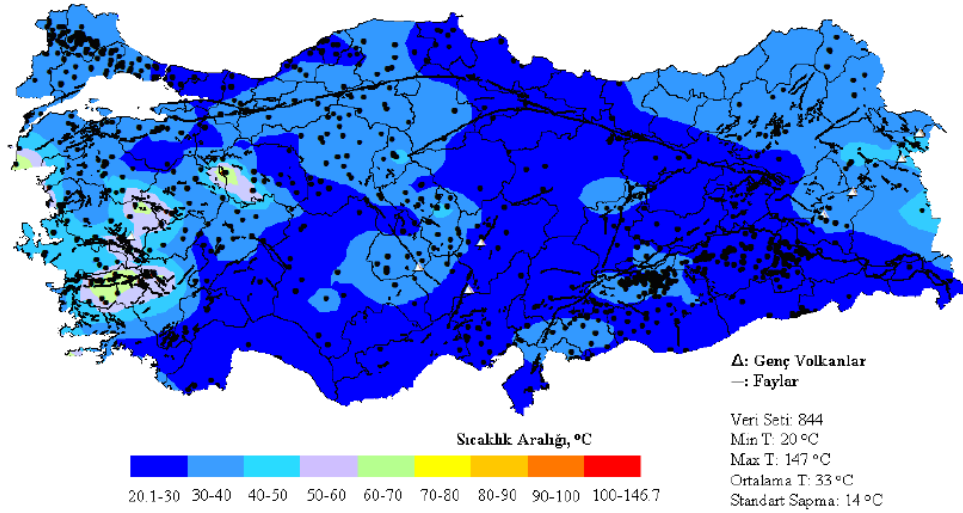
Biyoetanol üretiminde yaygın olarak mayalar ve *Zymomonas* bakterileri kullanılmaktadır. Ancak dar substrat aralığı, mezofilik koşullarda yüksek kontaminasyon riski gibi sebeplerden dolayı özellikle lignoselülozlu artıklardan etanol üretiminde termofilik bakteriler daha etkindir. Bu amaçla *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* *Thermoanaerobium brockii* ve *Clostridium thermosaccharolyticum* yaygın olarak kullanılmaktadır (Dönmez, 1987).

Organik Asit Üretimi

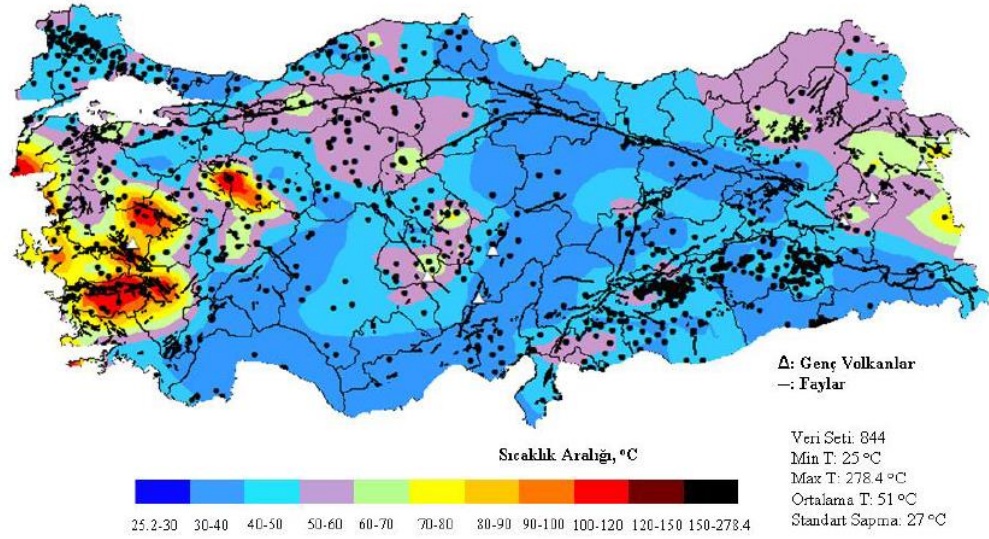
Termofilik etilalkol üretiminde oluşan yan ürünlerden en önemlisi *Clostridium thermoaceticum* tarafından üretilen asetik asittir. Fermentasyon sonucunda 1 mol glukozdan 3 mol asetik asit üretebilmektedir. Laktik asit ve bütirik asitler de termofilik bakteriler tarafından etanol fermantasyonunun yan ürünü olarak üretilmektedir. *Thermobacterioides acetoethlicus* suşları dışında etanol üreten bütün termofiller laktat oluşturmaktadır (Dönmez, 1987).

1.5. Termofilik Habitatlar

Deprem kuşağında yer alan ülkemizde, buna bağlı olarak da sıcak su kaynakları sayısı oldukça fazladır. MTA 1996 ve MTA 2005 envanterleri değerlendirildiğinde, ülke genelinde resmi kayıtlara alınmış 277 jeotermal alan olduğu görülmektedir. Türkiye'nin 500 m ve 100 m derinlikteki yer altı sıcaklıklarını gösteren, yer altı sıcaklık dağılım haritası incelendiğinde, ülkenin batı bölgesinin diğer bölgelere göre daha yüksek sıcaklıklar sergilediği görülmektedir. Şekil 1.3 ve 1.4 de Türkiye 500 m ve 1000 m yeraltı sıcaklık haritaları gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Türkiye 500 m yeraltı sıcaklık haritası (Korkmaz Başel ve ark. 2008).



Şekil 1.4. Türkiye 1000 m yeraltı sıcaklık haritası (Korkmaz Başel ve ark. 2008).

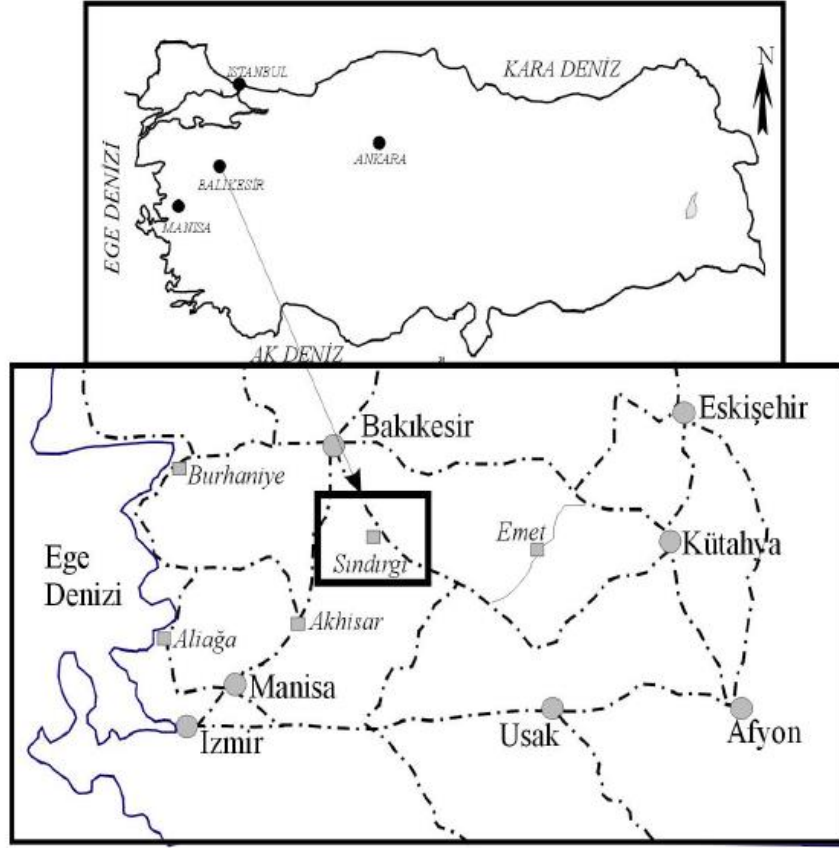
1.5.1. Jeotermal habitatlar

Genel olarak jeotermal alanlar iki ana gruba ayrılır. Yüksek sıcaklık alanları olarak adlandırılan jeotermal alanlar volkanik alanların ve mağma çemberinin 2 ila 5 kilometre derinliğinde bulunur. Buradaki su kaynaklarının sıcaklığı 150-300 °C arasında değişmektedir ve volkanik gazları içermektedir. Düşük sıcaklık alanları olarak adlandırılan diğer jeotermal alanlar ise derin lav akışları veya ölü mağma çemberi etrafında bulunan sıcaklığı 150 °C altında olan alanlardır (Kristjansson, 1992).

1.5.2. Diğer termal habitatlar

Doğal jeotermal alanlar dışında çok az sıcak habitat bulunmaktadır. Güneş enerjisi ile ısınan göller, topraklar veya biyolojik olarak ısınan çöplükler bunlara örnek oluşturabilir. Ayrıca yiyecek ve kimyasal endüstrisinin oluşturduğu yüksek sıcaklık prosesleri de termofilik mikroorganizmalar için ideal bir alan oluşturmaktadır. Birçok termofilik mikroorganizma insan eliyle oluşturulmuş bu alanlardan izole edilmiş ve bazılarını başka bir yerde rastlanmamıştır (Kristjansson, 1992).

1.6. Balıkesir (Sındırgı, Güre, Havran) Jeotermal Yapısı



Şekil 1.5. Balıkesir- Sındırgı jeotermal bölgesi

Sındırgı jeotermal sistemi KB-GD uzanan Simav grabeni içerisinde yer alan Mezozoik yaşlı Ofiyolitik birimleri kesen düşey faylara bağlı olarak oluşmuştur. Sındırgı-Hisaralan jeotermal sahasında, ortalama 150 L/s debide 96 °C ye ulaşan sıcaklıkta jeotermal akışkan yüzeye boşalmaktadır. Termal suların sıcaklıkları 32.1–96.6 °C arasında değişmektedir. pH ve elektriksel iletkenlik değerleri ise 6.14–8.35 ve 597–1506 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasındadır. Sıcak sular zayıf alkali ve nötr su özelliğinde olup, elektriksel iletkenliğine göre ise sıcak sular C3 sınıfında tuzlu suları oluşturur (Aksoy ve ark. 2009).

Ağırlıklı olarak, Gönen, Havran, Balya ve Susurluk ilçelerinde yer alan jeotermal alanlardan, Gönen ilçesindeki sıcak su kaynakları kaplıca, kaplıca tesisi ve sera ısıtıcılığının yanı sıra ilçenin ısıtılmasında da kullanılmaktadır. Gönen sıcak su kaynağında gerçekleştirilen sondaj çalışmaları sonucunda 71-84 °C sıcaklık ve 128.7 lt/sn debiye sahip akışkan görünür hale getirilmiştir. Havran-Güre ve Derman jeotermal alanlarındaki 48-59 °C arasında sıcaklık ve 0.5-1.45

lt/sn debiye sahip kaynaklar tespit edilmiş olup, bölgede açılan kuyularda 33-65°C sıcaklık ve 21-159 lt/sn debiye sahip akışkanlardan 5.35-15.1 MWt termal güce sahip jeotermal enerji elde edilmiştir (Anonim1).

1.7. Kütahya (Eynal-Simav) Jeotermal Yapısı

Eynal, Naşa ve Çitgöl bölgelerinden oluşan Simav jeotermal alanı Simav grabeninin güneyinde yer alır. Simav jeotermal alanındaki mevcut kaynaklardan kaplıca turizminin yanında, merkezi ısıtma ve sera tarımcılığı da yapılmaktadır. Eynal Kaplıcaları'ndaki sıcak su kuyularından alınan 120 °C-160 °C üzerindeki kızgın sulu buhar seperatör tanklarında gaz ve buharı alınıp 98 °C düşürüldükten sonra pompalar vasıtası ile 4300 m. uzunluğunda özel paket çelik izolasyonlu borular ile toprak altından Simav Eşanjör Merkezine 1 °C ısı kaybı ile ulaştırılmaktadır (Özkaya ve ark. 2008). Şekil 1.6 da Eynal-Simav jeotermal bölgesi gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Kütahya Simav-Eynal jeotermal bölgesi (Anonim 2).

1.8. Ribozomal RNA

Ribozomal RiboNükleik Asit (rRNA) bütün canlılarda protein sentezinden sorumlu ribozomun alt ünitesidir. rRNA iki alt ünite içermektedir. Bunlar büyük alt ünite (LSU) ve küçük alt ünite (SSU). rRNA'nın büyük alt ünitesi ribozom gibi işlev görür ve peptid bağı oluşumunu katalizler. Bir bakteriyel ribozom çoklu ribozomal proteinler ve 23S rRNA, 16S rRNA, ve 5S rRNA olmak üzere 3 ribozomal RNA' dan oluşmaktadır. rRNA, genomda *rrn* olarak adlandırılan bir operon şeklinde düzenlenmiş ilgili genler tarafından kodlanır. Bir bakteriyel genomun büyüklüğüne ve türe bağlı olarak çoklu *rrn* operonlarına sahip olabilir.

Kapsüller, flagella, hücre boyutu ve şekli, biyokimyasal özellikler morfolojik özellikler, bakteri türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılmıştır. Ancak, bakteriler arasında yatay gen transferi bu özelliklerin onların filogenetik sınıflandırma için çok yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, evrimsel olarak stabil marker genlerin DNA dizisi analizi bakteri filogenetiğini ve çeşitliliğini incelemek için potansiyel bir strateji olarak kabul edilir (Rajendhran ve Gunasekaran, 2011).

1980'lerde *Approved List* 'de 1781 geçerli tür ismi bulunmaktayken bugün bu sayı % 456 artarak 8168'e ulaşmıştır. 1994'te Stackebrandt ve Goebel small subunit (SSU) sekans teknolojisi ve tür tanımlamada kullanımını ortaya çıkarmıştır. 16S rRNA'nın sekansındaki % 97'den az benzerlik yeni tür olarak tanımlanmıştır (Janda ve Abbott, 2007).

Bakteriyel taksonomi çalışmalarında 16S rRNA'nın genetik marker olarak yaygın kullanımının pek çok sebebi vardır;

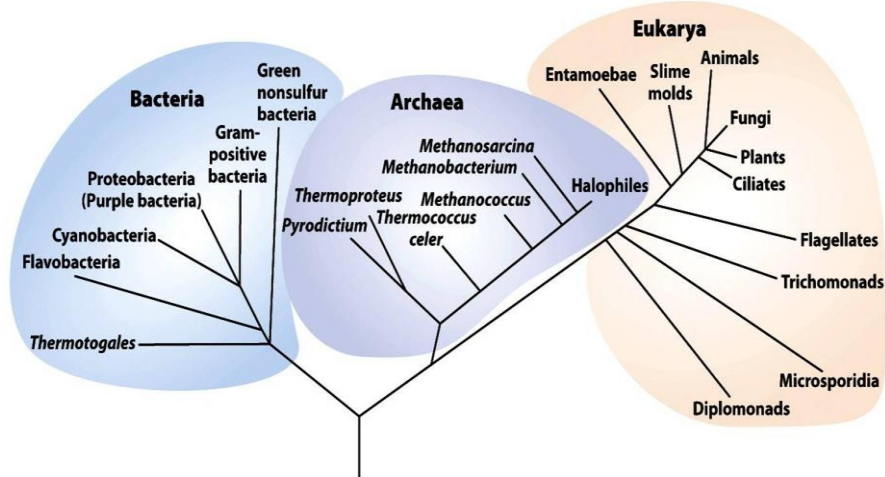
- Bütün bakterilerde bulunur, evrenseldir.
- 16S rRNA geninin fonksiyonu zaman içinde değişmemiştir. Buna rağmen 16S rRNA özellikle bazı değişken bölgeler içermektedir. Değişken bölgelerin varlığı sınıflandırma için bir araç sağlamaya yeterli çeşitlilik sağlarken korunmuş bölgelerin varlığı uygun PCR primerleri ve hibridizasyon problemlerinin etkin tasarımına olanak tanımaktadır.

- Genin büyüklüğü (1500 bç) informatik bilgi edinmek için yeterince büyüktür.

Ancak 16S rRNA çalışmalarında bazı kısıtlayıcı hususlar vardır. Genom başına düşen kopya sayılarının 1 den 15'e kadar veya daha fazladır. Kopya sayıları bir ölçüde taksona özel gibi görünsede aynı türün suşları arasında da varyasyonlar kaydedilmiştir. Bazı bakteriyel taksonlarda son derece farklı 16S rRNA dizileri gözlenmiştir. 16S rRNA dizilerinin daha büyük bir değişkenlik termofilik bakterilerde saptanmıştır. Bu özel durumda, yatay gen transferinin yüksek oranda potansiyel neden olduğu ileri sürülmüştür (Vetrovsky ve Baldrian, 2013).

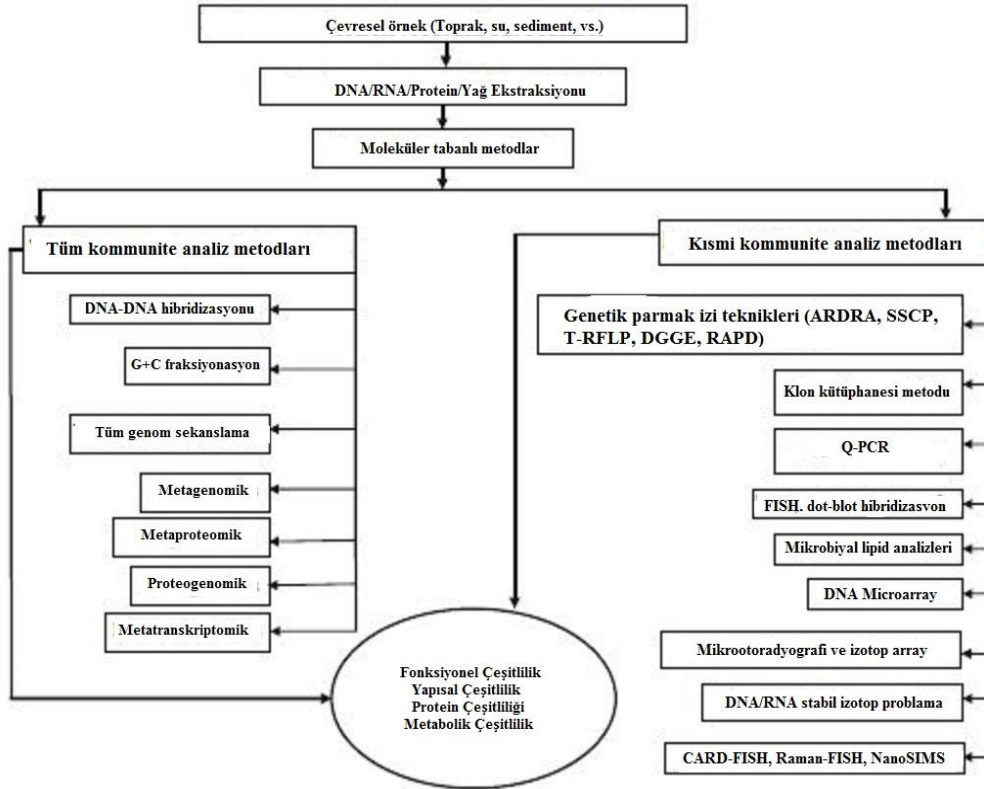
1.9. Mikrobiyal Kommünite Analizleri

Mikrobiyal kommünitenin büyük çoğunluğu laboratuvarda kültüre alınamaz. Bu nedenle kültüre alınamayan organizmaların nükleik asit, lipid ve protein gibi biyomoleküllerine ait bilgiler oldukça önemlidir. Kültür bağımsız nükleik asit yaklaşımları prokaryotlarda 16S, ökaryotlarda 18S rRNA gibi seçilmiş genlerin veya bütün genomun analizini içerir. rRNA karşılaştırılmasına dayalı çalışmalar sonucunda canlılar üç ana domaine ayrılmıştır; bakteriler, arkealar ve ökaryotlar (Rastogi ve Sani, 2011). Şekil 1.7. de yaşamın üç domaini gösterilmektedir.



Şekil 1.7. Yaşamın üç domaini (Lehninger, 2008).

Geçtiğimiz yıllarda mikrobiyal ekoloji alanında önemli çalışmalar olmuş ve mikroorganizmaların filogenetik ve fonksiyonel çeşitliliğini karakterize etmek için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler kısmi kommunité analizleri ve tüm kommunité analizleri olmak üzere iki ana kategoride sınıflandırılmıştır (Rastogi ve Sani, 2011). Şekil 1.8. de kültür bağımsız moleküler yöntemler özetlenmiştir.

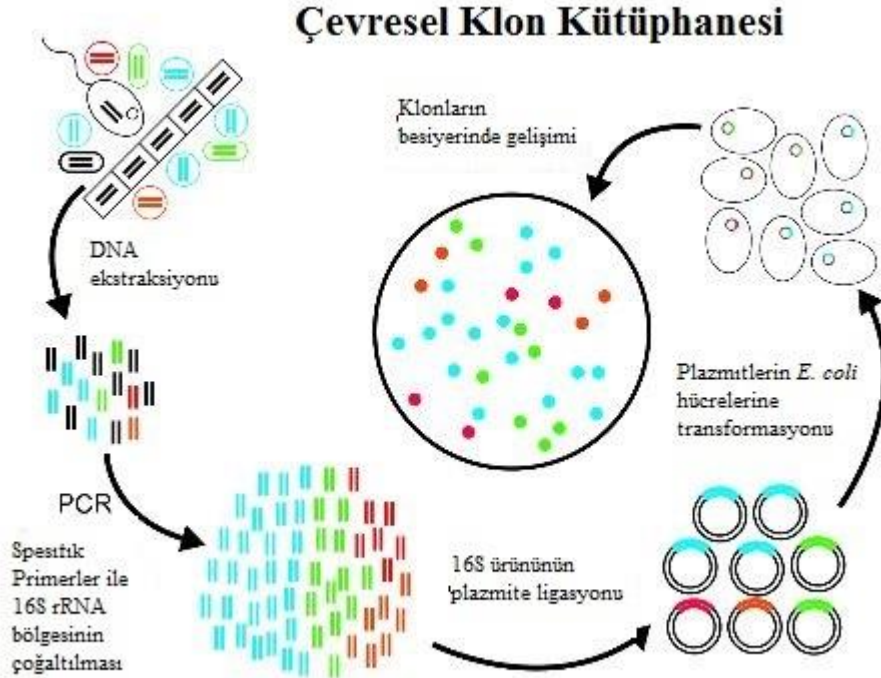


Şekil 1.8. Kültür bağımsız moleküler metodlar (Rastogi ve Sani, 2011).

Kısmi kommunité analiz yaklaşımları mikroorganizmanın karakterizasyonu için çevresel bir örnekten ekstrakte edilen DNA/RNA'nın template olarak kullanıldığı PZR temelli metodlardır. Korunmuş gen bölgesi olan 16S rRNA'nın amplifikasyon ürünü kullanılmaktadır. Tüm kommunité analizlerinde ise çevresel örnekten ekstrakte edilen total DNA'nın tamamının analizine dayanmaktadır.

1.9.1.16S rDNA klon kütüphanesi

DGGE gibi çeşitli parmakizi analizleri mikrobiyal kommunité kompozisyonunun mevsimsel değişimini göstermek için son derece kullanışlı tekniklerdir. Fakat bu metodlar sadece kommunité seviyesinde değişiklikleri gösterirken, organizmanın ismini vermez. Bu bilgiyi edinebilmek için daha direkt metodlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bir çevresel ürünün amplifikasyonu ile elde edilen PZR ürününün analizi için kullanılan en yaygın metod klonlama ve sekanslamadır. Çoğaltılan PZR ürünü uygun bir vektöre entegre edilir ve vektör uygun bir konakçıya aktarılarak klonlama tamamlanır. Şekil 1.9 da klonlama akış şeması verilmiştir. Elde edilen ürünler GenBank, Ribosomal Database Project (RDP) ve Greengenes gibi veri tabanları ile karşılaştırılır. Toprak gibi çevresel bir örnekte mikrobiyal zenginliğin %50 sini gösterebilmek için yaklaşık 40,000 klon taraması yapılmalıdır. Ancak tipik 16S rRNA klon kütüphaneleri 1000 den az sekans içermektedir ve bu mikrobiyal çeşitliliğin çok küçük bir kısmını göstermektedir (Rastogi ve Sani, 2011).



Şekil 1.9. Klonlama akış şeması.

Klon kütüphanesi oluşturmada birçok problem vardır. Çevresel örneğin laboratuvara taşınma süresi 2 saatten az olmalıdır. Çünkü bu süreç taxon oranının değiştirmektedir. Bir diğer problem hücrenin lizizidir. Sert liziz prosedürleri kimerik formasyon oluşumunda artışa sebep olmakta veya hedef DNA'nın çoğaltılamaması ile sonuçlanır. Ayrıca PCR artefaktları da klon kütüphanesini etkilemektedir. Genellikle klon kütüphanelerinde 1000 klondan fazlası taranmamaktadır ki budurum gerçek çeşitliliği yansıtmaya yetmemektedir (Stackebrandt ve ark. 1999).

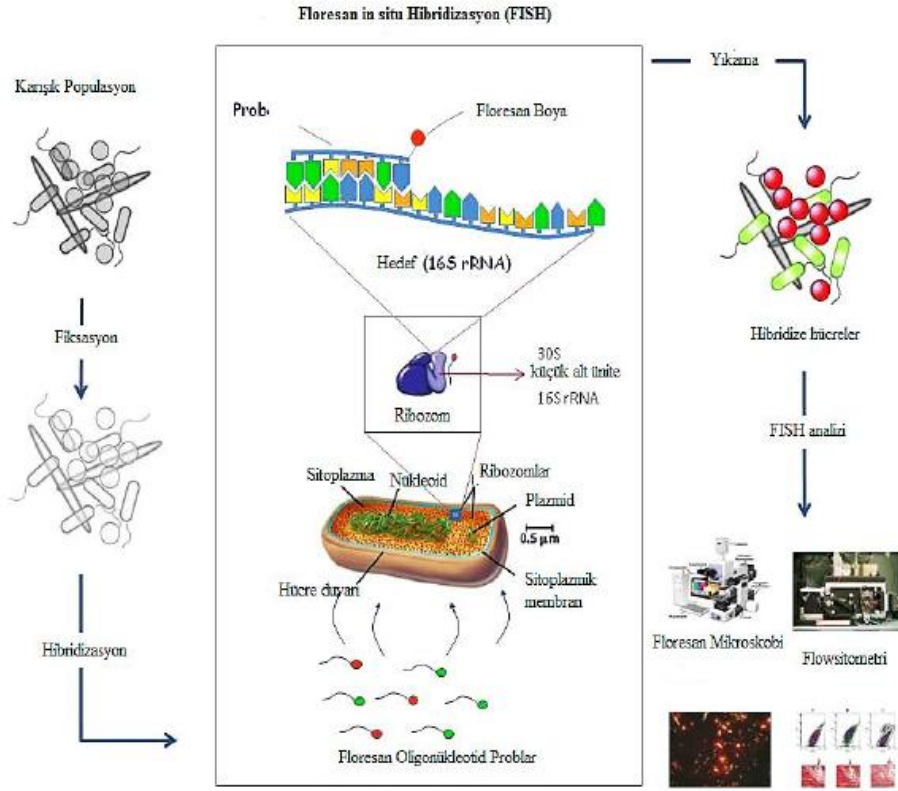
1.9.2. Flourescence In Situ Hybridization

Toprak gibi çevresel bir örnekte mikrobiyal zenginliğin %50'sini yansıtmak için 40 000'den fazla klon gerekmektedir. Ancak 16S rRNA klon kütüphanesi ile 1000'den az sekans elde edilmektedir ve bu durum mikrobiyal çeşitliliğin çok az bir kısmını yansıtmaktadır.

Floresans in situ hibridizasyon 1980'lerin başlarında biyomedikal araştırmacıları tarafından kromozomda spesifik genlerin varlığını belirlemek için geliştirilen sitogenetik bir tekniktir. Ayrıca FISH spesifik RNA hedeflerinin varlığını belirlemek amacıyla da kullanılır. Bu sayede FISH ortamdaki mikroorganizmaları saymak ve tanımlamak amacıyla kullanılabilir. Floresans işaretli oligonükleotid probolar kullanılarak yapılan çalışmalar ile aktif çamur örneklerinde metabolik olarak aktif mikroorganizmaların yaklaşık %90'ı belirlenebilmektedir. Bu nedenle kültürel yöntemlere dayanmayan moleküler biyolojideki son gelişmeler ile bir ortamda kültüre alınmayan mikrobiyal komünite hakkında bilgi edinilebilmektedir. Klonlama ve dizi analizi bir komünitede hangi mikroorganizmaların bulunduğunu belirlememize yardımcı olmaktadır. Ancak bu çalışmalar zaman alıcıdır. Hibridizasyon çalışmaları oldukça hızlı sonuçlar vermektedir. Ancak hedef diziye uygun probun seçilmesi burada oldukça önemlidir (Frederic ve ark. 2000).

FISH genellikle klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bazı patojenler laboratuvar koşullarında geliştirilemediğinden FISH tekniği ile kültürasyon yapılmadan patojenin varlığı belirlenebilmektedir. Ayrıca FISH mikrobiyal ekoloji çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Spesifik probolar

kullanılarak çevresel bir örnekte hangi mikroorganizmaların olduğu hakkında bilgi edinilebilmektedir. Şekil 1.10 da FISH akış şeması özetlenmiştir.

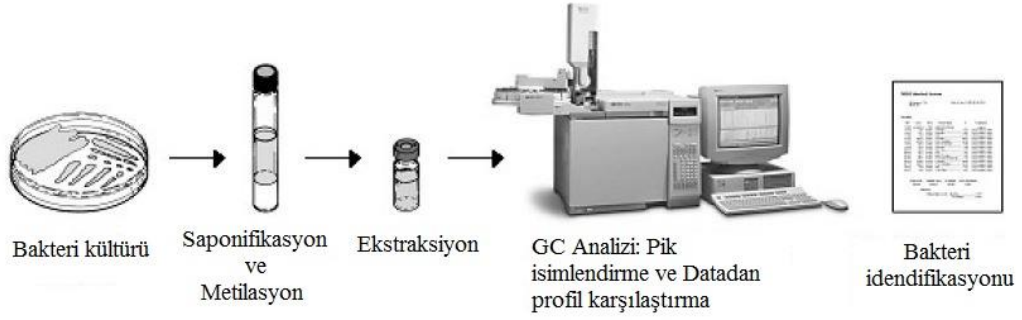


Şekil 1.10. FISH akış şeması

1.9.3. Mikrobiyal lipid analizi

Lipid analizi hem ekolojik hem de taksonomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyal taksonomide lipidlerin rolü üzerine çok sayıda makale yayınlanmıştır. Yağ asitleri saponifikasyon yoluyla ekstrakte edilir ve gaz kromatografisi veya kütle spektroskopisi yoluyla tüm hücre duvarı veya hücrelerin yağ asit profillerinin analiz edilmesiyle mikroorganizmalar identifiye edilebilir. Mikroorganizmaların yağ asit profillerindeki çeşitlilik, içerik, yağ asiti tipi ve miktarı daha önceden yağ asiti profili tanımlanmış mikroorganizmalar ile kıyaslanarak cins ve tür belirlenebilir. Bu amaçla önceden oluşturulmuş referans veriler kullanılır. Mikroorganizmaları doğru olarak identifiye etmek için FAME analizi dışında diğer fenotipik metotlar da gereklidir (Goldfine 1972; Shaw 1974; Lechevalier 1977; Bobbie ve White 1980).

Sherlock MIS 9-20 karbon uzunluğunda yağ asitlerini analiz etmektedir. Pikler system tarafından otomatik olarak adlandırılmaktadır. Bazı gram pozitif bakterilerde dallanmış yağ asitleri yaygın olarak bulunurken, gram negatif bakterilerde kısa zincirli hidroksi grupları lipopolisakkaritleri işaret etmektedir. Şekil 1.11 de FAME analiz basamakları özetlenmiştir.



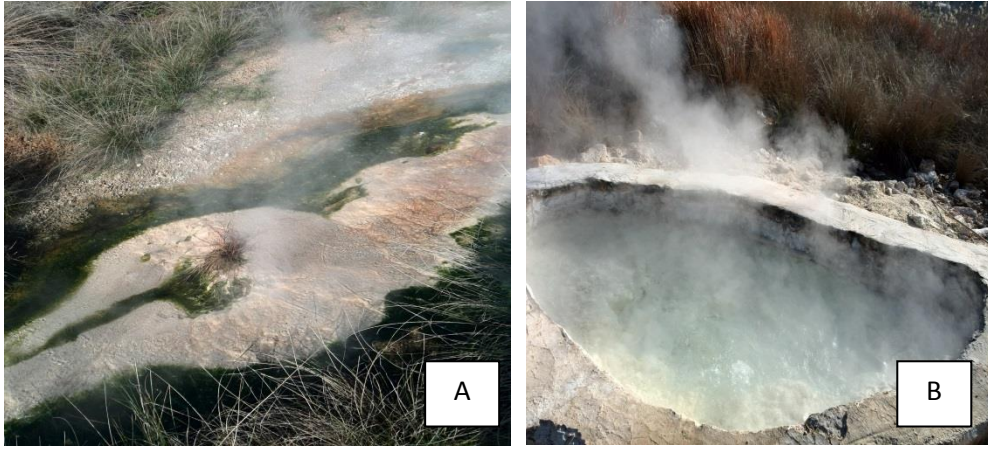
Şekil 1.11. FAME analiz basamakları

2. MATERYAL VE YÖNTEM

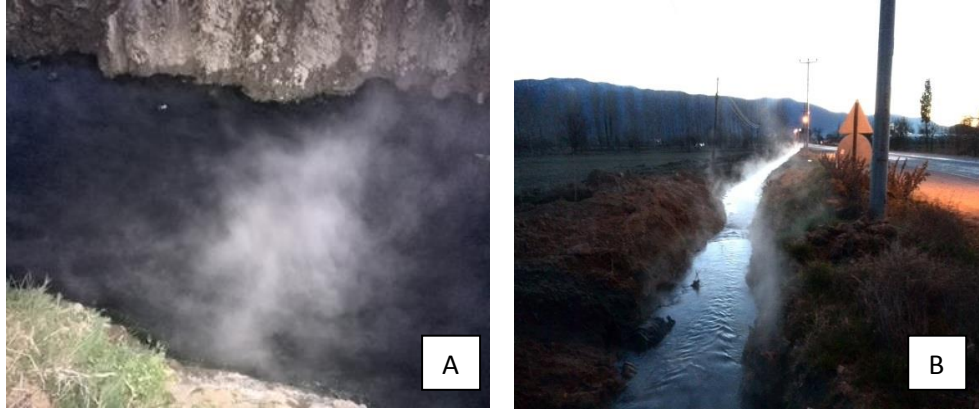
2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan termal su örnekleri

Termal su örnekleri Balıkesir (Sındırgı, Güre, Havran) ve Kütahya (Eynal) kaplıcalarından 2014 yılı Şubat ve Ağustos aylarında alınmıştır.



Şekil 2.1. A ve B- Balıkesir-Sındırgı kaplıcaları örnekleme alanı



Şekil 2.2 A- Balıkesir-Güre kaplıcaları örnekleme alanı B- Kütahya-Eynal kaplıcaları örnekleme alanı.

2.1.2. Kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. %0,2 Nutrient Broth

Nutrient broth	0,2 gr
Distile su	100 ml

Nutrient broth distile su içerisinde çözünmüş ve 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Panda ve ark. 2013).

2.1.2.2. Low Phosphate Basal Salt Medium (LPBM)

NH ₄ Cl	1 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0,1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 gr
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,2 gr
Maya ekstraktı	0,5 gr
Distile su	1 lt

Formüle besiyeri hazırlanmış ve 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Mohagheghi ve ark. 1986).

2.1.2.3. Luria Bertani (LB) besiyeri

Trypton	10 gr
Maya ekstraktı	5 gr
NaCl	10 gr

Formüle besiyeri hazırlanmış ve 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması için %2 agar ilavesi besiyeri bileşimine eklenmiştir (Bertani ve ark. 1951).

2.1.2.4. Nutrient Agar

Et ekstraktı	5 gr
Pepton	3 gr
Agar	13 gr
Distile su	1 lt

Formüle besiyeri distile su içerisinde çözünmüş ve 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Panda ve ark. 2013).

2.1.2.5. Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri

Kazein pepton (pankreatik)	15 gr
NaCl	5 gr
Soya peptone (Papainik)	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1 lt

Formüle besiyeri distile su içerisinde çözünmüş ve 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Yoon 2006).

2.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.1.3.1. Tris Asetat EDTA (TAE) tamponu pH:8 50X

Trizma Base	242 gr
Glasiyel Asetik Asit	57.1 ml
EDTA (0,5 M) pH:8	100 ml

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH ı 8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilerek kullanılmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.2. Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu pH:8 10X

Trizma Base	108 gr
Borik Asit	55 gr
EDTA	8.3 gr

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH ı 8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilerek kullanılmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.3. Liziz tamponu pH: 8,3

Tris-HCl pH:7.5	50 mM
NaCl	400 mM
EDTA	40 mM
Sükroz	0,75 M

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH ı 8,3'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiş ve cam şişe içerisinde saklanmıştır (Boutte ve ark. 2005).

2.1.3.4. %10 Amonyum Persülfat solüsyonu

Amonyum persülfat	10 gr
Distile su	100 ml

Çözelti buz üzerinde hazırlanmış ve daha sonra küçük hacimlerde ependorflara paylaştırılarak -20 °C'de saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.5. Kristal Viyole boyası

Kristal viyole	2 gr
%95 Etil alkol	20 ml
Amonyum oksalat	0,8 gr
Distile su	80 ml

Kristal viyole %95 lik etil alkolde çözülmüş, amonyum oksalat ise distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış daha sonra bu iki çözelti biraraya getirilerek kullanılmıştır (Tamer ve ark. 1989).

2.1.3.6. Lügol çözeltisi

İyot	1 gr
Potasyum iyodür	2 gr
Distile su	300 ml

(Tamer ve ark., 1989).

2.1.3.7. Safranin Boyası

Safranin	0,25 gr
%95 lik Etil alkol	10 ml

Safranin etanol içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Tamer ve ark. 1989).

2.1.3.8. PBS 10X

NaCl	80 gr
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	11,5 gr
KCl	2 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr

Bütün bileşenler balon joje içerisinde bir miktar distile su ile çözüldürülüp son hacim 1 lt ye distile su ile tamamlanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.9. In Situ Hybridization Buffer

NaCl (5M)	360 µl
Tris-HCl pH:8 (1M)	40 µl
Formamid	700 µl
%10 SDS	2 µl
Ultra Saf Su	900 µl

Bütün bileşenler 2 ml lik ependorf tüp içerisinde karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir (Anton, 1999).

2.1.3.10. Yıkama tamponu (FISH için)

Tris-HCl pH:8 (1M)	1 ml
NaCl (5M)	700 µl
EDTA (0,5 M)	500 µl
%10 SDS	50 µl

Bütün bileşenler karıştırılıp son hacim ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanmadan önce 48 °C deki su banyosunda bekletilmiştir (Anton, 1999).

2.1.3.11. Lizozim solüsyonu (50 mg/ml)

Lizozim	50 mg
Steril Distile Su	1 ml

0.22 µm por çaplı filtre ile steril edildikten sonra -20 °C de saklanmıştır (Makowska-Grzyska ve ark. 2014).

2.1.3.12. %10 SDS solüsyonu

Sodyum Dodesil Sülfat	10 gr
Steril Distile Su	100 ml

SDS steril distile su içerisinde çözündürülüp oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.13. Yağ asidi analizi solüsyonları

Saponifikasyon Solüsyonu

NaOH	45 gr
Metanol	150 ml
Distile su	150 ml

Sodyum hidroksit 150 ml distile su içerisinde çözünmüştür. Üzerine 150 ml metanol eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında saklanmıştır (Ferreira ve ark. 1999).

Metilasyon Solüsyonu

HCl (6N)	325 ml
Metanol	275 ml

Karışım oda sıcaklığında saklanmıştır (Ferreira ve ark. 1999).

Ekstraksiyon Solüsyonu

Hekzan	200 ml
Metil tert-butil eter	200 ml

Karışım oda sıcaklığında saklanmıştır (Ferreira ve ark. 1999).

Yıkama Solüsyonu

NaOH	10.8 gr
Distile Su	900 ml

Sodyum hidroksit distile su içerisinde çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır (Ferreira ve ark. 1999).

Tuz solüsyonu

NaCl 40 gr

Distile su 100 ml

Sodyum klorür distile su içerisinde çözünmüş ve karışım oda sıcaklığında saklanmıştır (Ferreira ve ark. 1999).

2.1.3.14. Çalışmada kullanılan primerler ve problar

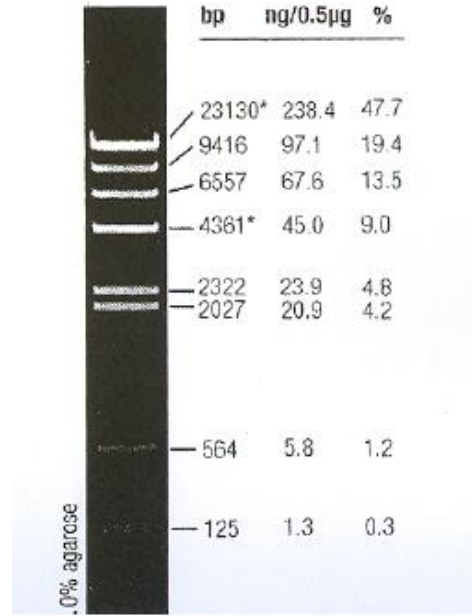
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer ve problar (Amman ve ark. 1990; Nakagawa ve ark. 2002; Rahman ve ark. 2003; Green ve Minz. 2005).

Primer Adı	5'-3' Sekans
27 F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
21 F	TCCGGTTGATCCYGCCGG
1492 R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
Arc 915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 R	GTTTTCCTCAGTCACGAC

2.1.3.15. Çalışmada kullanılan markırlar

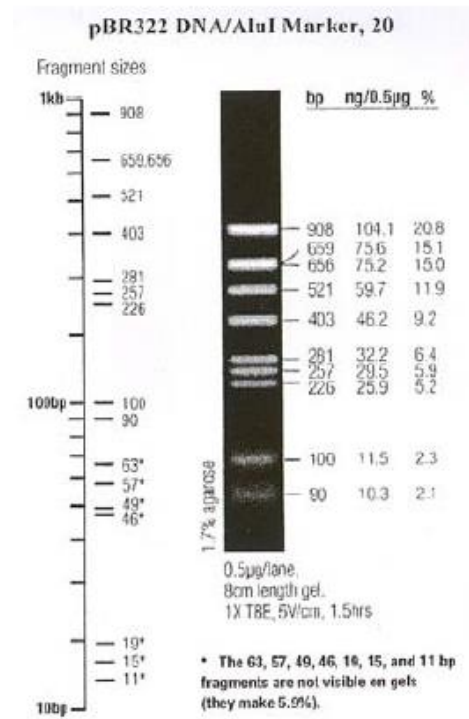
Lambda DNA/*Hind III* Markır

Lambda DNA/*HindIII* Marker, 2



Şekil 2.3. Lambda DNA/*HindIII* markır (Fermentas)

PBR 322/*Alu I* Markır



Şekil 2.4. pBR322/*Alu I* markır (Fermentas)

2.2. Yöntem

2.2.1. Termal su örneklerinin alınması

Termal su örnekleri Balıkesir (Sındırgı, Güre, Havran) ve Kütahya (Eynal) kaplıcalarından aseptik koşullar altında alınmış sıcaklıkları ölçülmüş ve aynı gün içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

2.2.2. Termal su örneklerinin kimyasal analizi

Termal su örneklerinin pH ölçümü laboratuvarında gerçekleştirildikten sonra Na, K, Mg, Ca, Mn ve Fe iyonlarının kimyasal analizleri Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM)'nde yapılmıştır.

2.2.3. Termal su örneklerinden termofilik bakteri ve arkeaların izolasyonu

Termofilik bakteri ve arkea izolasyonu için 1 lt termal su örneği 0,22 µm gözenek çaplı filtrelerden geçirilerek %0,2 NB ve LPBM besiyerlerine bu filtreler inoküle edilerek 55 ve 70 °C sıcaklıkta çalkalamalı etüvde 120 rpm hızında 3-4 hafta süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda NA petrilere üzerine yayma ekim yapılmış ve farklı koloniler seçilerek %20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerinde -80 °C de stoklanmıştır.

2.2.4. İzolatların identifikasyonu

2.2.4.1. Mikroskopik inceleme

Elde edilen izolatların Gram boyaması yapılarak Gram reaksiyonları saptanmış ve mikroorganizmaların morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

2.2.4.2. Moleküler identifikasyon

İzolatlardan genomik DNA ekstraksiyonu

İzolatlardan genomik DNA'nın ekstraksiyonu için Machrey Nagel Genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için,

- 1 ml kültür 5 dk 8,000 xg de santrifüj edilmiş,
- Süpernatant atılmış,
- Pellet 180 µl T1 buffer ile pipetlenerek resüspanse edilmiş,
- Üzerine 25 µl Proteinaz K eklenerek kuvvetlice vortekslenmiş
- 56 °C de 1-3 saat inkübe edilmiş,
- Örnek vortekslenmiş ve 200 µl B3 buffer eklenmiştir. Daha sonra kuvvetlice vortekslenmiş ve 70 °C de 10 dk inkübe edilmiş,
- 210 µl %96 lık etanol eklenmiş ve kuvvetlice vortekslenmiş,
- NucleoSpin Tissue kolon toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra örnek kolona yüklenmiş ve 11,000 xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yeni bir toplama tüpü kolona yerleştirilmiş,
- 500 µl BW buffer kolona yüklenmiş ve 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yeni bir toplama tüpü kolona yerleştirilmiş,
- 600 µl B5 buffer kolona yüklenerek 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yeni bir toplama tüpü kolona yerleştirilmiş,
- 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve elüsyon için 1,5 ml hacimli ependorf tüp kolona yerleştirilmiş.
- 100 µl BE buffer eklenir ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiş ve 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplanan elüent -20 °C de saklanmıştır.

İzolatların 16S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu

İzolatların 16S rRNA PZR amplifikasyonu için evrensel primerler (27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 21F TCCGGTTGATCCYGCCGG ve 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT) ve 2X PZR Master Mix kullanılmıştır. PZR reaksiyonu için 25 µl hacimde reaksiyon kurulmuştur.

2X PZR Master Mix	12,5 µl
İleri primer (21F/27F) (10 µmolar)	1 µl
Geri primer (1492R) (10 µmolar)	1 µl
DNase RNase free distile su	değişken
Genomik DNA	1-10,5 µl
Toplam	25 µl

Reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir;

94°C.....3 dakika (Denatürasyon)

94°C.....30 saniye	} 30 döngü
55°C.....1 dakika	
72°C.....1 dakika	

72°C.....10 dakika

4°C.....Süresiz

Elde edilen PCR ürünleri %1 lik agaroz jele 1X'lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde 90V akım uygulanarak gözlenmiştir. Oluşan ürün boyutunu saptayabilmek için marker olarak Lambda DNA/Hind III kullanılmıştır (Anton ve ark. 1999).

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA PZR ürününün Amplified Ribosomal DNA Restriksiyon analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA PZR ürünü kalıp olarak kullanılmıştır. Restriksiyon analizi için *Mbo* I enzimi kullanılmıştır. Kesim reaksiyonu için 10 µl PZR ürünü, 1 µl restriksiyon enzimi ve 2 µl CutSmart buffer kullanılmıştır. Son hacim DNase RNase free steril distile su ile 20 µl 'ye tamamlanmıştır. 37 °C de 2,5 saat inkübasyondan sonra enzimin inhibisyonu için 65 °C de 20 dk bekletilmiş ve örnekler 1X TAE içerisinde hazırlanan %2 agaroz jele yüklenerek 50 V akımda 2-3 saat yürütülmüştür. Örneklerin görünür hale getirilmesi için jel içerisine RedSafe boyası eklenmiştir. Marker olarak pBR 322 DNA/AluI (*Mbo* I Fermentas) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005).

İzolatlardan elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi

Dizi analizi için ARDRA jelinde aynı profiller gösteren izolatlardan bir tanesi seçilmiş ve amplifikasyon ürününün saflaştırılması Promega Wizard SV Gel ve PCR Clean Up kit ile yapılmıştır. Saflaştırma işlemi şu basamaklarda gerçekleşmiştir,

- PZR ürünü üzerine eşit hacimde DNA Binding Solution eklenmiş ve yavaşça tüp ters düz edilmiş,
- SV Minicolumn toplama tüpüne yerleştirilmiş,
- PZR ürünü ve DNA Binding Solution'ı içeren karışım kolona yüklenmiş ve 16,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- 700 µl Membrane Wash Solution kolona uygulanmış ve 16,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yeni bir toplama tüpü kolona yerleştirilmiş.
- 500 µl Membrane Wash Solution kolona uygulanmış ve 16,000xg de 5 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve 1,5 ml hacimde ependorf tüpü kolona yerleştirilmiş,

- Elüsyon için 50 µl DNase RNase free steril distile su kolona uygulanmış ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir,
- 16,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş ve elüent -20 °C de saklanmıştır.

İzolatların DNA Dizi Analizi

İzolatlara ait PCR ürünlerinin DNA dizi analizi MacroGen (Hollanda) firmasına yaptırılmıştır.

İzolatların Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

ARDRA analizine göre farklı restriksiyon enzim kesim profillerine sahip olan izolatlar yağ asidi metil esterleri analizi için seçilmiştir. Kültürler 60 °C sıcaklıkta TSA besiyerinde dört faz çizgi ekim yapılarak 24 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üçüncü ve dördüncü bölgeden tek kullanımlık steril öze ile 40 mg kültür alınarak vida kapaklı cam tüpe aktarılmıştır. Daha sonra saponifikasyon solüsyonundan 1ml eklenip vortekslenmiş daha sonra 5 dakika 100 °C’de beklenmiştir. Daha sonra tekrar vortekslenerek, 100 °C’de 25 dakika beklenilmiş ve hemen soğutulmuştur. Metilasyon solüsyonundan 2 ml ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. 80 °C’de 10 dakika bekledikten sonra hemen buzlu suya alınarak soğutulmuştur. Ekstraksiyon solüsyonundan 1.25 ml ilave edilmiş ve 10 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılmış sonrasında alt faz uzaklaştırılmıştır. Yıkama solüsyonundan 3 ml ilave edilmiş ve tekrar 5 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üst fazın 2/3’ü viallere aktararak Sherlock Microbial Identification System ile analiz edilmiştir (Ferreira ve ark. 1999).

2.2.5. Komünite analizleri

2.2.5.1. Termal su örneklerinden DNA izolasyonu

Termal su örnekleri 2 lt hacimde 0,22 µm gözenek çaplı steril filtrelerden (Millipore) geçirilerek filtre edilmiştir. Bu filtre 2 ml Lizis tamponu (40 mM

EDTA, 400 mM NaCl, 0,75 M süzkroz, 50 mM Tris-HCl pH: 8,3) içeren 50 ml hacimde falkon tüplere konularak DNA ekstraksiyonu yapılıncaıa kadar -20 °C de saklanmıştır (Boutte ve ark. 2005).

Filtrelerden DNA izolasyonu için şu işlem basamakları kullanılmıştır;

- Lizis tamponu içerisindeki filtre üzerine 50mg/ml konsantrasyonundaki lizozimden 50 µl eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37 °C de 20 dk inkübe edilmiştir.
- 100 µl %10'luk SDS ve 43 µl proteinaz K (14mg/ml) eklenerek 37 °C de 2 saat inkübe edilmiştir.
- 56 °C'de su banyosunda bekletilen Fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) den 2 ml eklenmiş ve 56 °C de 10 dk inkübe edilmiştir.
- 15 dk 10000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant yeni bir falkon tüpe aktarılmış ve tekrar 2 ml Fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) den 2 ml eklenmiş ve 56 °C de 10 dk inkübe edilmiştir.
- 15 dk 10 000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant yeni bir falkon tüpe aktarılmış ve üzerine 2 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve 56 °C de 20 dk inkübe edilmiştir.
- 15 dk 10 000 g'de santrifüj edilmiştir.
- 450 µl süpernatant ependorf tüpe transfer edilmiş üzerine 45 µl 3 M NaOAc ve 900 µl soğuk saf etanol eklenerek yavaşça karıştırılmış ve – 20 °C de tüm gece presipitasyona bırakılmıştır.
- 20 dk 16 000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak pellet kurutulmuş ve 30 µl DNase RNase free steril distile su ile süspanse edilerek -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.5.2. 16S rRNA'nın klonlanması

Klonlama için 16S rRNA ürünü kullanılmıştır. Klonlamadan önce amplifikasyon ürünü Promega SV Gel ve PCR Cleanup kiti ile iki kez

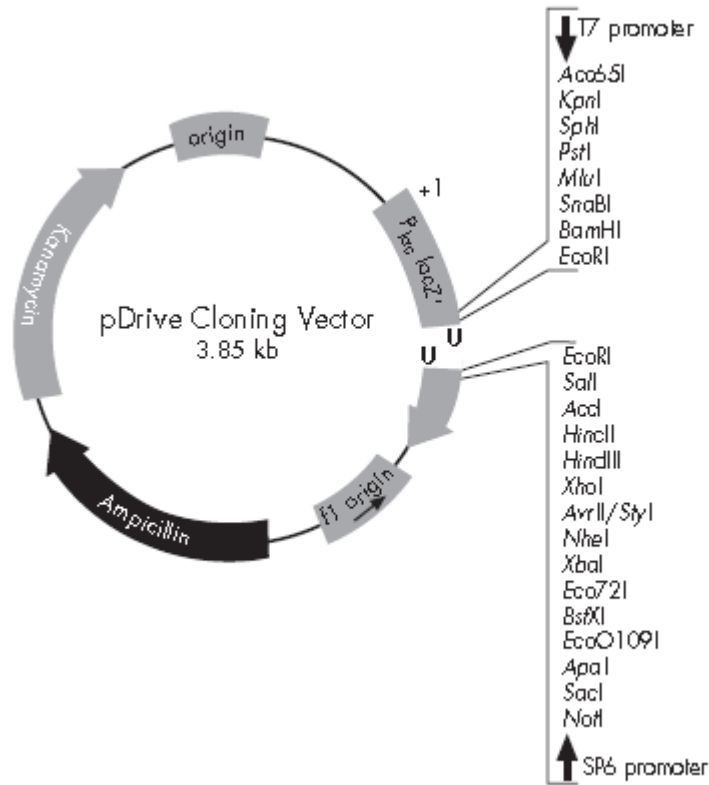
saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra PZR ürünün nanodrop değeri 97,5-195 ng/ µl olarak ayarlanmıştır.

PZR ürününün 3' ucuna Poly Adenin eklenmesi

Saflaştırılmış PZR ürünün 3' ucuna poly A kuyruğunun eklenmesi için 0,8 µl dATP (2,5 mM), 1 µl 10x Taq Buffer, 0,8 µl MgCl₂, 1 µl Taq Polimeraz, 2,4 µl dH₂O ve 4 µl PZR ürünü PZR tüpü içinde karıştırılmış ve reaksiyon 72 °C de 40 dk boyunca PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon

Klonlama için Qiagen Cloning Plus kit kullanılmıştır. Kitin içeriğinde yer alan pDrive vektöre ait restriksiyon kesim bölgeleri ve direnç genleri Şekil 2.5 de verilmiştir.



Şekil 2.5. pDrive vektör restriksiyon kesim bölgeleri ve direnç genleri

Ligasyon reaksiyonu için 10 µl hacimde reaksiyon kurulmuştur.

pDrive Cloning Vector	1 µl
PZR ürünü (97,5-195 ng/ µl)	1-4 µl
Ligation Master Mix	değişken
Distile su (DNase/RNase free)	5 µl
Toplam hacim	10 µl

Ligasyon reaksiyonu PZR cihazında 16 °C de 4 saat, 4 °C de 20 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

Transformasyon

Klonlama için QIAGEN EZ Component *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Transformasyon işlemi şu basamaklarda gerçekleştirilmiştir.

- 10 µl ligasyon ürünü QIAGEN EZ Component *E.coli* hücreleri üzerine eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır.
- Hücreler 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
- 42 °C su banyosunda 3 dk bekletilen hücreler derhal buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiştir.
- Hücreler üzerine 37 °C deki SOC Mediumdan 250 µl eklenmiş ve hücreler 37 °C de çalkalamalı inkübatörde 30 dk ön inkübasyona bırakılmıştır.
- Ampiciline (100 µg/ml), X-gal (80 µg/ml) ve 0,5 ml IPTG (100mM) içeren LB agar petripleri üzerine hücreler yayılmış ve 37 °C de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Pozitif klonların seçimi ve saflaştırılması

LB agar petripleri üzerinde gelişen beyaz koloniler pozitif klonlar olarak numaralandırılmış ve Ampiciline (100 µg/ml), X-gal (80 µg/ml) ve 0,5 ml IPTG (100 mM) içeren yeni bir LB agar petripleri üzerine ekilmiştir. 37 °C de 18 saat inkübasyondan sonra beyaz renkli koloniler %20 gliserol içeren LB broth içerisinde stoklanmış ve -20 °C de saklanmıştır.

Klonların doğru ürün büyüklüğünde inserte sahip olup olmadığını kontrolü için M13F/M13R primerler ile koloni PZR gerçekleştirilmiştir.

2X PZR Mix	12.5 µl
M13 F primer (10 pmol)	1 µl
M13 R primer (10 pmol)	1 µl
Distile su (DNase/RNase free)	10.5 µl
Toplam hacim	25 µl

Reaksiyon koşulları;

94°C.....5 dakika (Denatürasyon)

94°C.....30 saniye	} 25 döngü
55°C.....30 saniye	
72°C.....30 saniye	

72°C.....7 dakika

4°C.....Süresiz

Plazmid DNA ekstraksiyonu

GE Healthcare Illustra Plazmid Mini Spin Kit kullanılarak pozitif klonlardan plazmit DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1,5 ml sıvı kültür ependorf tüpe alınmış ve 16,000 g 'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- Pellet üzerine 175 µl tip 7 lizis buffer eklenerek resüspanse edilmiştir.
- 175 µl tip 8 lizis buffer eklenip yavaşça karıştırılmıştır.
- 350 µl tip 9 lizis buffer eklenerek tüp ters düz edilmiştir.
- 16,000 g'de 4 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kolona aktararak 16,000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- Kolona 400 µl tip 9 lizis buffer eklenmiş ve 16,000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir.

- 400 µl tip 1 lizis buffer kolona aktarılmış ve 16,000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon boş halde 16,000 g'de 30 sn yeniden santrifüj edilmiştir.
- 100 µl tip 4 elüsyon buffer kolona aktarılmış ve oda sıcaklığında 30 sn inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonda sonra 16,000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen elüent -20 °C de saklanmıştır.

Klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)

ARDRA analizi için klonlardan elde edilen plazmid DNA kalıp olarak kullanılmış ve 16S rRNA bölgesinin PZR reaksiyonu M13F/M13R primerleri ile daha önce belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 16S rRNA PZR ürününün ARDRA analizi *Mbo* I enzimi ile daha önce belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir (Boutte ve ark. 2005).

2.2.5.3. Flourescent In Situ Hybridization (FISH)

Termal su örneklerinin mikrobiyal kompozisyonunu belirlemek için FISH tekniği uygulanmıştır.

Fiksasyon

1 ml termal su örneği üzerine 240 µl (%37) Formaldehit eklenerek yavaşça karıştırılmış ve fiksasyon için +4 °C de 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 0,22 µm gözenek çaplı filtreden geçirilmiş üzerinden 5 ml PBS geçirilmiştir. Son olarak 10 ml PBS solüsyonu ile filtreler yıkanmış ve holderdan çıkarılarak steril kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

Hibridizasyon

Hibridizasyon işlemi için filtre 8 eşit parçaya bölünmüş ve bir parça filtre üzerine 18 µl hibridizasyon tamponu ve 2 µl prob (50ng/µl) ilave edilmiştir. Hibridizasyon işlemi için hibridizasyon fırınında 2 saat 46 °C de inkübe edilmiştir.

Hibridizasyon işleminden sonra filtreler 48 °C deki yıkama tamponu içine alınarak 15 dk yıkanmıştır. Filtreler kurutma kağıdı üzerine alınarak kurutulmuş ve DAPI boyaması basamağına geçilmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

DAPI boyama

Filtreler üzerine 40 µl DAPI çalışma solüsyonu eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra filtreler önce absolute alkol ile daha sonra steril distile su ile yıkanmıştır. Filtreler kurduktan sonra lam üzerine alınmış ve bir damla Citifluor ile kapatılarak epiflouresan mikroskopta incelenmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

3. BULGULAR

3.1. Termal Su Örneklerinin Kimyasal Analizi

Termal su örneklerinin pH değerleri ve Perkin Elmer Optical Emission Spectrofotometer Optima 4300 DV cihazı ile yapılan ICP kimyasal analiz sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Termal su örneklerinin pH değerleri ve kimyasal analiz sonuçları

Örnek Kodu	Na	K	Mg	Ca	Mn	Fe	pH	°C
Sındırgı 1. örnekleme	372.7 ppm	23.18 ppm	4.310 ppm	20.29 ppm	10.45 ppb	818.5 ppb	7.38	96
Eynal 1. örnekleme	1054 ppm	66.38 ppm	3.919 ppm	18.95 ppm	18.77 ppb	1.703 ppm	7.54	72
Güre 1. örnekleme	262.2 ppm	5.695 ppm	275 ppb	30.20 ppm	30.85 ppb	27.51 ppb	8,04	65
Havran	289.8 ppm	9.301 ppm	152.9 ppb	18.39 ppm	< 1 ppb	379.5 ppb	7.80	62
Sındırgı 2. örnekleme	305.33 ppm	21.49 ppm	2.91 ppm	14.34 ppm	<0 ppb	8.60 ppb	7.13	91
Eynal 2. örnekleme	311.86 ppm	51.12 ppm	12.23 ppm	42.34 ppm	<0 ppb	172.20 ppb	7.8	67
Güre 2. örnekleme	212.74 ppm	5.19 ppm	0.17 ppm	14.50 ppm	22.212 ppb	10.108 ppb	7.92	60

ppm: milyonda kısım

ppb:milyarda kısım

Çizelge 3.1 de görüldüğü gibi Sındırgı termal su örneğinin Şubat-Ağustos ayı pH değeri 7.38 – 7.13, Na iyonu değeri 372.7 - 305.33 ppm, K iyonu 23.18 -21.49 ppm, Mg iyonu 4.31 - 2.91 ppm, Ca iyonu 20.29 - 14.34 ppm, Mn iyonu 10.45 - 0 ppm, Fe iyonu 818.5 -8.6 ppb olarak bulunmuştur.

Eynal termal su örneğinin Şubat-Ağustos ayı pH değeri 7.68 – 7.54, Na iyonu değeri 1054 – 311.86 ppm, K iyonu 66.38 – 51.12 ppm, Mg iyonu 3.919 –

12.23 ppm, Ca iyonu 18.95 – 0 ppm, Mn iyonu 18.77 – 0 ppb, Fe iyonu 1.703 – 172.20 ppb olarak bulunmuştur.

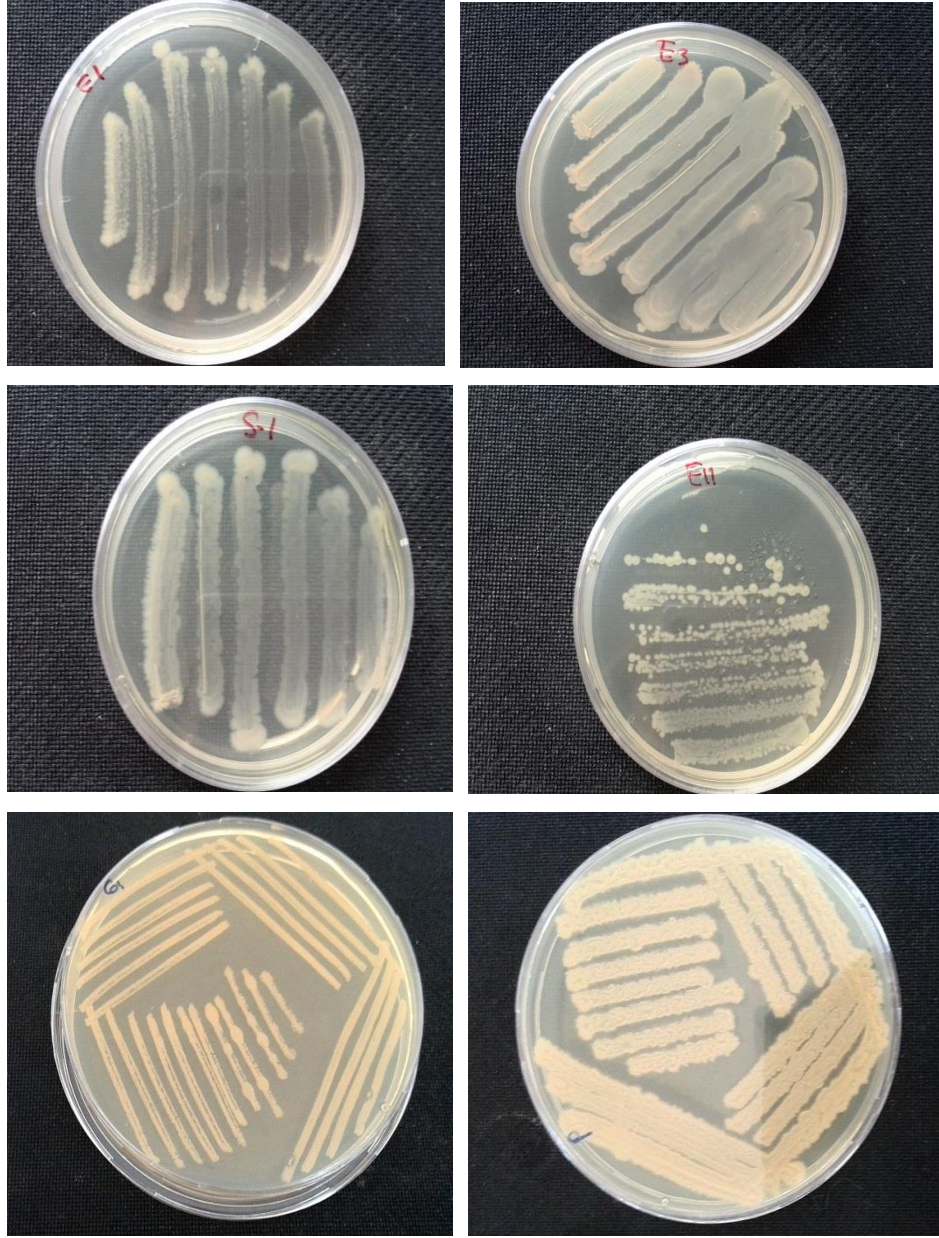
Güre termal su örneğinin Şubat-Ağustos ayı pH değeri 8.04 – 7.92, Na iyonu değeri 262.2 – 212.74 ppm, K iyonu 5.695 – 5.19 ppm, Mg iyonu 0.275 – 0.17 ppm, Ca iyonu 30.2 – 14.5 ppm, Mn iyonu 30.85 – 22.212 ppb, Fe iyonu 27.51 – 10.108 ppb olarak bulunmuştur.

Havran termal su örneğinin Şubat ayı pH değeri 7.8 Na iyonu değeri 289.8 ppm, K iyonu 9.301 ppm, Mg iyonu 152.9 ppm, Ca iyonu 18.39 ppm, Mn iyonu <1 ppb, Fe iyonu 379.5 ppb olarak bulunmuştur.

3.2. Termal Su Örneklerinden Termofilik Bakteri ve Arkea İzolasyonu

Termal su örnekleri 0.2 µm gözenek çaplı steril (Millipore) filtrelerden geçirilmiş ve filtreler %0.2 NB ve LPBM besiyerlerine inoküle edilmiştir. 55 ve 70 °C de 3-4 hafta inkübasyondan sonra NA petrilere yayma ekim yapılarak farklı morfolojideki koloniler seçilmiş ve tekrar NA petrilere ekilerek saf izolatlar elde edilmiştir.

İzolasyon işlemi sonucunda Sındırgı bölgesi birinci örneklemeden 6, Eynal bölgesi birinci örneklemeden 6, Güre bölgesi birinci örneklemeden 9, Havran bölgesinden 13, Sındırgı bölgesi ikinci örneklemeden 6, Eynal bölgesi ikinci örneklemeden 21 ve Güre bölgesi ikinci örneklemeden 5 farklı koloni morfolojine sahip izolat elde edilmiştir. Şekil 3.1. de elde edilen bazı izolatların petri görüntüleri verilmiştir.

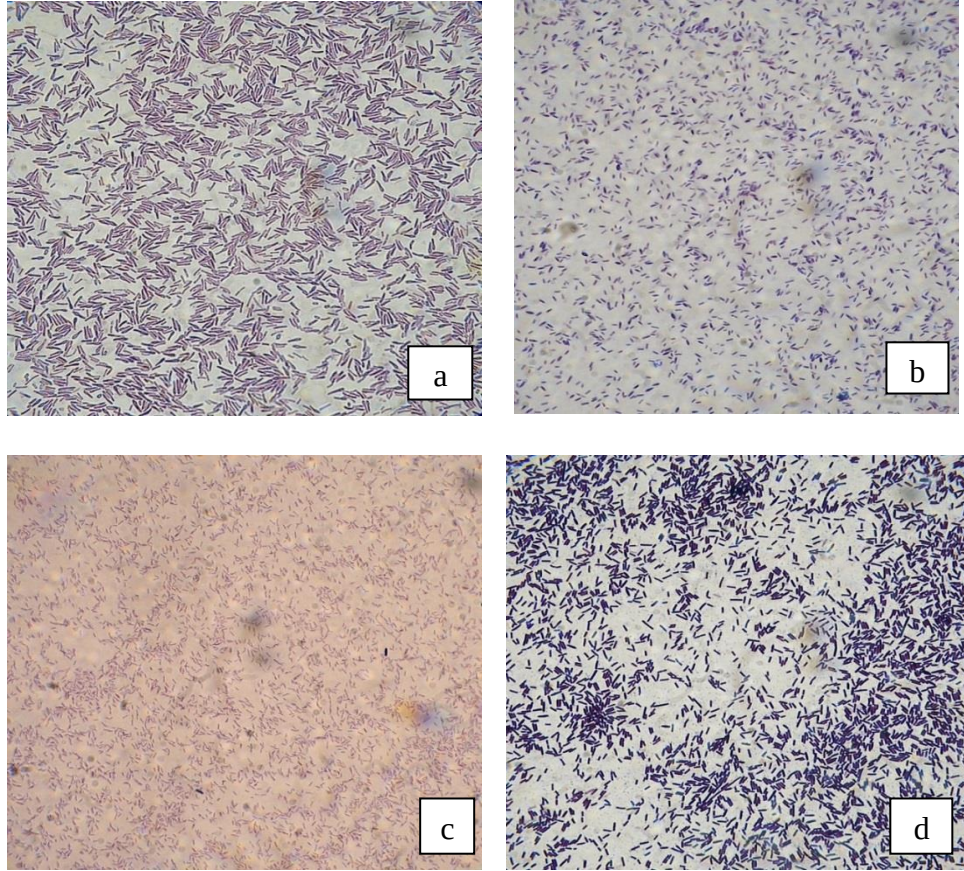


Şekil 3.1. Bazı izolatlara ait petri görüntüleri

3.3. İzolatların İdentifikasyonu

3.3.1. Mikroskopik inceleme

İzolatların gram reaksiyonları gram boyama ile belirlenmiştir. Gram boyama sonuçlarına göre izolatların Gram (+), ve Gram (-) uzun ve kısa basil morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Çizelge 3.2 de izolatların gram reaksiyonları ve morfolojileri özetlenmiştir.



Şekil 3.2. İzolatların Gram boyama reaksiyonları (a) Gram pozitif basil (b) Gram pozitif basil (c) Gram negatif basil (d) Gram pozitif basil

Çizelge 3.2. İzolatların gram reaksiyonu ve morfolojileri

İzolat Numarası	Gram Reaksiyonu	Morfolojisi
S1	+	Kısa, kalın basil
S2	+	Uzun, ince basil
S3	+	Uzun, ince basil
S4	+	Uzun, ince basil
S5	+	Kısa, kalın basil
S6	+	Uzun, ince basil
SY1	+	Kısa, kalın basil
SY2	+	Kısa, kalın basil
SY3	+	Kısa, kalın basil
SY4	+	Kısa, kalın basil
SY5	+	Kısa, kalın basil
SY6	+	Kısa, kalın basil
G1	+	Kısa, kalın basil
G2	+	Uzun, kalın basil
G3	+	Kısa, kalın basil
G4	+	Kısa, kalın basil
G5	+	Kısa, kalın basil
G6	-	Kısa, kalın basil
G7	+	Kısa, kalın basil
G8	+	Kısa, kalın basil
G9	+	Kısa, kalın basil
GY1	+	Uzun, ince basil
GY2	+	Uzun, ince basil
GY3	+	Kısa, kalın basil
GY4	+	Uzun, ince basil
GY5	+	Uzun, ince basil
H1	+	Uzun, ince basil
H2	+	Uzun, ince basil
H3	+	Uzun, ince basil
H4	+	Uzun, ince basil
H5	+	Uzun, ince basil
H6	+	Kısa basil
H7	+	Kısa, kalın basil
H8	+	Uzun, ince basil
H9	+	Uzun, kalın basil
H10	+	Uzun, ince basil
H11	+	Uzun, kalın basil
H12	+	Kısa, kalın basil
H13	+	Uzun, ince basil
E1	+	Kısa, kalın basil
E2	+	Uzun, ince basil
E3	+	Uzun, ince basil
E4	+	Uzun, ince basil
E5	+	Uzun basil
E6	+	Uzun basil
EY1	+	Uzun, ince basil
EY2	+	Uzun, ince basil
EY3	+	Uzun, ince basil
EY4	+	Uzun, ince basil
EY5	+	Uzun, ince basil

Çizelge 3.2.(Devam) İzolatların gram reaksiyonu ve morfolojileri

İzolat Numarası	Gram Reaksiyonu	Morfolojisi
EY6	+	Uzun, ince basil
EY7	+	Uzun, ince basil
EY8	+	Uzun, ince basil
EY9	+	Uzun, ince basil
EY10	+	Uzun, ince basil
EY11	+	Uzun, ince basil
EY12	+	Kısa, kalın basil
EY13	+	Kısa, kalın basil
EY14	+	Kısa, kalın basil
EY15	+	Uzun, ince basil
EY16	+	Kısa, kalın basil
EY17	+	Uzun, ince basil
EY18	+	İnce basil
EY19	+	Kısa, kalın basil
EY20	+	Uzun, ince basil
EY21	+	Kısa, kalın basil

3.3.2. Moleküler identifikasyon

3.3.2.1. İzolatlardan genomik DNA ekstraksiyonu

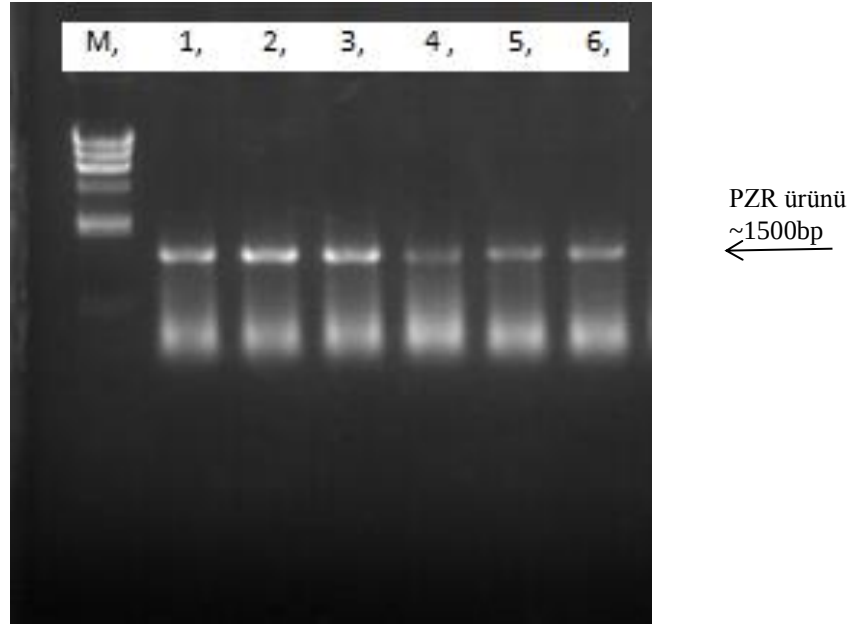
İzolatlardan genomik DNA ekstraksiyonu için Machrey Nagel Genomik DNA izolasyon kiti kullanılmış ve yöntemin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

İzolatların 16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Amplifikasyonu

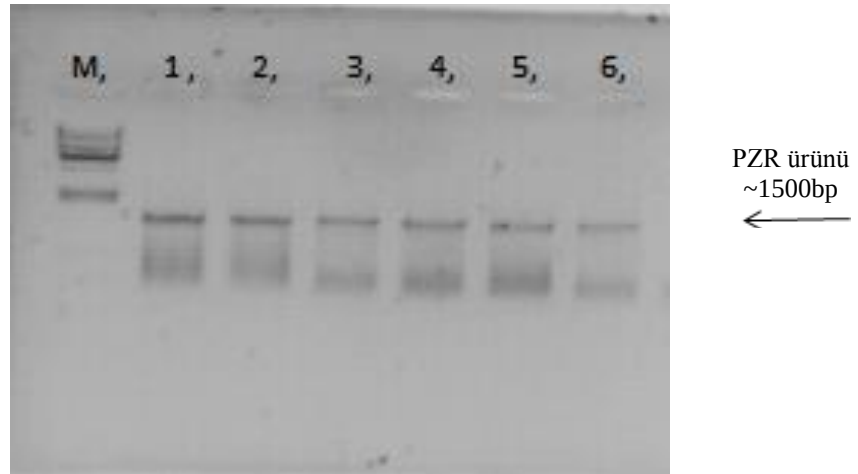
Termal su örneklerinden izole edilen izolatların 16S rRNA polimeraz zincir reaksiyonu evrensel primerler (27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 21F TCCGGTTGATCCYGCCGG ve 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT) ve 2X PZR Master Mix kullanılarak 2.2.4.2 'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. PZR sonrası elde edilen ürünler %1 lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Sındırgı bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 6 izolatın (Şekil 3.3), Eynal bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 6 izolatın (Şekil 3.4), Güre bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 9 izolatın (Şekil 3.5), Havran bölgesinden elde

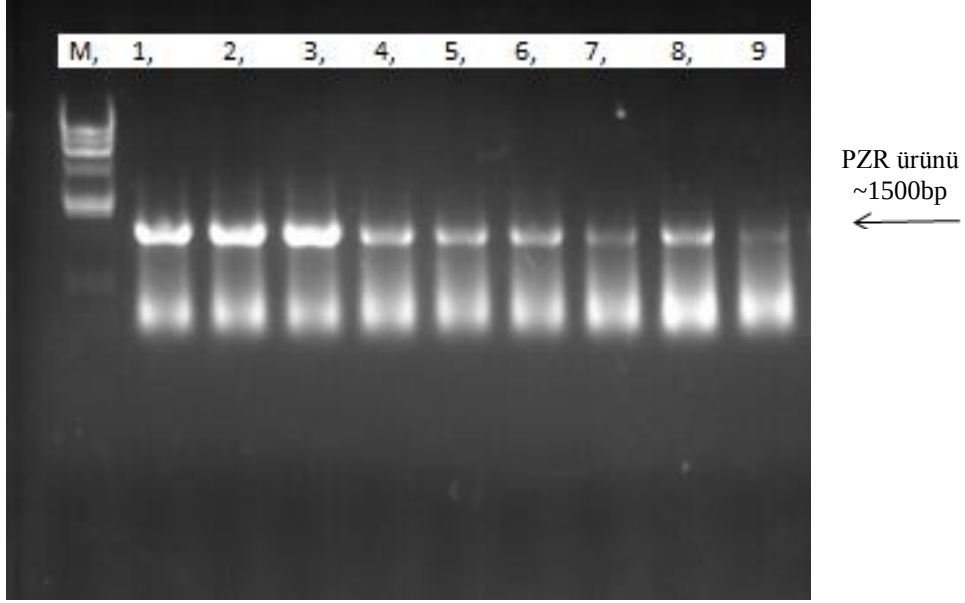
edilen 13 izolatın (Şekil 3.6), Sındırgı bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 6 izolatın (Şekil 3.7), Eynal bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 21 izolatın (Şekil 3.8) ve Güre bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 5 izolatın (Şekil 3.9) PZR amplifikasyonu sonucunda Bacteria primeri ile çoğaldığı ancak Archaea primeri ile çoğalmadığı görülmüştür.



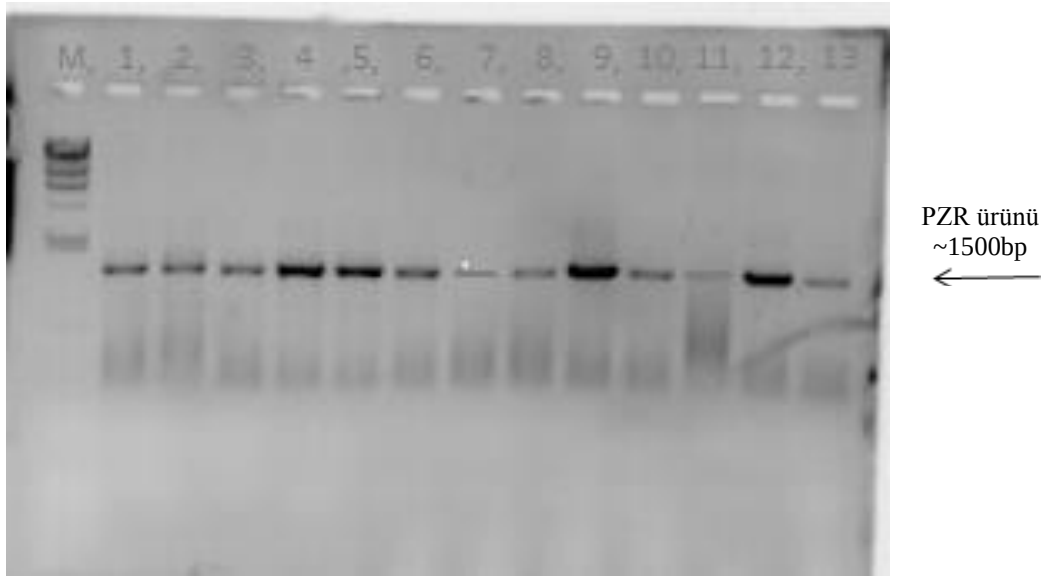
Şekil 3.3. Sındırgı birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



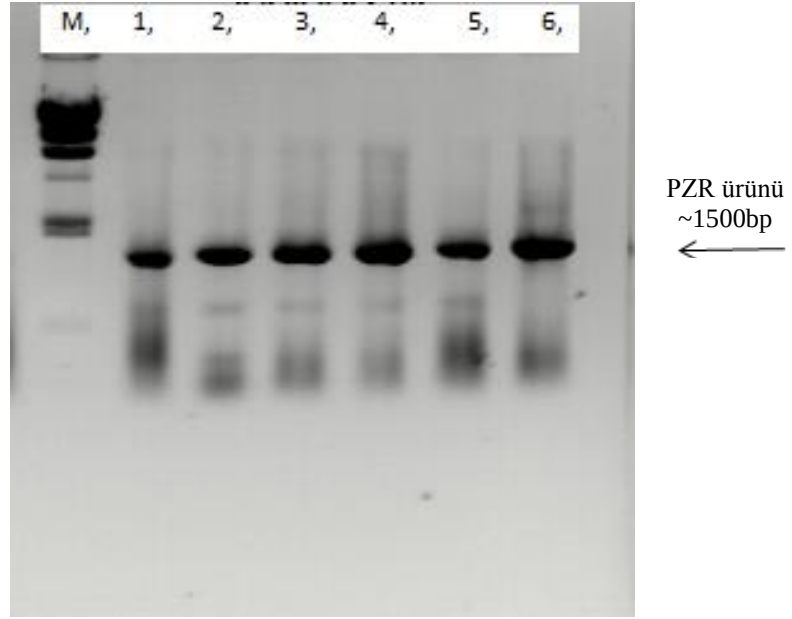
Şekil 3.4. Eynal birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



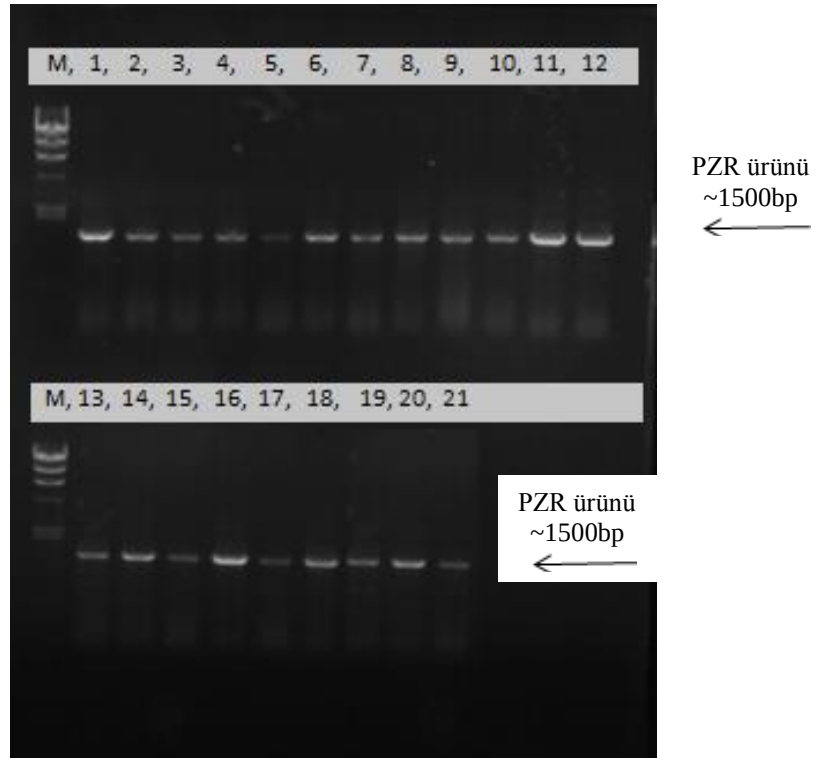
Şekil 3.5. Güre birinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



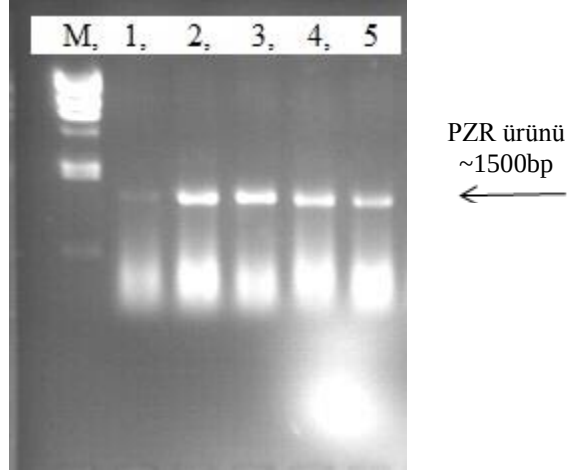
Şekil 3.6. Havran'dan izole edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



Şekil 3.7. Sındırgı ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



Şekil 3.8. Eynal ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker



Şekil 3.9. Güre ikinci örnekleme ile elde edilen izolatlara ait genomik DNA'nın 27F/1492R primerleri ile elde edilen PZR görüntüsü M: Lambda DNA/*Hind III* Marker

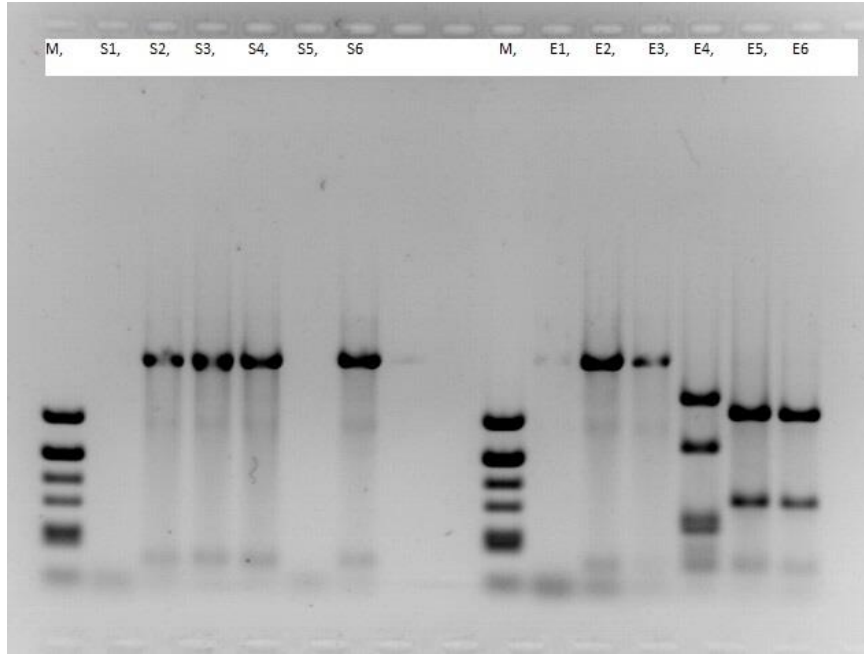
İzolatlardan elde edilen 16S rRNA PZR ürününün Amplified Ribosomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA PZR ürününün restriksiyon analizi için *Mbo* I enzimi kullanılmış ve reaksiyon 2.2.4.2 'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen ürünler %2 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jele yüklenmiş ve 50 V akımda 2-3 saat elektroforez sonrasında farklı profiller belirlenmiştir. Bunun sonucunda Sındırgı bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 6 izolattan 2 farklı profil (Şekil 3.10), Eynal bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 6 izolattan 2 farklı profil (Şekil 3.10), Güre bölgesi birinci örneklemeden elde edilen 9 izolattan 6 farklı profil (Şekil 3.11), Havran bölgesinden elde edilen 13 izolattan 6 farklı profil (Şekil 3.12), Sındırgı bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 6 izolattan 2 farklı profil (Şekil 3.13), Eynal bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 21 izolattan 11 farklı profil (Şekil 3.14) ve Güre bölgesi ikinci örneklemeden elde edilen 5 izolattan 2 farklı profil (Şekil 3.13) elde edilmiştir. Bütün profiller karşılaştırıldığında toplam 22 farklı ARDRA grup profili elde edilmiştir. Bu profiller Çizelge 3.3 'de verilmiştir.

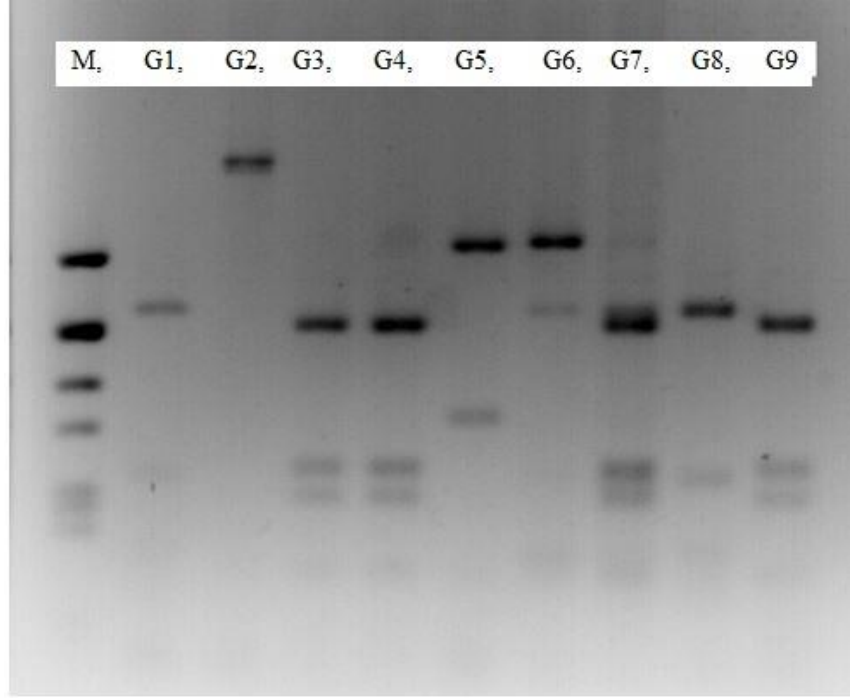
Çizelge 3.3’de görüldüğü gibi en fazla üye içeren grupların 2 ve 13 numaralı ARDRA grupları olduğu görülmektedir. Ayrıca diğer profil gruplarının bölgelere özgü olduğu görülmektedir.

Şekil 3.10 ‘da görüldüğü gibi S2, S3, S4, S6, E2 ve E3 nolu izolatlar aynı ARDRA profilini, S1, S5 ve E1 aynı ARDRA profilini, E5 ve E6 aynı ARDRA profilini ve E4 ise tek başına farklı bir ARDRA profilini oluşturmuştur.



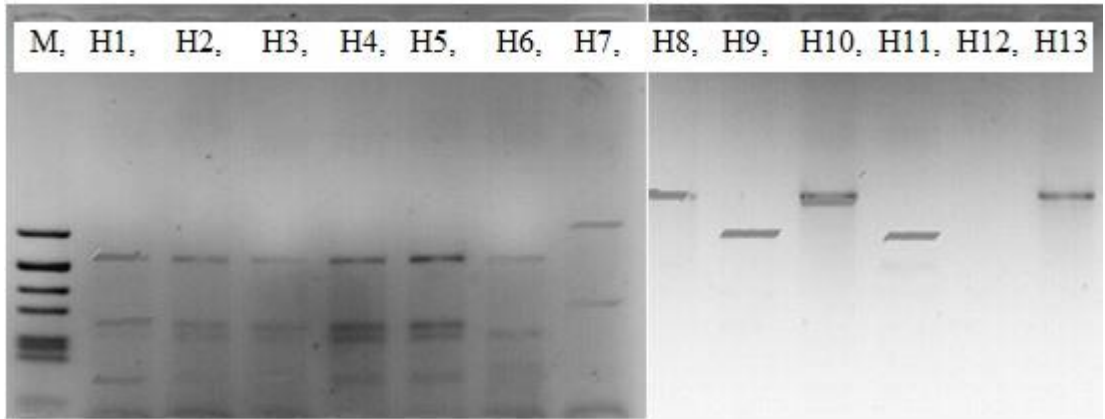
Şekil 3.10. Sındırgı ve Eynal birinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait *Mbo* I ARDRA görüntüsü M: pBR322/*Alu*I Marker

Şekil 3.11 de görüldüğü gibi G1 ve G8 aynı ARDRA profilini; G3, G4, G7 ve G9 aynı ARDRA profilini oluşturmuştur. G2; G5; G6 ise tek başlarına birbirinden farklı ARDRA profilini oluşturmuştur.



Şekil 3.11. Güre birinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait *Mbo* I ARDRA görüntüsü M: pBR322/*Alu*I Marker

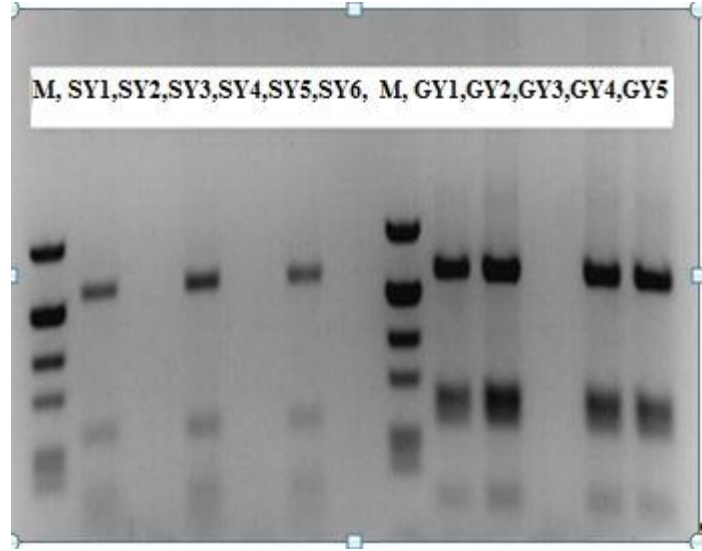
Şekil 3.12’ de H1, H2, H3, H4 ve H5 aynı ARDRA profiline, H8, H10 ve H13 aynı ARDRA profiline, H9 ve H11 aynı ARDRA profiline sahip olduğu H6; H7ve H12 ‘nin tek başlarına birbirinden farklı ARDRA gruplarını oluşturduğu görülmüştür.



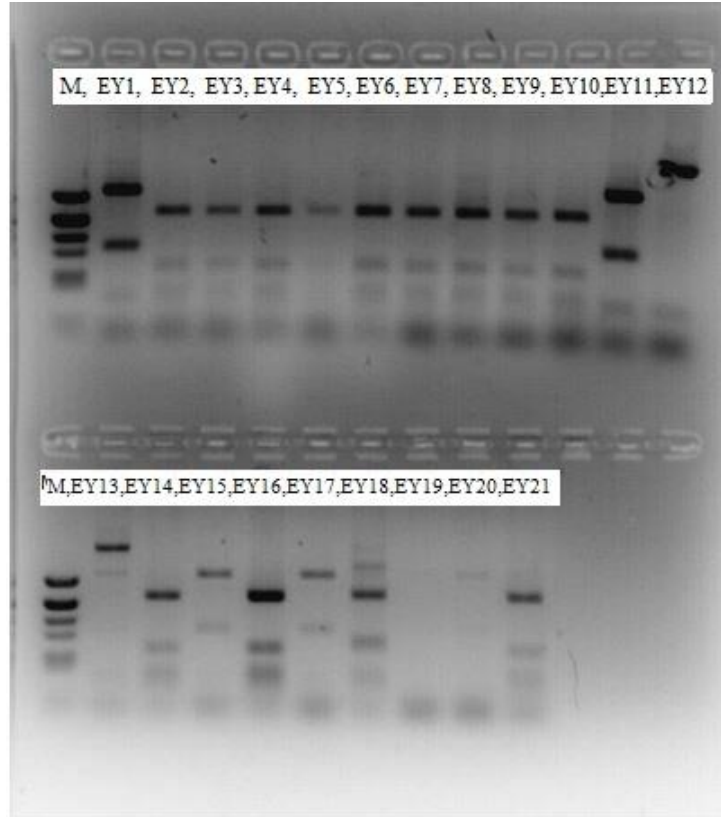
Şekil 3.12. Havran örneklemesinden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait *Mbo* I ARDRA görüntüsü M: pBR322/*Alu*I Marker

Şekil 3.13’de Sındırgı ve Güre ikinci örneklemeden elde edilen izolatlara ait ARDRA profilleri verilmiştir. SY1, SY3, SY5 aynı ARDRA profiline; SY2,

SY4, SY6 ve GY3 aynı ARDRA profiline ve GY1, GY2, GY4, GY5 kodlu izolatlar aynı ARDRA profiline sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 3.13. Sındırgı ve Güre ikinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait *Mbo* I ARDRA görüntüsü M: pBR322/*Alu*I Marker



Şekil 3.14. Eynal ikinci örneklemeden elde edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait *Mbo* I ARDRA görüntüsü M: pBR322/*Alu*I Marker

Şekil 3.14’de görüldüğü gibi EY1, EY11, EY15, EY17 aynı ARDRA profiline yine aynı şekilde EY2, EY3, EY4, EY5, EY6, EY7, EY8, EY9, EY10 nolu izolatlar aynı ARDRA profiline sahip olmuştur. EY14, EY16, EY21 aynı ARDRA profiline ve EY12, EY13, EY18, EY19, EY20 ise birbirinden farklı ARDRA profiline sahip olmuştur.

Tüm bu sonuçlara ait olan ARDRA grup numaraları ve izolatlar Çizelge 3.2 ‘de özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. İzolatlara ait ARDRA grup profilleri

ARDRA GRUP NUMARASI	İZOLE EDİLEN YER	İZOLAT NUMARASI
1	Sıdırgı 1. örnekleme (S), Eynal 1. örnekleme (E)	S2, S3, S4, S6, E2, E3
2	Sıdırgı 1. örnekleme (S), Eynal 1. Örnekleme (E) , Güre 2. örnekleme (GY), Sıdırgı 2. örnekleme (SY), Eynal 2. örnekleme (EY), Havran 1. örnekleme (H)	S1, S5, E1, H12, SY2, SY4, SY6,GY3, EY19
3	Eynal 1. örnekleme (E)	E4
4	Eynal 1. örnekleme (E)	E5, E6
5	Güre 1. örnekleme (G)	G1, G8
6	Güre 1. örnekleme (G)	G2
7	Güre 1. örnekleme (G)	G3, G4, G7, G9
8	Güre 1. örnekleme (G)	G5
9	Havran 1. örnekleme (H)	H1, H2, H3, H4, H5
10	Havran 1. örnekleme (H)	H6
11	Havran 1. örnekleme (H)	H7
12	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY1, EY11, EY15, EY17
13	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY2, EY3, EY4, EY5, EY6, EY7, EY8, EY9, EY10,
14	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY13
15	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY18
16	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY14, EY16, EY21
17	Sıdırgı 2. örnekleme (SY)	SY1, SY3, SY5,
18	Güre 2. örnekleme (GY)	GY1, GY2, GY4, GY5
19	Güre 1. örnekleme (G)	G6
20	Eynal 2. örnekleme (EY)	EY12
21	Eynal 2. örnekleme (EY), Havran 1. örnekleme (H)	EY20, H8, H10, H13
22	Havran 1. örnekleme (H)	H9, H11

İzolatlardan elde edilen PZR ürünlerinin Dizi Analizi

Dizi analizi için ARDRA jelinde aynı profile sahip olan izolatlardan temsili olarak bir tanesi seçilmiş ve dizi analizi MACROGEN firmasına yaptırılmıştır. Sekans analizi için 907R ve 1492R primerleri kullanılmış ve sonrasında bu diziler Bioedit 7.2.5 software programı ile birleştirilmiştir. Sekans analizine ait sonuçlar Çizelge 3.4 de verilmiştir.

İzolatların 16S rRNA gen bölgesine ait olan kısmi dizi analizleri KR864865, KR864866, KR864867, KR864868, KR864869, KR864870, KR864871, KR864872, KR864873, KR864874, KR864875, KR864876, KR864877, KR864878, KR864879, KR864880, KR864881, KR864882, KR864883 gen bankası numarası ile saklanmıştır.

Çizelge 3.4. ARDRA grup numaralarına göre 907R/1492R primerleri ile sekans analiz sonuçları

ARDRA GRUP NUMARASI	TİP	AMPLİFİKASYON PRİMERİ	SEKANS PRİMERİ	BENZERLİK	SONUÇ	GEN BANKASI NUMARASI	UZUNLU K (bp)
1	İzolat S2	27F/1492R	907R/1492R	%99	Geobacillus thermoleovorans CCB_US3_UF5 strain	NR074931.1	1434
2	İzolat S5	27F/1492R	907R/1492R	%100	Geobacillus thermoparaaffinivorans strain Et2/4	KT266806.1	1291
3	İzolat E4	27F/1492R	907R/1492R	%99	Geobacillus thermoleovorans partial 16S rRNA gene, isolate F30	AJ564612.1	1457
4	İzolat E6	27F/1492R	907R/1492R	%99	Geobacillus kaustophilus strain L14 16S ribosomal RNA gene	FJ823105.2	1211
5	İzolat G1 1766UAC014 1766UAC030	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus licheniformis strain CCMMB883 16S ribosomal RNA gene,	KF879248.1	1353
6	İzolat G2 1766UAC104 1766UAC105	27F/1492R	907R/1492R	%99	Brevibacillus thermoruber partial 16S rRNA gene, isolate SWCR50_7	KJ842630.1	1304

Çizelge 3.4. (Devam) ARDRA grup numaralarına göre 907R/1492R primerleri ile sekans analiz sonuçları

ARDRA GRUP NUMARASI	TİP	AMPLİFİKASYON PRİMERİ	SEKANS PRİMERİ	BENZERLİK	SONUÇ	GEN BANKASI NUMARASI	UZUNLUK (bp)
7	İzolat G9 1766UAC034 1766UAC014	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus licheniformis strain CCMMB883 16S ribosomal RNA gene	KF879248.1	1353
8	İzolat G5 1766UAC032 1766UAC002	27F/1492R	907R/1492R	%100	Aneurinibacillus thermoaerophilus strain AFNA 1 16S ribosomal RNA gene	EF032876.1	1341
9	İzolat H4 1766UAC036 1766UAC006	27F/1492R	907R/1492R	%99	Anoxybacillus flavithermus strain 8POT11 16S ribosomal RNA gene	KJ722464.1	1379
10	İzolat H6 1766UAC068 1766UAC071	27F/1492R	907R/1492R	%99	Bacillus sp. SWCR50_18 partial 16S rRNA gene	LN681603.1	1174
11	İzolat H7 1766UAC062 1766UAC008	27F/1492R	907R/1492R	%99	Aneurinibacillus sp. Z3 16S ribosomal RNA gene	FJ268961.1	1123
12	İzolat EY1 1766UAC047 1766UAC015	27F/1492R	907R/1492R	%97	Geobacillus sp. NBM49 16S ribosomal RNA gene	HQ703944.1	1329
13	İzolat EY5 1766UAC049 1766UAC075	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus sonorensis strain ZJY-537 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KP282741.1	1131

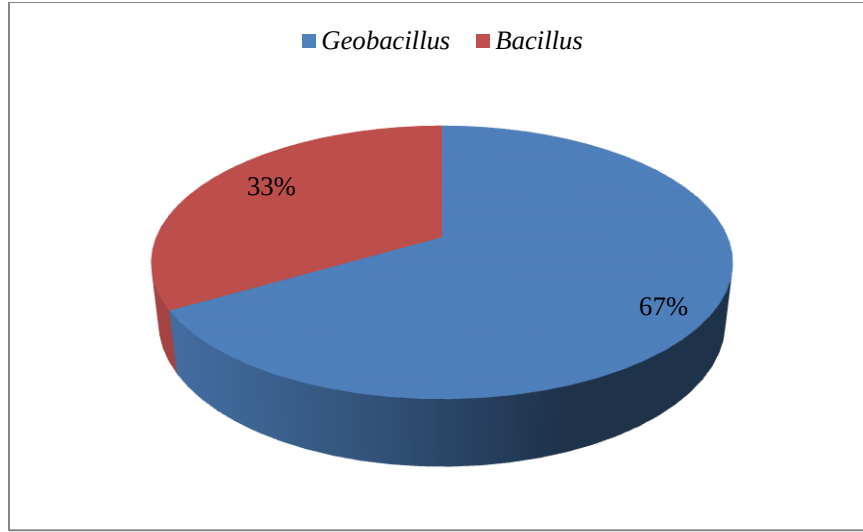
Çizelge 3.4. (Devam) ARDRA grup numaralarına göre 907R/1492R primerleri ile sekans analiz sonuçları

ARDRA GRUP NUMARASI	TİP	AMPLİFİKASYON PRİMERİ	SEKANS PRİMERİ	BENZERLİK	SONUÇ	GEN BANKASI NUMARASI	UZUNLUK (bp)
14	İzolat EY13 1766UAC051 1766UAC019	27F/1492R	907R/1492R	%100	Geobacillus thermoparaffinivorans strain Ba7 16S ribosomal RNA gene,	KC252981.1	1369
15	İzolat EY18 1766UAC064 1766UAC066	27F/1492R	907R/1492R	%100	Aeribacillus pallidus strain ET 239-1 16S ribosomal RNA gene	KR611619.1	1128
16	İzolat EY21 1766UAC057 1766UAC025	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus licheniformis strain L-5 16S ribosomal RNA gene	KJ572278.1	1284
17	İzolat SY5 1766UAC044 1766UAC027	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus licheniformis strain B26 16S ribosomal RNA gene,	GU945232.1	1192
18	İzolat GY4 1766UAC046 1766UAC029	27F/1492R	907R/1492R	%99	Anoxybacillus sp. SK3-4 16S ribosomal RNA gene	GQ184213.1	1393
19	İzolat G6 1766UAC033 1766UAC003	27F/1492R	907R/1492R	%99	Chelatococcus sp. E1 16S ribosomal RNA gene	JQ776652.1	1247
20	İzolat EY12 1766UAC108 1766UAC109	27F/1492R	907R/1492R	%100	Bacillus licheniformis strain CCMMB883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KF879248.1	1191

Çizelge 3.4. (Devam) ARDRA grup numaralarına göre 907R/1492R primerleri ile sekans analiz sonuçları

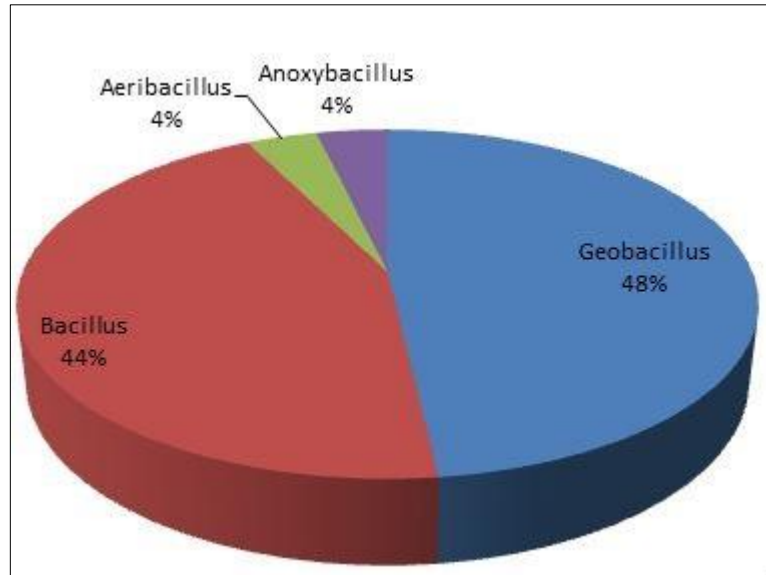
ARDRA GRUP NUMARASI	TİP	AMPLİFİKASYON PRİMERİ	SEKANS PRİMERİ	BENZERLİK	SONUÇ	GEN BANKASI NUMARASI	UZUNLUK (bp)
21	İzolat H13 1766UAC041 1766UAC118	27F/1492R	907R/1492R	%96	Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome	<u>CP000922.1</u>	1400
22	İzolat H9 1766UAC039 1766UAC010	27F/1492R	907R/1492R	%99	Brevibacillus thermoruber strain B4M 16S ribosomal RNA gene	<u>KJ722521.1</u>	1357

Sındırgı termal su örneğinin bakteriyel çeşitliliği incelendiğinde Şubat ayı örneklemesinden elde edilen 6 izolatın 4 tanesinin Grup 1 ARDRA numarasına, 2 tanesinin Grup 2 ARDRA numarasına ait olduğu görülmektedir. Ağustos ayı örneklemesinden elde edilen 6 izolatın 2 tanesinin Grup 2 ARDRA numarasına, 4 tanesinin Grup 17 ARDRA numarasına ait olduğu görülmektedir. Grup 1 ve 2 *Geobacillus* cinsine karşılık gelmekteyken, Grup 17 *Bacillus* cinsine karşılık gelmektedir. İzolatların ait olduğu cinsler yüzde olarak değerlendirildiğinde toplamda 12 izolatın % 66,6 'sının *Geobacillus* cinsine, % 33,4 'ünün ise *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmektedir (Şekil 3.15).



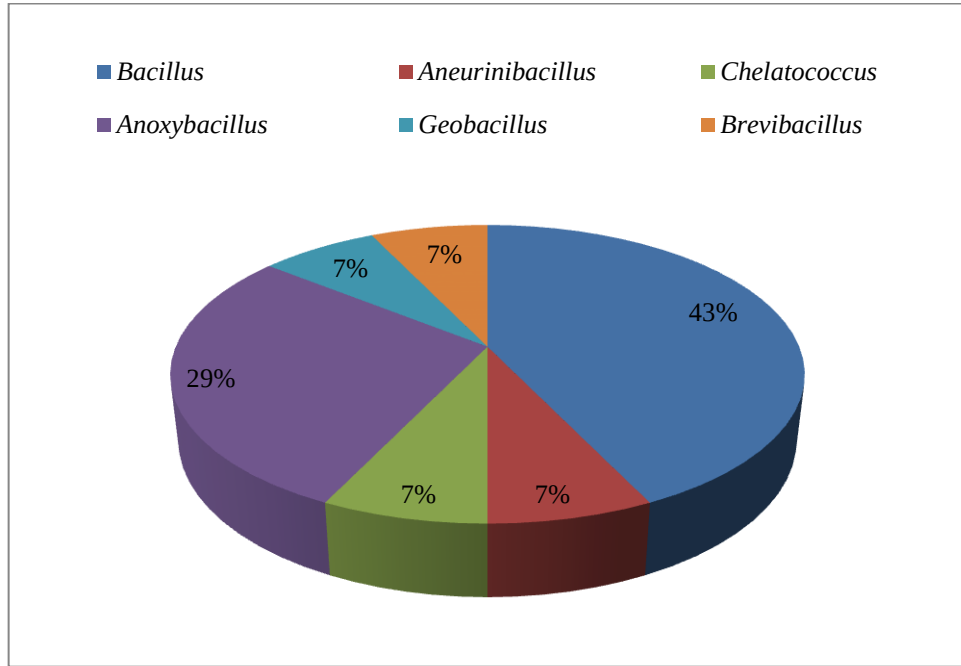
Şekil 3.15. Sındırgı bölgesinden izole edilen izolatların cinslere göre % dağılımı

Eynal Termal su örneğinin Şubat ayı örneklemesinden elde edilen 6 izolatın 2 tanesinin Grup 1 ARDRA (*Geobacillus*) numarasına, 1 tanesinin Grup 2 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 1 tanesinin Grup 3 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 2 tanesinin Grup 4 ARDRA numarasına (*Geobacillus*) ait olduğu görülmektedir. Ağustos ayı örneklemesinden elde edilen 21 tane izolatın 1 tanesinin Grup 2 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 4 tanesinin Grup 12 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 9 tanesinin Grup 13 ARDRA numarasına (*Bacillus sonorensis*), 1 tanesinin Grup 14 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 1 tanesinin Grup 15 ARDRA numarasına (*Aeribacillus*), 3 tanesinin Grup 16 ARDRA numarasına (*Bacillus*), 1 tanesinin Grup 20 ARDRA numarasına (*Bacillus*), ve 1 tanesinin Grup 21 ARDRA numarasına (*Anoxybacillus*) ait olduğu görülmektedir. İzolatların ait olduğu cinsler yüzde olarak değerlendirildiğinde toplamda 27 izolatın % 48'inin *Geobacillus* cinsine, % 44'ünün *Bacillus* cinsine, % 3,7 'sinin *Aeribacillus* cinsine ve % 3,7 'sinin *Anoxybacillus* cinsine ait olduğu görülmektedir.



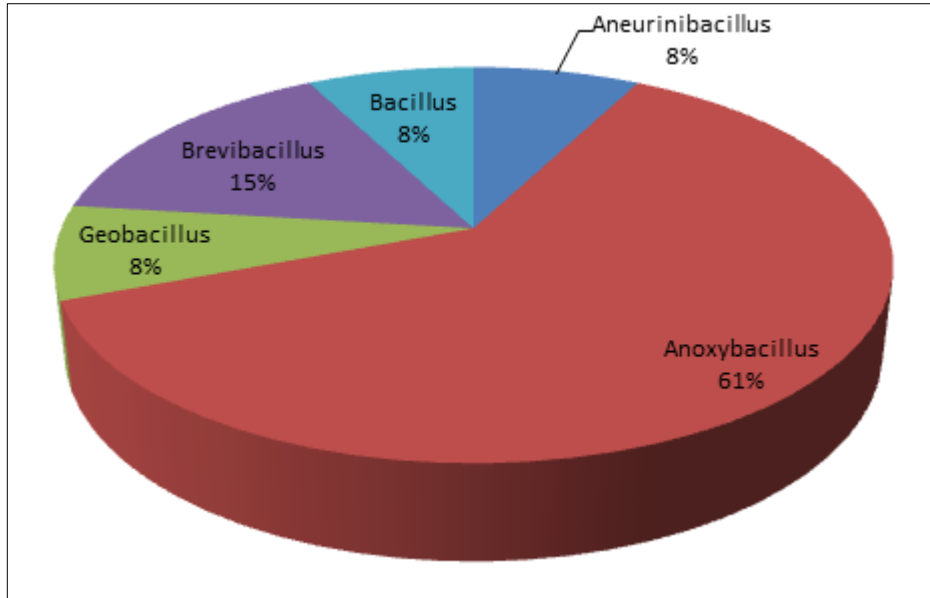
Şekil 3.16. Eynal bölgesinden izole edilen izolatların cinslere göre % dağılımı

Güre termal su örneğinin Şubat ayı örneklemesinden elde edilen 9 izolatın 1 tanesinin Grup 5 ARDRA numarasına (*Bacillus*), 1 tanesinin Grup 6 ARDRA numarasına (*Brevibacillus*), 5 tanesinin Grup 7 ARDRA numarasına (*Bacillus*), 1 tanesinin Grup 8 ARDRA numarasına (*Aneurinibacillus*), 1 tanesinin Grup 19 ARDRA numarasına (*Chelatococcus*) ait olduğu görülmektedir. Ağustos ayı örneklemesinden elde edilen 5 izolatın ise 4 tanesinin Grup 18 ARDRA numarasına (*Anoxybacillus*), 1 tanesinin ise Grup 2 ARDRA numarasına (*Geobacillus*) ait olduğu görülmektedir. İzolatların ait olduğu cinsler yüzde olarak değerlendirildiğinde toplamda 14 izolatın %42,85'inin *Bacillus* cinsine, %7,14'ünün *Aneurinibacillus* cinsine, %7,14'ünün *Chelatococcus* cinsine, %28,57'sinin *Anoxybacillus* cinsine, %7,14'ünün *Geobacillus* cinsine, %7,14'ünün *Brevibacillus* cinsine ait olduğu görülmektedir.



Şekil 3.17. Güre bölgesinden izole edilen izolatların cinslere göre ait % dağılımı

Havran termal su örneğinin Şubat ayı örneklemesinden elde edilen 13 izolatın 1 tanesinin Grup 2 ARDRA numarasına (*Geobacillus*), 5 tanesinin Grup 9 ARDRA numarasına (*Anoxybacillus*), 1 tanesinin Grup 10 ARDRA numarasına (*Bacillus*), 1 tanesinin Grup 11 ARDRA numarasına (*Aneurinibacillus*), 2 tanesinin Grup 21 ARDRA numarasına (*Anoxybacillus*), 2 tanesinin Grup 22 ARDRA numarasına (*Brevibacillus*) ait olduğu görülmektedir. İzolatların ait olduğu cinsler yüzde olarak değerlendirildiğinde toplamda 13 izolatın %7,69'unun *Geobacillus* cinsine, %61,5'inin *Anoxybacillus* cinsine, %7,69'unun *Aneurinibacillus* cinsine, %15,38'inin *Brevibacillus* cinsine ve %7,69'unun *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmektedir.



Şekil 3.18. Havran bölgesinden izole edilen izolatların cinslere göre ait % dağılımı

İzolatların Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

16S rRNA gen ürününün *Mbo* I enzimiyle kesim analizi sonucunda elde edilen farklı ARDRA profiline sahip izolatlar için FAME analizi uygulanmıştır. Örnekleme bölgelerine göre FAME analiz profilleri Çizelge 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8 de verilmiştir.

Bu çalışmamızda Sındırgı bölgesinden 3 farklı izolata yağ asiti analizi uygulanmıştır. S2 ve S5 kodlu izolatlarda 14:0 (Miristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:1 w7c (Palmitoleik asit), 18:0 (Stearik asit), 18:1 w7c (cis-Vakkenik asit), 19:0 siklo w8c (cis-10,11-Metilen-Oktadekanoik asit) bulunmuştur. SY5 kodlu izolatta 14:0 ISO (İzomiristik asit), 15:0 ISO (13-Metilmiristik asit), 15:0 ANTEISO (12-Metilmiristik asit), 16:0 ISO (İzopalmitik asit), 16:0 (Palmitik asit), 17:0 ISO (İzomargarik asit), 17:0 ANTEISO (Anteizomargarik asit), 18:0 (Stearik asit) bulunmuştur (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Sındırgı bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları

Yağ asit derişimi (%)			
Yağ asitleri	S2	S5	SY5
14:0	10.63	10.92	-
14:0 ISO	-	-	0.59
15:0 ISO	-	-	37.02
15:0 ANTEISO	-	-	27.51
16:0	50.67	47.60	3.30
16:0 ISO	-	-	3.43
16:1 w7c	7.37	7.90	-
17:0 ISO	-	-	14.47
17:0 ANTEISO	-	-	13.02
18:0	10.18	9.27	0.67
18:1 w7c	15.52	17.56	-
19:0 CYCLO w8c	5.63	6.75	-

Eynal bölgesine ait 6 farklı izolatla yapılan yağ asiti analizi sonucunda E4, E6, EY5 ve EY12 kodlu izolatlarda 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit) yağ asitleri ortak olarak bulunmuştur. EY21 kodlu izolatta diğer izolatlara ek olarak 14:0 iso (İzomiristik asit) ve 18:0 (Stearik asit) bulunmuştur. EY18 kodlu izolatta ise diğer izolatlara ek olarak 10:0 (Kaprik asit), 14:0 (Miristik asit), 16:1 w7c alkol (Palmitoleil alkol), 16:1 w11c ((5Z)-5-Hekzadekenoik asit), 17:1 iso I, 17:1 iso w10c ve 18:1 w9c (Oleik asit) bulunmuştur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Eynal bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları

Yağ asit derişimi (%)						
Yağ asitleri	E4	E6	EY5	EY12	EY18	EY21
10:0	-	-	-	-	0.25	-
14:0	-	-	-	-	3.43	-
14:0 ISO	-	-	-	-	0.77	0.60
15:0 ISO	31.83	34.17	36.23	38.81	19.50	37.62
15:0 ANTEISO	26.29	22.52	27.39	30.00	8.77	24.47
16:0	5.53	6.89	8.18	3.82	14.29	3.58
16:0 ISO	4.62	4.06	3.72	3.50	10.88	4.22
16:1 w7c alcohol	-	-	-	-	1.44	-
16:1 w11c	-	-	-	-	6.09	-
17:0 ISO	16.79	18.66	12.87	12.89	8.56	16.61
17:0 ANTEISO	14.94	13.70	11.61	10.98	21.40	12.30
17:1 ISO I	-	-	-	-	1.38	-
ISO 17:1 w10c	-	-	-	-	2.02	-
18:0	-	-	-	-	0.90	0.61
18:1 w9c	-	-	-	-	0.32	-

Güre bölgesinden 6 farklı izolata uygulanan yağ asiti sonuçları Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre G9 ve GY4 kodlu izolatlarda 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit) ve 18:0 (Stearik asit) bulunmuştur. G2 kodlu izolatta bu yağ asitlerine ek olarak 10:0 (Kaprik asit), 13:0 iso (İzotridekanoik asit), 14:0 (Miristik asit) ve 14:0 iso (İzomiristik asit) bulunmuştur. G1 kodlu izolatta 14:0 (Miristik asit), 14:0 iso (İzomiristik asit), 14:0 3OH (3-hidroksimiristik asit), 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 16:1 w7c (Palmitoleik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit), 17:1 anteiso A ve 17:1 iso w5c bulunmuştur. G5 kodlu izolatta 13:0 iso (İzotridekanoik asit), 13:0 3OH (3-hidroksitridekanoik asit), 14:0 (Miristik asit), 14:0 iso (İzomiristik asit), 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 16:0 iso H, 16:1 w5c (cis-11-Palmitoleik asit), 16:1 w7c (Palmitoleik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit) ve 17:1 iso w9c bulunmuştur. G6 kodlu izolat ise diğer izolatlardan oldukça farklı yağ asiti profiline sahiptir. Bu izolatta 12:0 alde, 14:0 3OH (3-hidroksimiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 17:0 (Margarik asit), 18:0 (Stearik asit), 18:0 3OH (3-hidroksistearik asit), 18:1 2OH, 18:1 w7c (cis-Vakkenik asit), 19:0 siklo w8c (cis-10,11-Metilen-Oktadekanoik asit), 20:1 w7c ((13Z)-13-İkosenoik asit) ve tanımlanamayan bir yağ asiti bulunmuştur.

Çizelge 3.7. Güre bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları

Yağ asit derişimi (%)						
Yağ asitleri	G1	G2	G5	G6	G9	GY4
10:0	-	0.34	-	-	-	-
12:0 ALDE	-	-	-	1.06	-	-
13:0 ISO	-	0.82	0.24	-	-	-
13:0 3OH	-	-	1.21	-	-	-
14:0	2.39	0.90	1.08	-	-	-
14:0 ISO	1.15	0.69	0.90	-	-	-
14:0 3OH	3.29	-	-	4.62	-	-
15:0 ISO	60.84	61.59	60.70	-	36.56	60.13
15:0 ANTEISO	3.07	15.95	3.58	-	24.35	14.02
16:0	2.00	3.59	3.67	2.91	8.33	6.81
16:0 ISO	3.73	1.88	4.34	-	3.83	1.64
16:1 ISO H	-	-	0.69	-	-	-
16:1 w5c	-	-	0.64	-	-	-
16:1 w7c	7.31	-	0.97	-	-	-
17:0	-	-	-	3.52	-	-
17:0 ISO	5.44	10.72	9.59	-	13.37	12.13
17:0 ANTEISO	1.39	2.76	1.51	-	11.25	2.81
17:1 ANTEISO A	1.98	-	-	-	-	-
ISO 17:1 w5c	7.40	-	-	-	-	-
ISO 17:1 w9c	-	-	1.35	-	-	-
18:0	-	0.77	-	7.84	2.30	2.47
18:0 3OH	-	-	-	3.17	-	-
18:1 2OH	-	-	-	4.35	-	-
18:1 w7c	-	-	-	57.49	-	-
19:0 CYCLO	-	-	-	10.22	-	-
w8c	-	-	-	-	-	-
20:1 w7c	-	-	-	2.12	-	-
Tanımlanamayan	-	-	-	2.69	-	-

Havran bölgesinden 4 farklı izolata yağ asiti analizi yapılmıştır. H6 kodlu izolatta 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit) ve 18:0 (Stearik asit) yağ asitleri bulunmuştur. H4 kodlu izolatta H6 kodlu izolata ek olarak 13:0 iso (İzotridekanoik asit), 14:0 (Miristik asit), 14:0 iso (İzomiristik asit), 16:1 w7c (Palmitoleik asit), 17:1 anteiso A ve 17:1 w5c ((12Z)-12-Heptadekanoik asit) bulunmuştur. H7 ve H13 kodlu izolatlar incelendiğinde ise 13:0 3OH (3-Hidroksitridekanoik asit), 14:0 (Miristik asit), 14:0 iso (İzomiristik asit), 15:0 iso (13-Metilmiristik asit), 15:0 anteiso (12-Metilmiristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:0 iso (İzopalmitik asit), 16:1 w7c (Palmitoleik asit), 17:0 iso (İzomargarik asit), 17:0 anteiso (Anteizomargarik asit), 17:1 anteiso B, 17:1 iso w9c ((7Z)-15-Metil-7-Hekzadekanoik asit) ortak olarak bulunmuştur. H13 kodlu izolatta buna ek olarak 18:0 (Stearik asit) yağ asiti mevcut olup H7 kodlu izolatta ise 11:0 iso (9-Metilkaprik asit), 13:0 iso (Tridekanoik asit), 16:1 iso H ve 16:1 w5c (cis-11-Palmitoleik asit) bulunmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8. Havran bölgesine ait izolatlardan bazılarına ait FAME analiz sonuçları

Yağ asit derişimi (%)				
Yağ asitleri	H4	H6	H7	H13
11:0 ISO	-	-	0.43	-
13:0 ISO	1.12	-	0.43	-
13:0 3OH	-	-	1.57	0.98
14:0	5.47	-	1.06	1.44
14:0 ISO	1.30	-	0.98	0.56
15:0 ISO	53.98	31.23	67.13	55.16
15:0 ANTEISO	7.11	26.24	3.29	3.91
16:0	9.06	13.54	3.65	11.10
16:0 ISO	3.00	3.41	3.07	2.84
16:1 ISO H	-	-	0.47	-
16:1 w5c	-	-	0.50	-
16:1 w7c	5.46	-	0.70	0.97
17:0 ISO	4.80	10.39	7.36	10.06
17:0 ANTEISO	3.25	11.65	1.13	1.89
17:1 ANTEISO A	1.58	-	-	-
17:1 ANTEISO B	-	-	7.48	6.89
ISO 17:1 w5c	1.63	-	-	-
ISO 17:1 w9c	-	-	0.75	0.92
18:0	2.25	3.54	-	3.27

3.4. Kommunité Analizleri

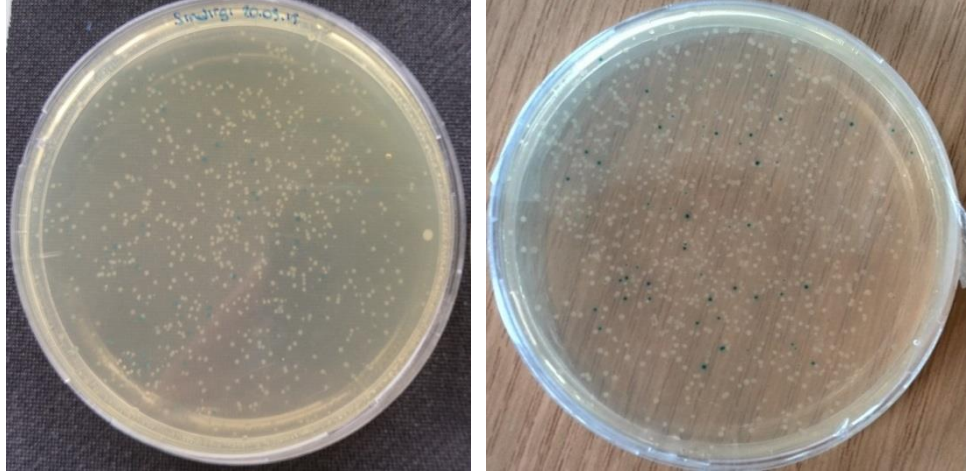
3.4.1. Termal su örneklerinden DNA izolasyonu

Termal su örneklerinden DNA izolasyonu daha önce 2.2.5.1. de belirtildiği gibi yapılmıştır. Daha sonra Promega DNA Clean-up kiti kullanılarak örnekler saflaştırılmıştır.

3.4.2. 16S rRNA geninin klonlanması

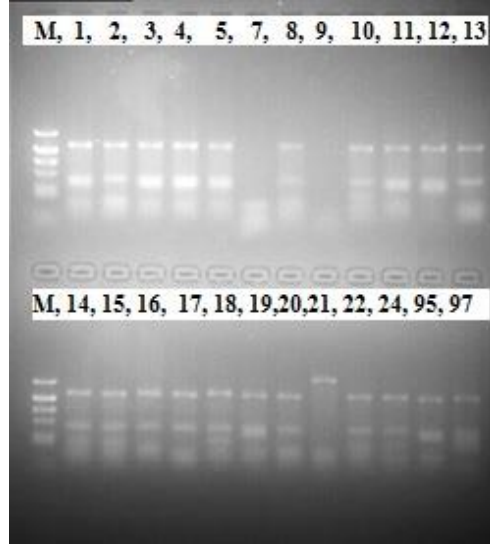
Filtrelerden elde edilen DNA örnekleri 16S rRNA'nın klonlanması için kullanılmıştır. Öncelikle her bir DNA örneğinin 16S rRNA bölgesinin amplifikasyonu 27F/1492R primerleri ile gerçekleştirilmiş, amplifikasyon ürünü Promega SV Gel ve PCR Cleanup kiti ile daha önce belirtildiği şekilde iki kez saflaştırılmıştır ve PZR ürünlerinin nanodrop değeri 97,5-195 ng/μl olarak ayarlanmıştır. PZR ürününün 3' ucuna Poly-A kuyruğunun eklenmesi, ligasyon ve transformasyon işlemleri daha önce belirtildiği gibi yapılmıştır. Pozitif klonların seçimi için ampicilin ve X gal içeren LB agar petripleri kullanılmış insert taşıyan beyaz kolonilerin ve insert taşımayan mavi kolonilerin sayısı belirlenmiştir. İnsert içeren beyaz klonlar %20 gliserol içerisinde -20 °C de saklanmıştır. Klonlardan plazmit DNA izolasyonu için stok kültürler ampicilin içeren LB besiyerinde canlandırılmış ve plazmit DNA izolasyonu daha önce belirtildiği gibi GE Healthcare Illustra Plasmid Mini Spin Kit kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen plazmit DNA lardan 16S rRNA amplifikasyonu M13F/M13R primerleri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünlerin *Mbo* I restriksiyon enzimi kullanılarak ARDRA profilleri elde edilmiştir.

Sındırgı termal su örneği için yapılan 16S rRNA klonlama işlemi sonucunda 80 adet beyaz koloni ve 35 adet mavi koloni, Eynal termal su örneği için yapılan 16S rRNA klonlama işlemi sonucunda 40 adet beyaz, 82 adet mavi koloni, Güre termal su örneği için yapılan 16S rRNA klonlama işlemi sonucunda 23 adet beyaz, 75 adet mavi koloni, Havran termal su örneği için yapılan 16S rRNA klonlama işlemi sonucunda 75 adet beyaz 60 adet mavi koloni elde edilmiştir. şekil 3.19 da klonlara ait bazı petri görüntüleri verilmiştir.

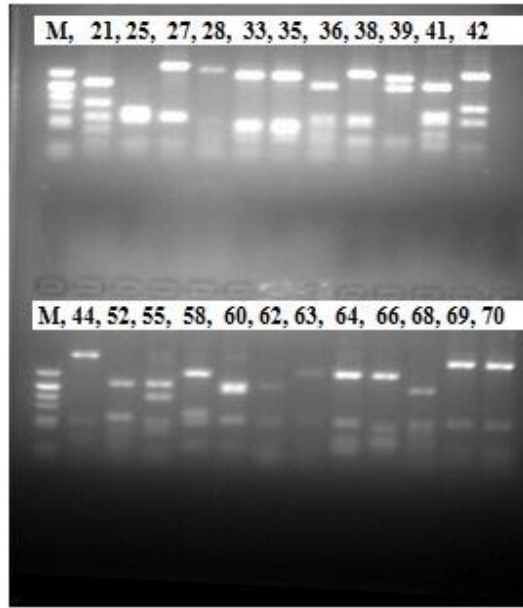


Şekil 3.19. Klonlara ait bazı petri görüntüleri

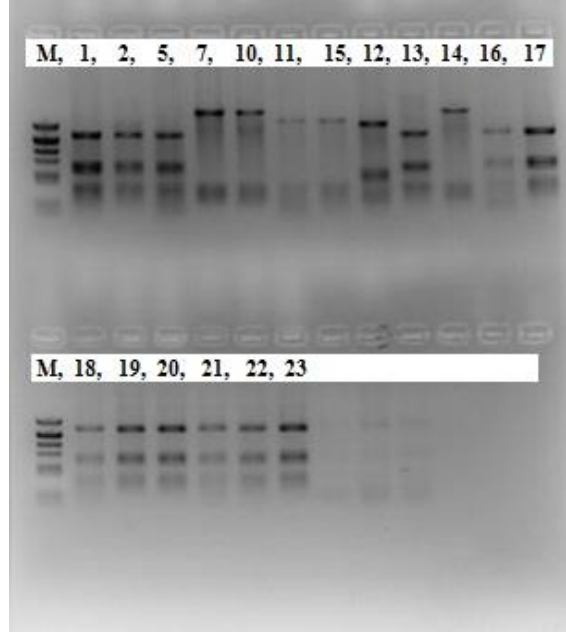
Her bir bölgeden elde edilen 24 adet beyaz koloninin doğru boyutta ürüne sahip olup olmadığını anlamak için M13F/M13R primerleri ile doğrulama yapılmış ve doğru ürün boyutuna sahip klonların plazmit DNA ekstraksiyonundan sonra tekrar M13F/M13R primerleri ile amplifikasyonu 2.2.5.2 de belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiş ve *Mbo I* restriksiyon profilleri karşılaştırılmıştır. *Mbo I* enzimiyle gerçekleştirilen ARDRA profil karşılaştırılması sonucunda 4 bölge arasında toplam 20 farklı restriksiyon kesim profili elde edilmiştir. Klonlar ile elde edilen ARDRA profilleri ve numaraları çizelge 3.9’ da özetlenmiştir. Bölgelere ait *Mbo I* enzimiyle gerçekleştirilen ARDRA profilleri Şekil 3.20, 3.21, 3.22 ve 3.23 de verilmiştir.



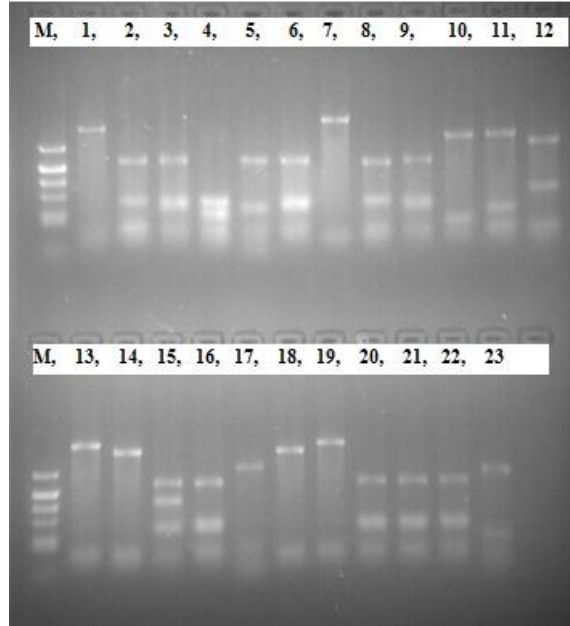
Şekil 3.20. Sındırgı klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin *Mbo* I restriksiyon enzimi ile elde edilen ARDRA profilleri M: pBR322/*Alu*I Marker



Şekil 3.21. Eynal klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin *Mbo*I restriksiyon enzimi ile elde edilen ARDRA profilleri M: pBR322/*Alu*I Marker



Şekil 3.22. Güre klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin *Mbo* I restriksiyon enzimi ile elde edilen ARDRA profilleri M: pBR322/*Alu*I Marker



Şekil 3.23. Havran klonlarına ait plazmitlerin M13F/M13R PZR ürünlerinin *Mbo* I restriksiyon enzimi ile elde edilen ARDRA profilleri M: pBR322/*Alu*I Marker

Çizelge 3.9. Klonlara ait ARDRA profil numaraları

ARDRA Profil Numarası	Klonlar
1	Sındırgı; 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 95 ve 97 Güre 1, 2, 5, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ve 23 Havran 2, 3, 6, 8, 9, 10, 21, 22 ve 23 Eynal; 52, 60, 62, ve 68
2	Sındırgı 21 Güre 7, 10 ve 14, Havran 1, 7, 14 ve 18 Eynal 44
3	Güre 11 ve 15 Havran 11 ve 17
4	Güre 12
5	Havran 4
6	Havran 5
7	Havran 12
8	Havran 13 ve 19
9	Havran 15 Eynal 55
10	Havran 17
11	Havran 18 ve 24
12	Sındırgı 12
13	Eynal 21
14	Eynal 27, 28, 69 ve 70
15	Eynal 27, 28, 69 ve 70
16	Eynal 33, 35, 38, 58, 63, 64 ve 66
17	Eynal 36
18	Eynal 39
19	Eynal 41
20	Eynal 42

Çizelge 3.9' da görüldüğü gibi Sındırgı 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 95 ve 97 nolu, Eynal 52, 60, 62, ve 68 nolu, Güre 1, 2, 5, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ve 23 nolu, Havran 2, 3, 6, 8, 9, 10, 21, 22 ve 23 nolu klonlar 1 numaralı ARDRA grubunu, Sındırgı 21 nolu, Eynal 44 nolu, Güre 7, 10 ve 14, Havran 1, 7, 14 ve 18 nolu klonlar 2 numaralı ARDRA grubunu, Güre 11, 15 nolu, Havran 11 ve 17 nolu klonlar 3 nolu ARDRA grubunu, Güre 12 nolu klon 4 numaralı ARDRA grubunu, Havran 4 nolu klon 5 numaralı ARDRA grubunu, Havran 5 nolu klon 6 numaralı ARDRA grubunu, Havran 12 nolu klon 7 numaralı ARDRA grubunu, Havran 13 ve 19 nolu klon 8 numaralı ARDRA grubunu, Havran 15 ve Eynal 55 nolu klon 9 numaralı ARDRA grubunu, Havran 17 nolu klon 10 numaralı ARDRA grubunu, Havran 18 ve 24 nolu klon 11 numaralı ARDRA grubunu, Sındırgı 12 nolu klon tek başına 12 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 21 nolu klon tek başına 13 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 25 nolu klon tek başına 14 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 27, 28, 69 ve 70 nolu klon 15 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 33, 35, 38, 58, 63, 64, 66 nolu klonlar 16 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 36 nolu klon tek başına 17 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 39 nolu klon tek başına 18 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 41 nolu klon tek başına 19 numaralı ARDRA grubunu, Eynal 42 nolu klon tek başına 20 numaralı ARDRA grubunu oluşturmaktadır.

Farklı ARDRA profiline ait klonların plazmit izolasyonu 2.2.5.2 de daha önce bahsedildiği gibi yapılmıştır. Plazmitlerin M13F/R primerleri ile elde edilen PZR ürünleri dizi analizi için MacroGen firmasına gönderilmiştir. Dizi analizi için 1492R primeri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10 da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Klonlara ait ARDRA profillerinin sekans analiz sonuçları

ARDRA Profil Numarası	Tip	Amplifikasyon Primeri	Sekans Primeri	Benzerlik	Gen Bankası Numarası	Sonuç	Uzunluk (bp)
1	Klon G1 1766UAC110	M13F/R	1492R	%99	KJ722464.1	Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome	792
2	Klon G7 1766UAC111	M13F/R	1492R	%99	NR_074273.1	Meiothermus silvanus DSM 9946, complete genome	906
3	Klon G11 1766UAC112	M13F/R	1492R	%90	EU799944.1	Uncultured bacterium clone 1C227620 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	903
4	Klon G12 1766UAC113	M13F/R	1492R	%95	HQ639470.1	Uncultured bacterium clone Ap.ba-F-DM-HN-1-152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	670
5	Klon H4 17CDZAB021	M13F/R	1492R	%93	EF648061.1	Uncultured bacterium clone HB55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889
6	Klon H5 17CDZAB022	M13F/R	1492R	%99	KJ842638.1	Anoxybacillus flavithermus strain TS_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	674
7	Klon H12 1766UAC117	M13F/R	1492R	%99	KJ190161.1	Aneurinibacillus thermoaerophilus strain G3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	559
8	Klon H13 1766UAC118	M13F/R	1492R	%99	KJ842631.1	Brevibacillus thermoruber strain TS_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	826
9	Klon H15 17CDZAB014	M13F/R	1492R	%99	KJ842638.1	Anoxybacillus flavithermus strain TS_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	859

Çizelge 3.10. (Devam) Klonlara ait ARDRA profillerinin sekans analiz sonuçları

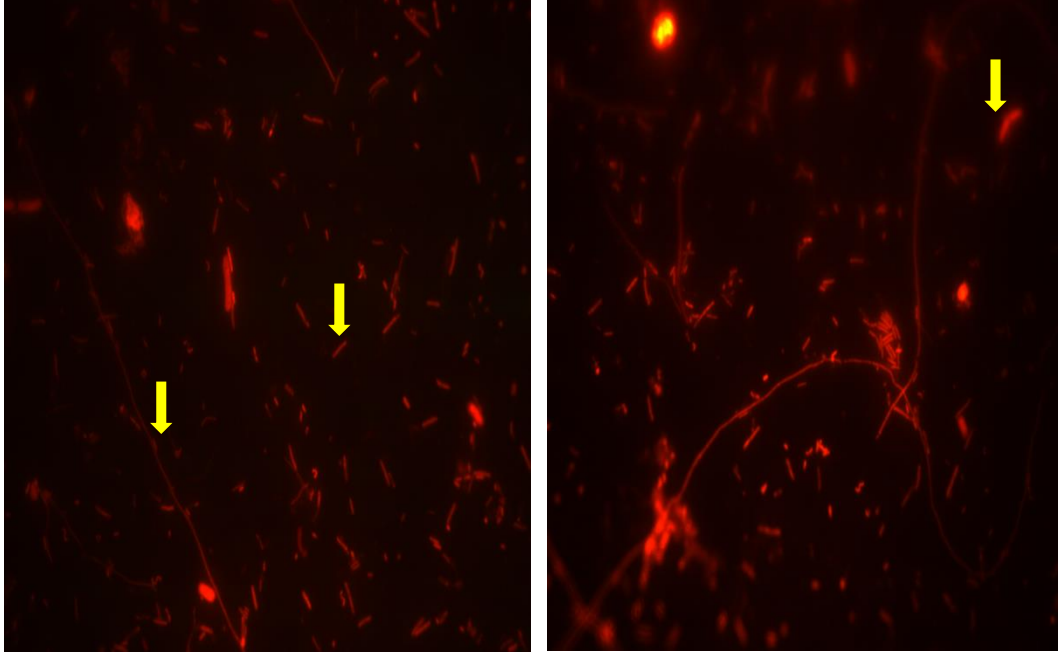
ARDRA Profil Numarası	Tip	Amplifikasyon Primeri	Sekans Primeri	Benzerlik	Gen Bankası Numarası	Sonuç	Uzunluk (bp)
10	Klon H17 17CDZAB015	M13F/R	1492R	%99	KR329111.1	Uncultured bacterium clone B27_534 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	331
11	Klon H24 17CDZAB016	M13F/R	907R	%99	KF771274.1	Roseomonas sp. YIM 78007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	626
12	Klon S12 1766UAC114	M13F/R	1492R	%100	KJ722464.1	Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome	809
13	Klon E21 1766UAC119	M13F/R	1492R	%97	KP216563.1	Bacillus licheniformis strain Nam1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	735
14	Klon E25 1766UAC120	M13F/R	1492R	%91	HM184957.1	Uncultured bacterium clone bac52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	940
15	Klon E27 1766UAC121	M13F/R	1492R	%98	CP001638.1	Geobacillus sp. WCH70, complete genome	484
16	Klon E33 1766UAC122	M13F/R	1492R	%91	AY845055.1	Meiothermus sp. I40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	565

Çizelge 3.10. (Devam) Klonlara ait ARDRA profillerinin sekans analiz sonuçları

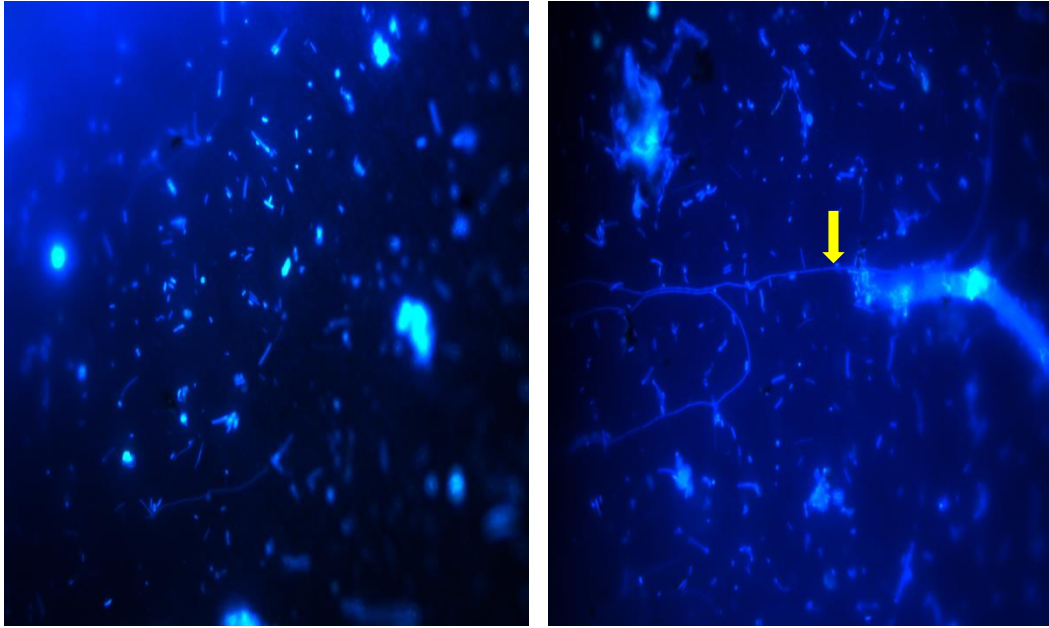
ARDRA Profil Numarası	Tip	Amplifikasyon Primeri	Sekans Primeri	Benzerlik	Gen Bankası Numarası	Sonuç	Uzunluk (bp)
17	Klon E36 17CDZAB017	M13F/R	1492R	%99	KR109267.1	Bacillus amyloliquefaciens strain HN-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	542
18	Klon E39 17CDZAB028	M13F/R	907R	%89	KM278273.1	Uncultured bacterium clone BQRY_43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	807
19	Klon E41 17CDZAB019	M13F/R	1492R	%99	HQ767379.1	Uncultured organism clone ELU0061-T404-S- NIPCRAMgANa_000428 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	837
20	Klon E42 17CDZAB020	M13F/R	1492R	%99	CP001638.1	Geobacillus sp. WCH70, complete genome	883

3.5. Flourescent In Situ Hibridisation (FISH)

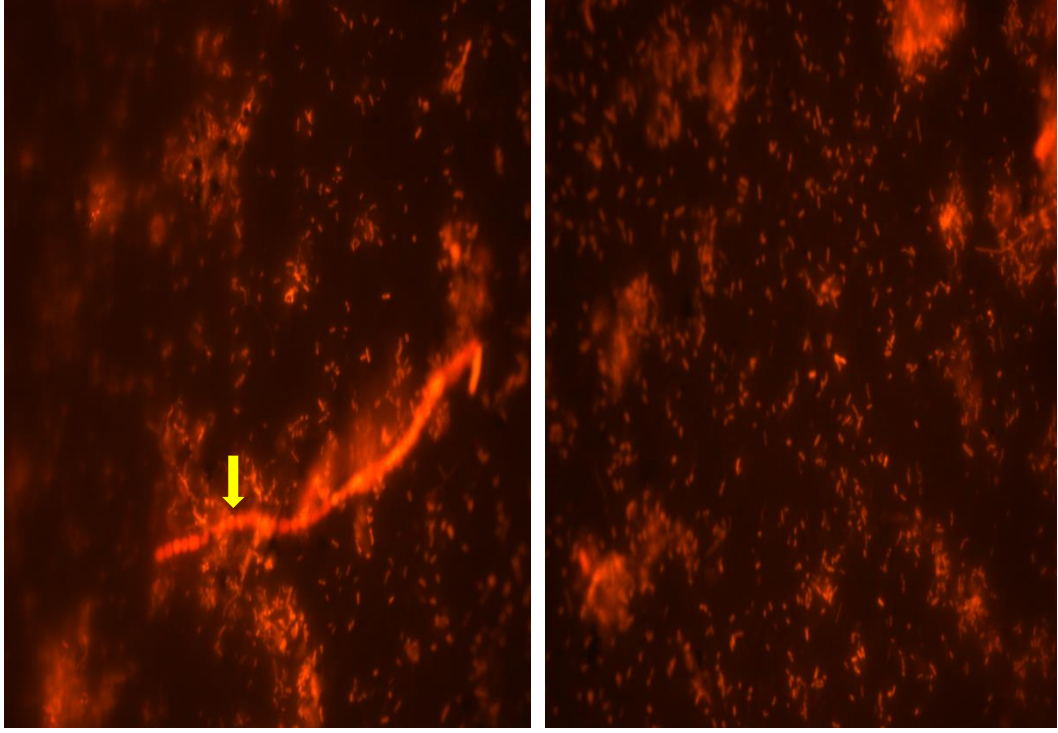
Sındırgı, Eynal, Güre ve Havran termal su örneklerindeki bakteri ve arkea popülasyonunun varlığını belirlemek için Eub338, Arc344 ve Arc915 evrensel problemleri kullanılarak FISH gerçekleştirilmiş ve DAPI boyama yapılmıştır. FISH ve DAPI boyama sonucunda bütün termal su örneklerinde bakteri sinyalleri alınırken arkea sinyallerine rastlanmamıştır (Şekil 3.24-3.31).



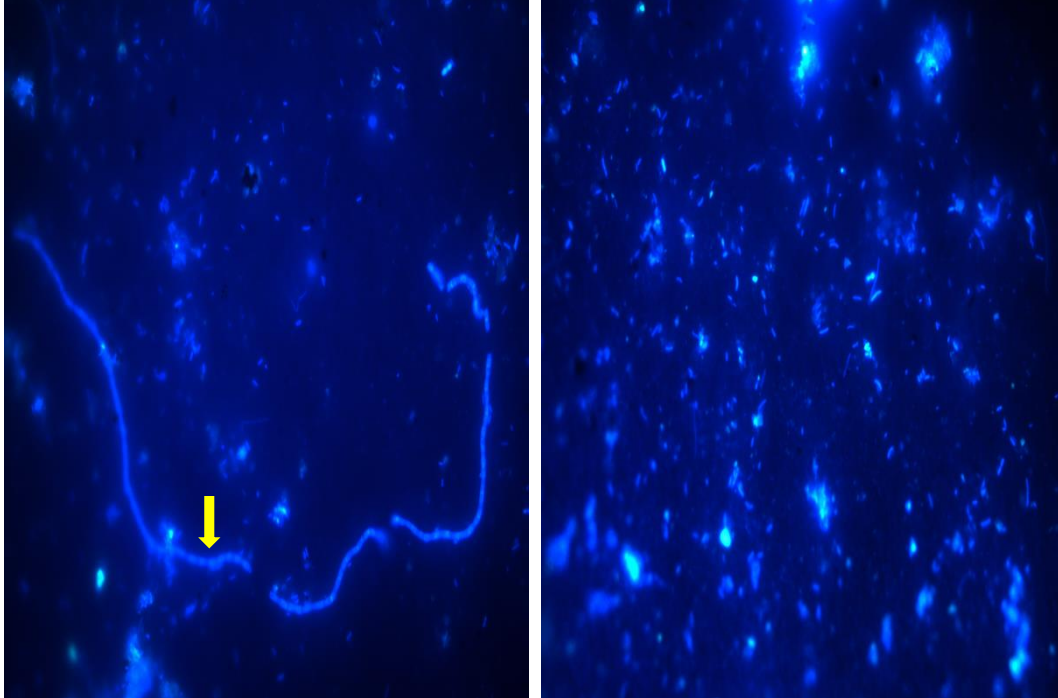
Şekil 3.24. Sırdırgı termal su örneğine ait Eub338 probu hibridizasyonu sonucunda ışıma veren ince ve kalın basil morfolojisine sahip bakteriler ve ipliksi yapılar.



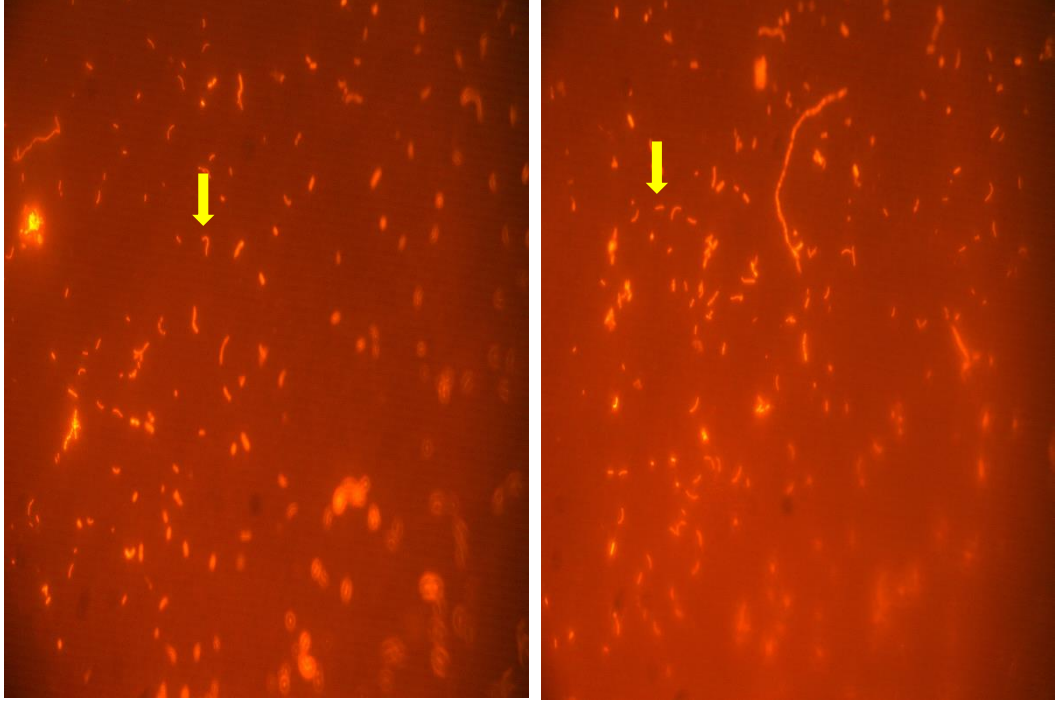
Şekil 3.25. Sırdırgı termal su örneğine ait DAPI boyama sonucunda ışıma veren ipliksi yapı .



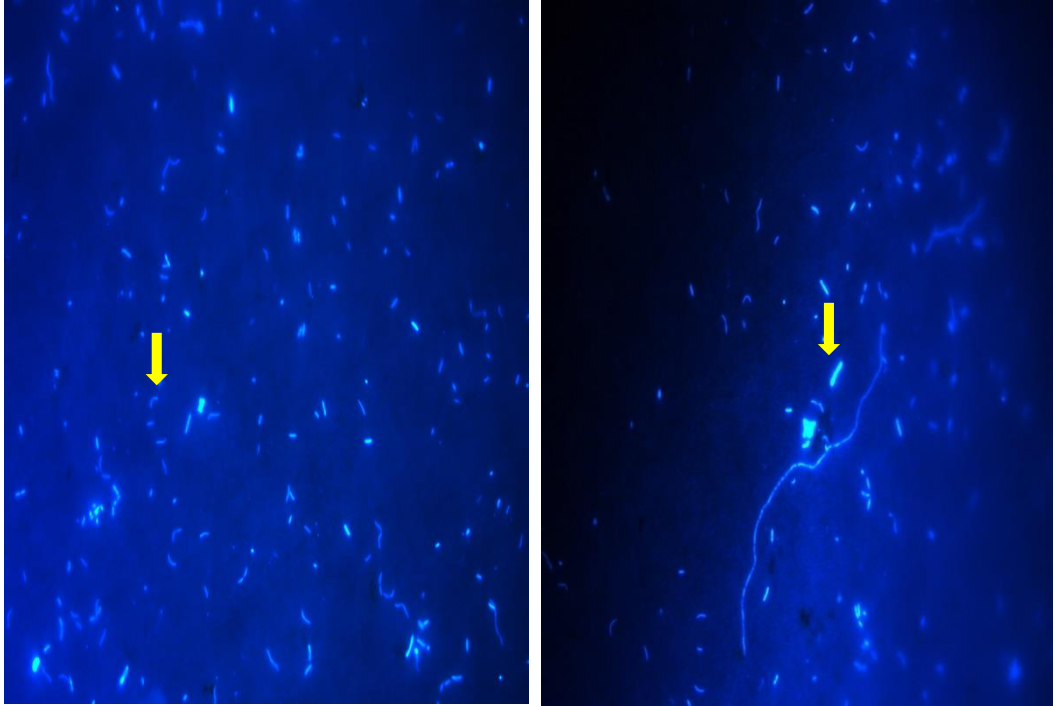
Şekil 3.26. Eynal termal su örneğine ait Eub338 probu ile hibridizasyon sonrası ışımaya veren zincir şeklinde bakteri hücreleri.



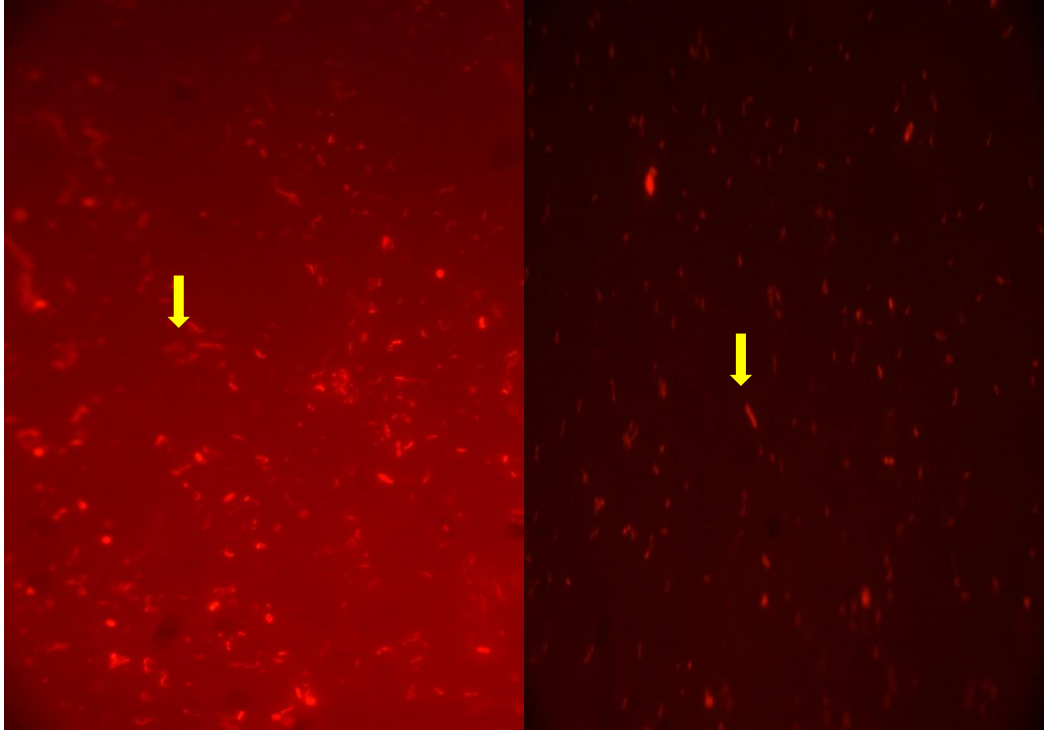
Şekil 3.27. Eynal termal su örneğine ait DAPI boyayama sonrası ışımaya veren zincir şeklinde bakteri hücreleri.



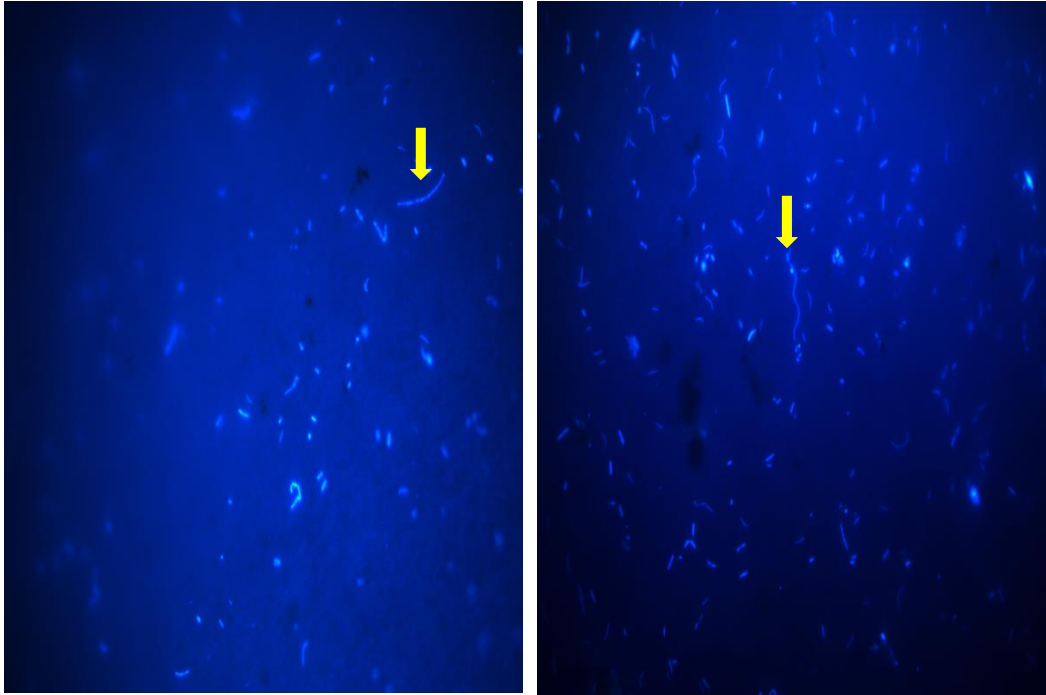
Şekil 3.28. Güre termal su örneğine ait Eub338 probu ile ışıma veren kıvrık ve kısa basiller



Şekil 3.29. Güre termal su örneğine ait DAPI boyama sonucu gözlenen kıvrık ve kalın basiller



Şekil 3.30. Havran termal su örneğine ait Eub338 probu ile ışıma veren kıvrık ve uzun basiller



Şekil 3.31. Havran termal su örneğine ait DAPI boyama sonucu gözlenen uzun ve uzun kıvrık basiller.

Çizelge 3.11. DAPI sayım sonuçları

Örnekleme Alanı	Hücre sayısı/ml
Sındırgı	$2*10^4$
Eynal	$3*10^6$
Güre	$1,8*10^3$
Havran	$2,2*10^3$

Çizelge 3.11 de görüldüğü gibi DAPI boyaması sonucunda Eynal ve Sındırgı termal su örneğinin en fazla hücre sayısına sahip olduğu görülmektedir. Güre ve Havran ise daha düşük hücre yoğunluğuna sahiptir. Bunun sebebi Sındırgı ve Eynal termal su örneklerinin çevresel örnek olması diğerlerinin ise sondaj noktasından alınan örnekler olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

1966 yılında Thomas Brock Yellowstone ulusal parkında kaynayan sudan termofilik bakterileri ilk kez izole etmiştir. Brock'un termofilleri keşfinden sonra dünyada birçok yerde termofiller ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Termofiller yeryüzünde jeotermal olarak ısınmış bölgeler, derin denizlerdeki hidrotermal bacalar, çürüten bitki materyalleri gibi birçok bölgeden izole edilebilmektedir.

Çalışmamızda Balıkesir-Sındırgı, Güre, Havran ve Kütahya-Eynal termal kaynaklarından 2014 yılı Şubat ve Ağustos aylarında örnekleme yapılmıştır. Termal su örnekleri pH değerleri bakımından incelendiğinde nötral ve hafif alkali (pH 7-8) özellikte olduğu görülmektedir. Ayrıca ICP analiz sonuçlarına göre termal su örneklerinin kimyasal içeriklerinin örnekleme zamanına göre ve birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Örnekleme noktalarının kimyasal içeriklerinin farklı olması termal su kaynaklarının çıkış noktalarında kayaç yapılarının ve kaynak sıcaklıklarının farklı olması ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamız kapsamında izolatlara Gram boyama işlemi uygulandığında izolatların birçoğunun Gram pozitif, uzun ve kısa çubuk şeklinde olduğu, bunun yanında Gram negatif basillerin de varlığı gözlemlenmiştir. İzolatların koloni morfolojisi incelendiğinde ise beyaz, krem ve sarı renkli izolatların varlığı belirlenmiştir. İzolatların bazıları yuvarlak düzgün bir koloni morfolojine sahipken bazı izolatların ise ekzopolisakkarit üreten mukoid koloniler olduğu belirlenmiştir.

16S rRNA sekansı bakteriyel filogeni çalışmalarında sıklıkla kullanılan filogenetik bir markerdir. Son zamanlarda bilinmeyen bakterilerin cins hatta tür seviyesinde tanımlanmasına olanak sağlayan bir araç olarak kullanılmaktadır. Biyokimyasal metodların otomatize edilmesi ve deteksiyon zamanlarının kısaltılmasına rağmen biyokimyasal metodlar mikroorganizmalar arasındaki genotipik farklılığı belirlemek için yeterli değildir. Carl Woese ve arkadaşları 1985 yılında bakterilerdeki filogenetik ilişkinin genomda değişken olmayan bölgelerin kıyaslanması ile saptanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

16S rRNA geni bütün bakterilerde bulunan, fonksiyonel olarak korunmuş, farklı organizmalarda iyi korunmuş ve heterojen bölgeler içermektedir.

Farklı mikroorganizmalardaki 16S rRNA sekanslarının karşılaştırılmasıyla elde edilen farklılıklar ortak ata ile ilişkilerin açıklanmasına yardımcı olmaktadır.

16S rDNA'daki değişim oranının tüm organizmalar için tanımlayıcı olmaması bu yöntemin dezavantajlarından biridir. Farklı taksonomik gruplar, farklı değişim oranlarına sahip olabilirler. Bu oranlar evrim süreci içinde değişiklik gösterebilir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). Bir diğer dezavantaj genom başına düşen kopya sayılarının farklı olmasıdır. Kopya sayıları taksona özel gibi görünmesine rağmen aynı türün suşları arasında da varyasyon kaydedilmiştir. Bazı taksonlarda 16S rRNA kopya sayısı ile elverişli yaşam koşullarına adaptasyon arasında bir bağlantı ileri sürülmektedir. Düşük kopya sayısına sahip taksonların daha oligotropik olduğu bildirilmiştir. Bir organizma türünde 16S rRNA gen kopya sayısının aynı olduğu düşünülmesine rağmen aynı türde hatta aynı genomun 16S rRNA sekansları farklılık gösterebilir. Bakteri türleri arasında 16S rRNA sekansları farklılıkları $>1\%$ 'dir. Hatta bazı termofilik bakterilerde bu oranın daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu duruma yatay gen transferinin etkili olduğu ileri sürülmektedir (Vetrovsky ve Baldrian, 2013).

ARDRA bakterilerde 16S rRNA geni için restriksiyon fragment uzunluk analizinin bir uygulamasıdır. Bu teknik 16S rRNA bölgesinin uygun primerler ile amplifikasyondan sonra restriksiyon enzimi ile kesimine dayanmaktadır. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu elde edilen profiller türlerin temsilcisi olarak seçilmektedir (Sklarz ve ark. 2009). ARDRA farklı ortamlardaki karışık bakteri populasyonlarını incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem mikroorganizma hakkında çok az ya da hiç bilgi vermezken zaman içindeki genotipik değişimler veya farklı çevrelerde bulunan komüniteler hakkında bilgi vermektedir.

Termal su örneklerinin bakteriyel çeşitliliği incelendiğinde Sındırgı termal su örneğinin Şubat ve Ağustos ayı örneklemelerinden 6'şar adet farklı morfolojide izolat elde edilmiştir. Bu izolatlara ait ARDRA profilleri incelendiğinde 12 izolata ait 3 farklı profil ortaya çıkmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonucu bu profillerin *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermoparaaffinivorans* ve *Bacillus licheniformis* türlerine ait olduğunu göstermiştir.

Eynal termal su kaynağından Şubat ayı örnekleme sonucu 6 izolat, Ağustos ayı örnekleme sonucu ise 21 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlara ait ARDRA profilleri incelendiğinde 27 izolata ait 13 farklı profil ortaya çıkmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonucu bu profillerin *Geobacillus sp*, *Geobacillus thermoparaflinivorans*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Aeribacillus pallidus*, *Bacillus sonorensis* ve *Bacillus licheniformis* türlerine ait olduğu bulunmuştur.

Güre termal su kaynağından Şubat ayı örnekleme sonucu 9, Ağustos ayı örnekleme sonucu 6 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlara ait ARDRA profilleri incelendiğinde 15 izolata ait 12 farklı profil ortaya çıkmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonucu bu profillerin *Brevibacillus thermoruber*, *Bacillus licheniformis*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Geobacillus thermoparaflinivorans*, *Anoxybacillus sp.* ve *Chelatococcus sp.* türlerine ait olduğu bulunmuştur.

Havran termal su kaynağından Şubat ayı örnekleme sonucu elde edilen 13 izolatlara ait ARDRA profilleri incelendiğinde 6 farklı profil ortaya çıkmıştır. 16S rRNA dizi analizleri sonucu bu profillerin *Geobacillus thermoparaflinivorans*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Bacillus sp*, *Aneurinibacillus sp*, *Bacillus licheniformis* ve *Brevibacillus thermoruber* türlerine ait olduğu bulunmuştur.

Bölgelerden izole edilen izolatlara bakıldığında *Geobacillus* ve *Bacillus* cinslerinin bütün örnekleme alanlarında yaygın olduğunu görülmüştür. *Geobacillus* cinsinin 35-78 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında yaşayabiliyor olması sıcaklıkları birbirinden farklı olan örnekleme bölgelerimizin hepsinde yaygın olarak bulunmasını açıklayabilir. Termofilik *Bacillus* türlerinin optimum gelişme sıcaklığı 45-70 °C dir. Ayrıca basiller spora sahiptirler ve yüksek sıcaklıklarda da yaşayabilmektedirler (Canganella ve Trovatelli, 1995; Nazina ve ark. 2004; Özdemir ve ark. 2012).

Aeribacillus gram pozitif, aerobik, hareketli ve endospor oluşturan çubuk şekilli bakteridir. Optimum 55-60 °C sıcaklıkta gelişebilmektedir. Bizim çalışmamızda *Aeribacillus* cinsi sadece Eynal termal su örneğinden izole edilebilmiştir. Benzer bir çalışmada 75 °C pH 7-8 olan Tao Dam sıcak su kaynağından izole edildiği bildirilmiştir (Yasawong ve ark. 2011).

Anoxybacillus flavitermus gram pozitif, hareketli, spor oluşturan, arabinoz, sellobiyoz, galaktoz, maltoz, ksiloz gibi çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilen çubuk şekilli bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 45-65 °C dir. Afyonkarahisar Gazlıgöl de yapılan bir çalışmada 16S rRNA analizi sonucunda *Anoxybacillus flavitermus* ile %99 benzerlik oranına sahip bir izolat izole edildiği bildirilmiştir (Özdemir ve ark. 2012).

Chelatococcus gram negatif, çubuk şekilli, spor oluşturmeyen, katalaz ve oksidaz pozitif, aerobik bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 42 °C dir. Hindistan Orissia sülfürlü sıcak su kaynağından *Chelatococcus* cinsi izole edilmiştir (Panday ve Das, 2010).

Brevibacillus thermoruber gram pozitif, hareketli, spor oluşturan termofilik bir bakteridir. Terminal ya da subterminalde şişkin bir endospor formuna sahiptir. Yüksek seviyede ekzopolisakkarit üreten bu bakteri yiyecek, kimya, kozmetik ve farmasotik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yasar Yıldız ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada 16S rRNA analizi sonucunda İzmir Karakoç termal kaynağından *Brevibacillus thermoruber* suşuyla %99,4 oranında benzerlik gösteren endospor oluşturan, gram pozitif bir izolat izole edildiği bildirilmiştir (İnan ve ark. 2012).

Bacillus sonorensis ismini bu mikroorganizmaların ilk izole edildiği Sonoran Çölünden almaktadır. Vejetatif hücreleri çubuk şeklinde, 1 µm genişliğinde ve 2-5 µm uzunluğundadır. Hücreler genellikle 2-4 hücreli zincirler halinde bulunur. Gram-pozitif, hareketli ve fakültatif anaerobiktirler. Kolonileri agar üzerinde sarımsı krem rengindedir (Palmisano ve ark. 2001).

Geobacillus, *Bacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerinin temsilcileri 16S rRNA sekansı, yağ asit analizi ve rep-PCR profili analizleri sonucunda Türkiye'deki çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (Adıgüzel ve ark. 2009).

Erzurum Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik bakterilerin genotipik ve fenotipik karakterizasyonu için yağ asidi, BOX PCR profillemeye metodları ve 16S rDNA dizileme verileri kullanılmış, *Bacillus licheniformis* ve *Aeribacillus pallidus* üyelerine yüksek oranda benzerlik gösteren suşlar izole edildiği bildirilmiştir (Adıgüzel ve ark. 2011).

Aydın, Manisa, Denizli, Nevşehir, İzmir, Ankara’da bulunan sıcaklığı 50-100 °C, pH 6-9 arasında değişen çeşitli sıcak su kaynaklarından yapılan örneklemeler sonucunda 115 izolat elde edildiği ve bu izolatların *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, ve *Thermoactinomyces* üyesi olduğu bildirilmiştir (Coleri Cihan ve ark. 2012).

Çalışmamızdan elde edilen izolatlar biyoteknolojik öneme sahip termofilik bakteri üyeleridir. Termofilik bakterilerden izole edilen enzimler ve metabolitler endüstriyel olarak oldukça büyük öneme sahiptir. Bu alanda yapılan birçok çalışma mevcuttur.

Bir çalışmada, Afyonkarahisar, Denizli, Kütahya ve Manisa illerindeki bazı jeotermal kaynaklardan alınan sıcak su örneklerinden 311 adet termofilik bakteri izole edilmiştir. İzolatlardan proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri en yüksek olan üçer suş ile bu enzimleri üretmeyen birer suş olmak üzere toplam 24 suşun 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tanısı yapılmış ve *Geobacillus* sp., *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Thermus* sp., *Thermus thermophilus*, *Anoxybacillus flavithermus* ve *Pseudoxanthomonas taiwanensis* olarak cins ve tür düzeyinde tanımlandığı bildirilmiştir (Akdaş, 2013).

İzmir Kaynarca, Aydın Çamur ve Alangüllü termal kaynaklarında ksilan kullanan termofilik mikroorganizmaların varlığı araştırılmış ve ksilan kullanabilen 9 suşun varlığı tespit edilmiştir. 16S rRNA dizi analizi sonucunda bu izolatların *Anoxybacillus* ile %97 den fazla benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (İnan ve ark. 2011).

Türkiye’de 6 ildeki 42 farklı termal kaynaktan yapılan izolasyon çalışması sonucunda 451 termofilik basil izole edildiği bu izolatlardan 67 tanesinin yüksek amilaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. 16S rRNA dizi analizi sonucunda ise bu izolatların *Geobacillus* cinsine ait olduğu bildirilmiştir (Cöleri Cihan ve ark. 2009).

Hindistan Bakreshwar termal kaynağında izole edilen izolatların tributyrin agar üzerinde esteraz üretim aktiviteleri araştırılmış ve 16S rRNA analizi sonucunda aktif izolatların *Acinetobacter*, *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsi

üyeyi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu üç bakteri cinsinden en aktif izolatan *Geobacillus* cinsi üyeleri olduğu bildirilmiştir (Ghati ve ark. 2013).

Ksilenaz enzimi, bitki hücre duvarında yoğun olarak bulunan ksilan olarak bilinen hemiselülozu sindiren enzimdir. Termofilik ksilenazlar en başta gıda endüstrisi olmak üzere tekstil endüstrisi ve kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Geobacillus thermolevorans* biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahip selüloz içermeyen, termostabil ve alkalistabil ksilenaz enzimini üretmektedir (Sharma ve ark. 2006). Verma ve Satyanarayana, (2012) çalışmasında *Geobacillus thermolevorans* bakterisinden termostabil ksilenaz enzimini kodlayan geni klonlayıp *E. coli*'de ifade etmişlerdir.

Rasemik karışım halindeki D ve L formundaki bileşiklerin birbirinden ayrılması, birbirine dönüştürülmesi zorlu bir süreç olup bu işlemler için enzimler kullanılabilir. N-süksinilamino asit rasemaz enzimi N-süksinilamino D-amino asitlerini N-süksinilamino L-amino asitlerine dönüşümünü katalizlemektedir. *Geobacillus kaustophilus*, N-süksinilamino asit rasemaz enzimini üreten en önemli mikroorganizmadır. Pozo-Dengra ve ark. (2009) bu türe ait bakteriden N-süksinilamino asit rasemaz enzimini kodlayan geni klonlayıp *E. coli* de ifade etmişler ve bu enzimi saflaştırmışlardır.

Bacillus cinsine ait çok sayıda bakteri araştırmalar ve endüstriyel uygulamalar için çok önemli mikroorganizmalardır. Bu sınıfa ait bakteriler tıp, farmakoloji, tarım gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılan enzim ve metabolitleri üretirler (Schallmey ve ark. 2004; Voigt ve ark. 2004). *Bacillus licheniformis* çok sayıda substratı hidrolize eden enzimleri üreten ve çok geniş bir besin kaynağında üreme yeteneğine sahip önemli bir bakteridir. Alkalın serin proteazlar, amilazlar gibi ticari enzimlerin yanı sıra yine medikal öneme sahip topikal antibiyotik basitrasin molekülü bu bakteriler tarafından üretilen en önemli enzim ve maddelerdir (Schallmey ve ark. 2004). Declerck ve ark. (2003) termofilik *Bacillus licheniformis* bakterisinden alfa-amilaz enzimi saflaştırmışlardır. Ferrero ve ark. (1996) *Bacillus licheniformis* bakterisinden yüksek saflıkta termostabil alkalın proteaz saflaştırmışlardır. Annamalai ve ark. (2011) bu bakteri ile ilgili yaptıkları çalışma sonucunda termostabil, alkalın duyarlı lipaz enzimini yüksek saflıkta elde etmişlerdir. Ticari enzimlerin bu

bakteri tarafından üretilmesine ve bu enzimlerin bu bakteriden saflaştırılmasına ilişkin sayısız çalışma mevcuttur.

Aneurinibacillus thermoaerophilus lipazları ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup bu bakterinin lipazları büyük öneme sahiptir. Masomian ve ark. (2012) *Aneurinibacillus thermoaerophilus* ile yaptıkları bir çalışmada bu bakteriden hem termostabil hem de organik solventlere dayanıklı ticari önemi çok büyük lipaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Ebrahimpour ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada yüksek sıcaklığa oldukça dayanıklı ekstraselüler lipazı *Aneurinibacillus thermoaerophilus* bakterisinden saflaştırmışlardır.

Süt ürünlerinde bitter proteinlerin açığa çıkarılması ve et endüstrisinde kollojen içeren atıkların muamele edilmesinde aminopeptidaz enzimleri önemli kullanım alanına sahiptir. Murai ve ark. (2004) yüksek pirolin rezidüleri içermesi sebebiyle degradasyonu oldukça zor olan kollojen ve kollojen peptidlerini degradasyona uğratan termostabil pirolin spesifik aminopeptidaz enzimini *Aneurinibacillus thermoaerophilus* bakterisinden saflaştırıp karakterize etmişlerdir.

Çalışmamızda izole ettiğimiz *Anoxybacillus flavithermus*'un ticari öneme sahip enzimleri ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Termostabil alfa-amilaz nişasta endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip bir enzimdir (Crabb ve Mitchinson, 1997). Bu enzim termofilik *Anoxybacillus flavithermus* türü tarafından üretilmektedir. Özdemir ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada Afyonkarahisar bölgesi Gazlıgöl sıcak su kaynağından izole ettikleri *Anoxybacillus flavithermus*'un termostabil alfa-amilaz üretimini incelemişler ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Ellis ve Magnuson. (2012) yaptıkları bir çalışmada hem sıcaklığa hem de alkaliniteye dayanıklı ksilenaz enzimini *Anoxybacillus flavithermus* türünden saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Chiş ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada *Anoxybacillus flavithermus* türü tarafından üretilen termostabil lipaz enzimini kodlayan geni klonlayıp *E. coli*'de ifade etmişlerdir.

Lon proteazlar intraselüler proteinlerin degradasyonunda önemli rol oynayan ATP bağlı enzimler olarak bilinmektedir. *Brevibacillus thermoruber* bu enzimi kodlayan geni içeren bir bakteri olup ürettiği enzim termostabildir. Lee ve

ark. (2004) yaptıkları çalışmada *Brevibacillus thermoruber*'den bu enzimi kodlayan geni klonlayıp *E. coli*'de ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda arkea izolasyonu yapılamamıştır. Bunun sebebi örnekleme noktalarımızın sıcaklığının hipertermofilik arkea türleri için düşük olması, ortamda arkea popülasyonunun az olması, izolasyon için kullanılan besi ortamının, inkübasyon koşullarının uygun olmaması, kaynaktan alınan su örneklerinin sıcaklıklarını koruyamamak olabilir.

Çalışmamızda 19 izolata yağ asiti analizi uygulanmıştır. Bu izolatlar farklı ARDRA profillerinden seçilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda S2 ve S5 kodlu izolatlar aynı yağ asitlerine sahip olup bu yağ asitlerinin oranlarının birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur.

E4, E6, EY5 ve EY12 kodlu izolatlar aynı yağ asiti çeşitliliğine sahip olup bu yağ asitlerinin oranları birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu izolatlardan E4, E6 ve EY12 *Geobacillus* cinsi olup dallanmış yağ asitlerinin yüzdesi bakımından Rahman ve ark. (2007) yaptığı çalışma kapsamındaki *Geobacillus zalihae* (TI) ve *Geobacillus thermoleovorans* (DSM 5366) ile benzerlik göstermektedir.

G9 ve GY4 kodlu izolatların yağ asitliği çeşitliliği aynı olup bu yağ asitlerinin oranları birbirinden farklılık göstermektedir. Poli ve ark. (2009) 11 farklı *Anoxybacillus* cinsi bakterinin yağ asiti kompozisyonunu incelemiş ve bu cinse ait türlerde 15:0 iso yağ asitinin % 40 ve üzerinde olduğunu bulmuşlardır. GY4 kodlu izolatımız *Anoxybacillus* cinsi olup % 60.13 oranında 15:0 iso yağ asitini içermektedir.

G5 kodlu izolatımız *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFNA 1 olarak tanımlanmıştır. Bu izolata ait yağ asiti analizinde 15:0 iso (% 60.7) ve 17:0 iso (% 9.59) olarak bulunmuştur. Yağ asiti kompozisyonunda yer alan 15:0 iso ve 17:0 iso dışındaki diğer yağ asitleri çok az miktarlarda bulunmaktadır. Goto ve ark. (2004) bu türe ait yağ asiti kompozisyonu çalışmasında 15:0 iso yağ asiti oranını % 47.64 olarak bulmuşlardır. Bu değer bizim çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir.

G6 kodlu izolat yağ asitliliği çeşitliliği bakımından diğer 18 izolattan oldukça farklıdır. 12:0 alde, 17:0, 18:0 3OH, 18:1 2OH, 20:1 w7c ve identifiye

edilemeyen 1 adet yağ asidine sadece G6 kodlu izolatta rastlanmıştır. G6 kodlu izolat *Chelatococcus* cinsine aittir. Panday ve Das, (2010) yaptıkları çalışmada *Chelatococcus sambhunathi* HT4'e ait elde ettikleri yağ asiti verileri G6 kodlu izolatin hem yağ asiti profili hem de yağ asiti yüzdeleriyle büyük benzerlik göstermektedir.

H7 ve H13 kodlu izolatların yağ asitliği çeşitliliği birbirine benzerlik göstermekte olup bu yağ asitlerinin oranları birbirine yakın bulunmuştur. 11:0 iso ve 17:1 anteiso B yağ asitlerine sadece H7 kodlu izolatta rastlanmıştır. Lee ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Aneurinibacillus* cinsi bakterilerin yağ asiti kompozisyonlarını incelemiş ve 15:0 iso yağ asitini majör yağ asiti olarak saptamışlardır. H7 kodlu izolatımız *Aneurinibacillus* cinsi olup % 67.13 oranında 15:0 iso yağ asiti içermektedir.

16:1 w7c alkol, 16:1 w11c, 17:1 iso I, iso 17:1 w10c ve 18:1 w9c yağ asitleri sadece EY18 kodlu izolatta tespit edilmiştir. Bu izolata ait yağ asit kompozisyonunun büyük kısmını 15:0 iso (% 19.50), 16:0 (% 14.29), 16:0 iso (% 10.88) ve 17:0 anteiso (% 21.40) yağ asitleri oluşturmaktadır. Yasawong ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Aeribacillus pallidus* TD1 türüne ait yağ asitlerini incelemişler ve yağ asit kompozisyonunun büyük kısmını 15:0 iso (% 16.30), 16:0 (% 25.04), 16:0 iso (% 11.15) ve 17:0 anteiso (% 19.74) yağ asitlerinin oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada EY18 kodlu izolatımız *Aeribacillus pallidus* olup elde ettiğimiz yağ asiti verileri *Aeribacillus pallidus* TD1 bakterisine ait yağ asiti verileri ile büyük oranda benzerlik göstermektedir.

16:0 yağ asiti tüm izolatlarda mevcuttur. 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso ve 17:0 anteiso bir çok izolatta ortak olarak bulunmektedir. Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda membran fonksiyonlarını kaybetmemeleri ve stabil kalabilmeleri için yüksek derecede doymuş yağ asitleri içerdiği bildirilmiştir (Marr ve Ingraham, 1962). Çalışmamızda kullanılan 19 izolatin yağ asiti bileşimi incelendiğinde bütün izolatların doymuş yağ asiti bileşimi % 70'in üzerinde bulunmuştur. Doymuş yağ asiti bileşimi en yüksek olan izolatlar E4, E6, EY5, EY12, EY21, SY5, G2, G9 ve GY4 olarak tespit edilmiştir. Yağ asitinin bileşimindeki karbon zincirinin uzunluğunun fazla olması ve dallanma içermesi yağ asitlerinin kaynama noktasını arttıracığından sıcaklığa karşı stabiliteleri daha

yüksek olmaktadır. 19 izolatomuzun büyük bir kısmı uzun ve dallanmış karbon zincirine sahip olup termal koşullara dayanıklı olduğu düşünülmektedir.

Standart kültürel teknikler Luria-Bertani, Nutrient Broth, Tryptic Soy Agar gibi geleneksel besiyerleri kullanılarak bir ortamdaki mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. Standart kültürel tekniklerin en büyük kısıtlaması bir ortamdaki mikroorganizmaların %99'u mikroskopta görülmesine rağmen %1'inden daha azı kültüre alınabilmesidir. Optimize edilmiş bir yöntemle bu oran en fazla %5'e ulaşabilmektedir. Bu durum bir ortamdaki mikrobiyal çeşitliliğin kültürel yöntemlerle tam olarak yansıtılamadığını göstermektedir. Bu sebeple kültür bağımsız yöntemler mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında önem kazanmaktadır. Genetik parmakizi, metagenomik, metaproteomik, metatranskriptomik ve proteogenomik gibi moleküler teknikler mikrobiyal çeşitliliğin biyotik ve abiyotik çevresel faktörlerle ilişkisini açıklamak için hayati önem taşımaktadır.

Toprak gibi çevresel bir örnekte mikrobiyal zenginliğin %50 sini yansıtmak için 40 000 den fazla klon gerekmektedir. Ancak 16S rRNA klon kütüphanesi ile 1000 den az sekans elde edilmektedir ve bu durum mikrobiyal çeşitliliğin çok az bir kısmını yansıtmaktadır.

Çalışmamızda termal su örneklerinde kültüre alınamayan bakterilerin belirlenmesi amacıyla 16S rRNA klonlama çalışması yapılmıştır. 4 farklı termal su örneğinden yapılan klonlama sonucunda elde edilen pozitif izolatlara *MboI* enzimi ile ARDRA analizi uygulanmıştır. ARDRA analizi sonucunda 19 farklı profil elde edilmiş ve bu profillerden temsili üyeler seçilerek dizi analizi yapılmıştır. Dizi analiz sonucunda izolatların dizi analizine paralel şekilde *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus* sp, ve *Anoxybacillus flavithermus* türlerinin klonlar arasında bulunduğu gözlenmiştir. En çok rastlanan klon *Anoxybacillus flavithermus*' tur. Ayrıca *Meiothermus silvanus*, *Roseomonas* sp, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Brevibacillus thermoruber*, ve *Bacillus amyloliquefaciens* türlerinin kültüre alınamadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda kültüre alınamamış bakteri klon sekanslarının varlığı ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda kültür bağımsız çalışmalardan biri olan FISH yöntemi kullanılmıştır. Ancak arkea spesifik Arc 344 ve Arc 945 problemleriyle sinyal

alınamamıştır. Bunun sebebi ortamdaki arkea sayısının az olması olabilir. İzolasyon işlemi ile de arkea izolasyonunun yapılamaması bu durumu desteklemektedir.

Bakteria spesifik Eub 338 probuyla alınan sinyaller sonucunda ise tür sayısı bakımından en zengin bölgenin Eynal bölgesi olduğu görülmektedir. Güre ve Havran bölgesinin daha az populasyon yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür. Morfolojik olarak incelendiğinde ise bütün bölgelerde uzun ve kısa basillerin baskın olarak bulunduğu görülmektedir. Ayrıca kendiliğinden ışıma veren uzun zincir morfolojisine sahip hücreler görülmektedir. Bu hücrelerin Cyanobacteria üyesi olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda Balıkesir Sındırgı-Güre-Havran ve Kütahya Eynal termal kaynaklarının prokaryotik çeşitliliği belirlenmiştir. Kültür bağımlı çalışmalar sonucunda *Geobacillus*, *Bacillus*, *Aeribacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus* ve *Chelatococcus* cinslerine ait üyeler belirlenmiştir ancak Arkea izolasyonu yapılamamıştır. FISH çalışması sonucunda da aynı şekilde bakteri sinyalleri yoğun olarak alınırken Arkea sinyali alınamamıştır.

Çalışmamız için gelecekte yapılması planlanan uygulamalar;

1. Çalışmamızda arkea izolasyonu yapılamamıştır. Özellikle yüksek sıcaklığa sahip Sındırgı termal kaynağı için farklı besiyerleri, inkübasyon koşulları ve ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak o ortamdaki arkea populasyonu hakkında bilgi edinilebilir.

2. FISH yönteminde Arkea sinyali alınamamıştır. Kullanılan problemlerin konsantrasyonları, hibridizasyon bileşenleri ve süresi değiştirilerek yöntemi optimize etmek gerekmektedir.

3. Klonlama çalışmasında elde edilen beyaz kolonilerin sayısına bakıldığında ligasyon basamağının verimsiz gerçekleştiği görülmüştür. Bu nedenle ligasyon süresinin optimizasyonu yapılması planlanan çalışmalar arasındadır.

4. Daha öncede belirtildiği gibi izolatlarımız biyoteknolojik ve endüstriyel olarak değerli enzim ve metabolitleri üretebilmektedir. Bu nedenle izolatlarımızın özellikle proteaz, amilaz ve lipaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve aktif izolatlardan bu enzimlerin saflaştırılması ve

karakterizasyonu planlanmaktadır. Ayrıca gıda, kozmetik ve farmosötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ekzopolisakkaritlerin bazı izolatlarımız tarafından üretildiği gözlemlenmiştir. Bu izolatlardan ekzopolisakkaritlerin saflaştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adiguzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Gulluce, M., Belduz, O. A., Barış, Ö. (2011). Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey), *Turk J. Biol.*, 35, 267-274.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Şahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey, *Journal of Microbiological Methods*, 79, 321-328.
- Akdaş, H., *Bazı jeotermal kaynaklardan termofilik bakterilerin deizolasyonu ve endüstriyel öneme sahip enzimlerin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2013.
- Akkaya, E. S., Kivanç, M., “Microbiological analyses of wafers and biscuits obtained from two different factories in Eskişehir,” *2nd World Engineering Congress*, Sarawak, Malaysia, p 165-168, 22-25 July 2002.
- Aksoy, N., Demirkıran, Z., Şimşek, C. (2009). Sındırgı–Hisaralan (Balıkesir) Jeotermal Sahasının Jeokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi, Jeotermal Enerji Semineri.
- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology, *Journal of Bacteriology*, 172, 762-770.
- Amann, R. 1., Ludwig, W., ve Schleifer, K. H. (1995), Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Anitori, P.R., *Extremophiles; Microbiology and Biotechnology*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, (2012).
- Annamalai, N., Elayaraja, S., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. (2011). Thermostable, alkaline tolerant lipase from *Bacillus licheniformis* using peanut oil cake as a substrate, *African Journal of Biochemistry Research*, 5(6), 176-181.

Anonim1,

http://www.mta.gov.tr/v2.0/turkiye_maden/maden_potansiyel_2010/Balikesir_Madenler.pdf

Anonim2, http://www.mta.gov.tr/v2.0/birimler/redaksiyon/ekonomi-bultenleri/2012_15/21.pdf

Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds, *Environmental Microbiology* 1, 517–523.

Aqel, H., Al-Quadani, F., Yousef, F.K. (2012), A novel neutral protease from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62, *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1(2): 117-123.

Azlina, I. N., Norazila, Y. (2013). Thermostable Alkaline Serine Protease from Thermophilic *Bacillus* Species, *International Research Journal of Biological Sciences*, (2)2, 29-33.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M. (1996). Isolation of *Thermus* strains from hot composts, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1723-1727.

Belduz, A. O., Dulger, S., Demirbag, Z. (2003). *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1315–1320.

Bertani G. (1951), Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.

Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W., Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C, *Extremophiles*, 1, 14-27.

Bobbie, R.J., White, D.C. (1980), Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1212-1222.

Boutte, C., Komarkova, J., Grubisic, S., Znachor, P., Bataille, A., Zapomelova, E., Bouzas, T.M., Barros-Velázquez, J., Villa, T.G. (2006), Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review, *Protein & Peptide Letters*, 2006,

13, 645-651.

- Brock, T. D., Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus*, a Nonsporulating Extreme Thermophile, *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289–97.
- Canganella, F., Trotavelli, L. D. (1995). Ecological and physiological studies on thermophilic bacilli from sulfataric hot springs of central Italy, *Journal of Basic Microbiology*, 35(1), 9-19.
- Canganella, F., Wiegel, J. (2014). Anaerobic Thermophiles, *Life*, 4, 77-104.
- Chen, M. Y., Lin, G. H., Lin, Y. T., Tsay, S. S. (2002). *Meiothermus taiwanensis* sp. nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1647–1654.
- Chiş, L., Hriscu, M., Bica, A., Toşa, M., Nagy, G., Rona G. G., Vertessy, B., Dan Irimie, F. (2013). Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain, *Journal of General and Applied Microbiology*, 59(2), 119-34.
- Chung, A.P., Rainey, F., Nobre, M. F., Burghart, J. ve Da Costa, M.S. (1997). *Meiothermus cerbereus* sp. nov., new slightly thermophilic species with high level of 3-hydroxy fatty acids, *International Journal of Systematic Bacteriology* ., 47, 1225-1230.
- Coleri Cihan, A., Cokmus, C., Ozcan, B. (2009). Characterization of thermostable α -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 25, 2205–2217.
- Coleri Cihan, A., Tekin, N., Ozcan, B., Cokmus, C. (2012). The Genetic Diversity Of Genus *Bacillus* And The Related Genera Revealed By 16s rRNA Gene Sequences And Ardra Analyses Isolated From Geothermal Regions Of Turkey, *Brazilian Journal of Microbiology*, 309-324.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science And Engineering Journal*, 2(1), 53-62.
- Da Costa, M. S., Rainey, F. A., Nobre, M. F. *The genus Thermus and relatives*, In *The Prokaryotes*, Third edition, New York:Springer, 2006.

- De Farias S. T., Bonato, M. C. (2002). Preferred codons and amino acid couples in hyperthermophiles, *Genome Biology*, 3, (online publication).
- Declerck, N., Machius, M., Joyet, P., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. (2003). Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50°C temperature range, *Protein Engineering*, 16(4), 287-293.
- Demharter, W., Hensel, R. (1989). *Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a new thermophilic species from sewage sludge, *Systematic and Applied Microbiology*, 11, 272-276.
- Demirjian, D. C., Mori's-Varas, S., Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144–151.
- Dönmez, S. 1987. Ekstrem termofil mikroorganizmalar ve biyoteknoloji de uygulama olanakları. *Gıda Dergisi*, 6: 401-405.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2006.
- Ebrahimpour, A., Noor, R., Raja, Z., Rahman, A., Kamarudin, N. H. A., Basri, M., Salleh, A. B. (2011). Lipase production and growth modeling of a novel thermophilic bacterium: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain AFNA, *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(4).
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K., Antranikian, G. (2014). Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology*, 29C, 116-123.
- Ellis, T. J., Magnuson, S. T. (2012). Thermostable and Alkalistable Xylanases Produced by the Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus flavithermus* TWXYL3, *International Scholarly Research Network*, 517524, 8.
- Ferreira, A. M., Wait, R., Nobre, M. F., Da Costa M. S. *Characterization of Glycolipids from Meiothermus spp.* *Microbiology*, 145, 1191-1199 (1999).
- Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, M. D., Sineriz, F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327-332.

- Forterre, P. , Bergerat, A., Lopex-Garcia, P., (2006). The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea, *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 237-248.
- Frederic B. G., Estefania A, Jordi B. F., Charles A. A., Dolors B, Manel P. (2000), Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), *International Microbiology*, 3:103–106.
- Gerday, C., Glansdorff, N., *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, American Society Mic Series, Brussels, Belgium, 2007.
- Ghati, A., Sarkar, K., Paul, G. (2013). Isolation, Characterization and Molecular Identification of Esterolytic Thermophilic Bacteria from an Indian Hot Spring, *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 196-202.
- Goldfine, . (1972). Comparative aspects of bacterial lipids. *Arizmcas in Microbial Phj'siologj*, **8**, 1-58.
- Golovachevra, S., Egoral, A., Loginoyai, G. (1965). Ecology and systematics of aerobic obligate thermophilic bacteria isolated from thermal localities on Mount Yangou-Tau and Kunashir Isle of the Kuril chain, *Microbiology*, 34, 693-670.
- Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M., Yokota, A. (2004). Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (5NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 419–427.
- Green, S. J., Minz, D. (2005). Suicide Polymerase Endonuclease Restriction, a Novel Technique for Enhancing PCR Amplification of Minor DNA Templates, *Applied And Environmental Microbiology*, (71)8, 4721-4727.
- Guiral, M., Prunetti, L., Aussignargues, C., Ciaccafava, A., Infossi, P., Ilbert, M., Lojou, E., Giudici-Orticoni, M. T. (2012). The hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: from respiratory pathways to extremely resistant enzymes and biotechnological applications, *Advanced Microbiology Physiology*, 61, 125–194.

- Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Roßnagel, P., Burggraf, S., Huber, H., Stetter, K. O. (1996). *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe^{2+} at neutral pH under anoxic conditions, *Archives of Microbiology*, 166, 308–314.
- Haki, G. D., Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, 17–34.
- Hawumba, J. F., Theron, J., Brözel, V. S. (2002). Thermophilic protease-producing geobacillus from Buranga hot springs in western Uganda, *Current Microbiology*, 45(2), 144–150.
- Huang, Y. P., Ito, J. (1998). The hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* has two different classes of family C DNA polymerase: evolutionary implications, *Nucleic Acids Research*, 26, 5300–5309.
- Huber, T. L., Zhou, Y., Mead, P. E., Zon, L. I. (1998), Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm, *Blood* 92, 4128-4137.
- Huber, H., Hohn, M., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V., Stetter, K. (2002), A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont, *Nature*, 417(6884):63-67.
- Huber H., Prangishvili D. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third edition, Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2006.
- Hyeung, J.J., Chang-Hun, L., Yu, S.K., (2002). Two Flexible Loops in Subtilisin-like Thermophilic Protease, Thermicin, from *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 35, No. 5, pp.498-507.
- İnan, K., Çanakçı, S., Beldüz, A. O. (2011). Isolation and characterization of xylanolytic new strains of *Anoxybacillus* from some hot springs in Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 35, 529-542.
- İnan, K., Çanakçı, S., Belduz, A. O., Şahin, F. (2012). *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 62, 849–855.

- Janda, J. M., Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, *Journal Of Clinical Microbiology*, (45)9, 2761–2764.
- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C. I., McNeil, L. K., Badger, J. H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J. D., Weidman, J. F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M. D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B. P., Sykes, S. M., Sadow, P. W., D'Andrea, K. P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S. A., Mason, T. M., Olsen, G. J., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R., Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Nature*, 390(6658), 364-70.
- Korkmaz Başel, E. D., Cakın, K., Satman, A.: Türkiye'nin Yer altı Sıcaklık Haritası ve Tahmini Isı İçeriği, *Sempozyum Bildiri Kitabı*, VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, İstanbul (2008).
- Krah, R., Kozyavkin, S. A., Slesarev, A. I., Gellert, M. A. (1996). Two-subunit type I topoisomerase (reverse gyrase) from a hyperthermophilic methanogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 106–110.
- Kristjansson, J. K. *Thermophilic Bacteria*, Boca Raton: CRC Press, 1992.
- Lapaglia, C., Hartzell, P. L. (1997). Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3158-3163.
- Lechevalier, M. P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's viewpoint. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 5, 109-2 10.
- Lee, A. Y., Tsay, S. S., Chen, M. Y., Wu, S. H. (2004). Identification of a gene encoding Lon protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 and

- biochemical characterization of its thermostable recombinant enzyme, *European Journal of Biochemistry* , 271, 834–844.
- Lee, K. C., Kim, K. K., Eom, M. K., Kim, J. S., Kim, D. S., Ko, S. H., Lee, J. S. (2014). *Aneurinibacillus soli* sp. nov., isolated from mountain soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3792–3797.
- Lepage, E., Marguet, E., Geslin, C., Matte-Tailliez, Oriane., Zillig, W., Forterre, P., Tailliez, P. (2004). Molecular Diversity of New Thermococcales Isolates from a Single Area of Hydrothermal Deep-Sea Vents as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting and 16S rRNA Gene Sequence Analysis, *Applied And Environmental Microbiology*, (70)3, 1277-1286.
- Makowska-Grzyska, M., Kim, Y., Maltseva, N., Li, H., Zhou, M., Joachimiak, G., Babnigg, G., Joachimiak, A. (2014), Protein Production for Structural Genomics Using *E. coli* Expression, *Methods in Molecular Biology* ,1140: 89–105.
- Mallick, R., Boutz D. R., Eisenberg D., Yeates T. O. (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 9679–9684.
- Marr, A. G., Ingraham, J. L. (1962). Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 84(6), 1260-7.
- Masomian, M., Rhaman, R., Salleh, A. B., Basri, M. (2010). A unique thermostable and organic solvent tolerant lipase from newly isolated *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ:physical factor studies, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1693–1701.
- Mohagheghi, A., Grohmann, K., Himmel, M., Leighton, L., Updegraff, D. M. (1986). Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria, *International journal of systematic bacteriology*, 36, 435-443.
- Murai, A., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe, K. (2004). An *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1 produces a prolinespecific aminopeptidase useful for collagen degradation, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 810–818.

- Nakagawa, T., Hanada, S., Maruyama, A., Marumo, K., Urabe, T., Fukui, M. (2002). Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan), *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 199-209.
- Nazina, T. N., Lebedeva, E. V., Poltarau, A. B., Tourova, T. P., Grigoryan, A. A., Sokolova, Diyana S., Lysenko, A. M., Osipov, G. A. (2004). *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2019–2024.
- Nobre, M. F., Truper, H.G., Da Costa, M. S. (1996). Transfer of *Thermus ruber*, *T. silvanus*, and *T. chiliarophilus* to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Me. silvanus* comb. nov., and *Me. chiliarophilus* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Thermus*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 56, 604-606.
- Oshima, T., Imahori, K. (1974). Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from Japanese Thermal Spa, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24, 102–112.
- Özdemir, S., Matpan, F., Okumus, V., Dündar, A., Ulutas, M. S., Kumru, M. (2012). Isolation of a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. and production of thermostable α -amylase under solid-state fermentation (SSF), *Annals of Microbiology*, 62, 1367–1375.
- Özkaya, M. G., Variyenli, H. İ., Yonar, G. (2008). Jeotermal Enerji İle Isıtılan Kütahya İli Simav İlçesindeki Isıtma Sisteminin Çevresel Etkilerinin Değerlendirilmesi ve Uygulanması Gereken Yenilikler, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 29(2), 1-18.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1671-1679.

- Panda, M.K., Sahu, M.K., Tayung, K. (2013), Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India, *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2): 159–165.
- Panday, D., Das, S. K. (2010). *Chelatococcus sambhunathii* sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 861-865.
- Pires, A. L., Albuquerque, L., Tiago, I., Nobre, M. F., Empadinhas, N., Verissimo, A., Da Costa, M. S., (2005). *Meiothermus timidus* sp. nov., a new slightly thermophilic yellow-pigmented species, *FEMS Microbiology Letters*, 245, 39–45.
- Poli, A., Romano, I., Cordella, P., Orlando, P., Nicolaus, B. and Berrini, C. C. (2009). *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy, *Extremophiles*, 13, 867–874.
- Pozo-Dengra, J., Martinez-Rodriguez, S., Contreras, L. M., Prieto, J., Andujar-Sanchez, M., Clemente-Jimenez, M. J., Heras-Vazquez, J. L. F., Rodriguez-Vico, F., Neira, J. L. (2009). Structure and Conformational Stability of a Tetrameric Thermostable N-Succinylamino Acid Racemase, *Biopolymers*, 91(9), 757-772.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Salleh, A.B., Basri, M. (2007). *Geobacillus zalihae* sp. nov. strain T1^T, a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, *BMC Microbiology*, 7, 77.
- Rahman, T. J., Marchant, R., Banat, I. M. (2003). Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments, *Biochemical Society Transactions*, (32)2.
- Rastogi, G, and Sani, R.K., Chapter 2 Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment, *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, Springer, (2011).
- Raulio, M., Järn, M., Ahola, J., Peltonen, J., Rosenholm, J. B., Tervakangas, S., Kolehmainen, J., Ruokolainen, T., Narko, P., Salkinoja-Salonen, M.

- (2008). Microbe repelling coated stainless steel analysed by field emission scanning electron microscopy and physicochemical methods, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 751-760.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, Second edition, New York: Springer, 2013.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1–17.
- Scholz, T., Demharter, W., Hensel, R., Kandler, O. (1987). *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage, *Systematic and Applied Microbiology*, 9, 91–96.
- Sharma, A., Adhikari, S., Satyanarayana, T. (2006). Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 483–490.
- Sharp, R. J., Williams, R. A. D. (1988). Properties of *Thermus ruber* strains isolated from Icelandic hot springs and DNA:DNA homology of *Thermus ruber* and *Thermus aquaticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2049-2053.
- Shaw, N. (1974). Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 17, 63-108.
- Sikorski, J., Tindall, B. J., Lowry, S., Lucas, S., Nolan, M., Copeland, A., Glavina, Del Rio, T., Tice, H., Cheng, J.F., Han, C., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Rohde, M., Goker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P., Lapidus, A. (2010). Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* type strain (VI-R2), *Standards in Genomic Science*, 3, 37-46.

- Sklarz, M. Y., Angel, R., Gillor, O., Soares, M. I. M. (2009): Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96, 659–664.
- Slesarev, A. I., Mezhevaya, K. V., Makarova, K. S., (2002). The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 4644–4649.
- Stackebrandt, E., Pukall, R., Ulrichs, G., Rheims, H. Analysis of 16S rDNA clone libraries: Part of the big Picture *Microbial Biosystems: New Frontiers, Canada*, (1999).
- Suzuki, Y., Kishigami, T., Inoue, K., Mizoguchi, Y., Eto, N., Takagi, M., Abe, S. (1983). *Bacillus thermoglucosidasius* sp. nov., a new species of obligately thermophilic bacilli, *Systematic and Applied Microbiology*, 4(4), 487-95.
- Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989). 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyolojik Laboratuvarı Kılavuzu, *T.C. Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları*, 74, 260.
- Tenreiro, S., Nobre, M. F., da Costa, M. S. (1995). *Thermus silvanus* sp. nov. and *Thermus chliarophilus* sp. nov., two new species related to *Thermus ruber* but with lower growth temperatures, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 633–639.
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Lucas, S., Goltsman, E., Copeland, A., Del Rio, T. G., Nolan, M., Tice, H., Cheng, J. F., Han, C., Pitluck, S., Liolios, C., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Fährnich, R., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Rohde, M., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., Lapidus, A. (2010). Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21T), *Standards in Genomic Science*, 3, 26–36.
- Verma, D., Satyanarayana, T. (2012). Cloning, expression and applicability of thermo-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues, *Bioresource*

- Technology*, 107, 333–338.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses, *Plos one*, 8(2), e57923.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1-43.
- Voigt, B., Schweder, T., Becher, D., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Feesche, J., Maurer, K. H., Hecker, M. (2004). A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*, *Proteomics* 4, 1465–1490.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa, *Systematic and Applied Microbiology* , 6, 143-151.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K. (2011). Characterization of Thermophilic Halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand, *International Journal of Molecular Sciences* ., 12, 5294-5303.
- Yasar Yildiz, S., Radchenkova, N., Arga, Y. K., Kambourova, M., Oner, T. E. (2015). Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*., 99, 2277–2289.
- Yoon, JH., Lee, MH., Kang, SJ., Lee, SY., Oh, TK., *Sphingomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from Soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), 56, 2165–2169.
- Zarilla, K. A., Perry, J. J., (1987). *Bacillus thermoleovorans* sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 9, 258 - 263.
- Zeigler, D. R. (2001). The Genus *Geobacillus*, *Bacillus Genetic Stock Center*, 3, 7-11.